

**Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin**

Dissertation

**Funktionelle Charakterisierung monoklonaler Antikörper
gegen TIRC7,
einem neuen negativ immunregulatorischen
Zelloberflächenmolekül**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Anke Schulze
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
2. Prof. Dr. rer. nat. Th. Schüler
3. Prof. Dr. rer. nat. S. Dübel

Datum der Promotion: 21.11.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 T-ZELL-AKTIVIERUNG	1
1.2 T-ZELL-REZEPTOR-SIGNALTRANSDUKTION	2
1.3 T-ZELL-SUBKLASSEN.....	3
1.4 DAS IMMUNOLOGISCHE GEDÄCHTNIS	4
1.4.1 <i>Recall-Antigene</i>	6
1.5 IMMUNOLOGIE UND TUMOREN	8
1.6 EIN NEUES MEMBRANPROTEIN–TIRC7 (T CELL IMMUNE RESPONSE CDNA7).....	9
2. ZIELSTELLUNG	12
3. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 LÖSUNGEN.....	13
3.2 CHEMIKALIEN	13
3.3 GERÄTE.....	15
3.4 KITS	16
3.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
3.6 ANTIKÖRPER	17
3.7 COMPUTERSOFTWARE	17
3.8 ZELLEN.....	17
3.8.1 <i>Zelllinien</i>	17
3.9 ISOLATION VON PERIPHEREN MONONUKLEAREN ZELLEN IM BLUT (PBL)	20
3.10 KULTIVIERUNG VON ZELLEN.....	20
3.11 GEMISCHTE LYMPHOZYTENKULTUR (MLC)	21
3.12 RNA ISOLATION.	21
3.13 AGAROSEGELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN.	22
3.14 NORTHERN –BLOT.....	22
3.15 HERSTELLUNG VON RADIOAKTIV MARKIERTEN DNA-SONDEN	23
3.16 HYBRIDISIERUNG VON NORTHERN BLOTS	24
3.17 cDNA-SYNTHESE.	24
3.18 PCR	25
3.18.1 <i>Primerauswahl</i>	26
3.18.2 <i>Durchführung der PCR</i>	26

3.19 BRDU-ASSAY	27
3.20 [³ H]-THYMIDIN-PROLIFERATIONSASSAY	27
3.21 DURCHFLUßZYTOMETRIE	28
3.21.1. CFDA-SE-Färbung (<i>carboxyfluoreszein diacetat succinimidyl ester</i>)	28
4. ERGEBNISSE	30
4.1 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG POLYKLONALER TIRC7 ANTIKÖRPER IN DER GEMISCHTEN LYMPHOZYTENKULTUR	30
4.2 AUSWAHL FUNKTIONELLER POLYKLONALE ANTIKÖRPER DURCH UNTERSUCHUNG DER PROLIFERATIONSHEMMUNG IN ALLOGEN STIMULIERTEN T-LYMPHOZYTEN MITTELS [³ H]-THYMIDIN-PROLIFERATIONSASSAY	31
4.3 REVERSIBILITÄT DER PROLIFERATIONSHEMMENDEN WIRKUNG DER AK 73, 76, 79 DURCH DIE SPEZIFISCHEN PEPTIDE 4, 6, 2	33
4.4 MONOKLONALER TIRC7-ANTI-KÖRPER 18 HEMMT DOSISABHÄNGIG DIE PROLIFERATION DER T- MEMORY-ZELLEN	35
4.5 NACHWEIS VON TIRC7 IN VERSCHIEDENEN TUMORZELLINIEN DURCH PCR	37
4.6 NACHWEIS VON TIRC7-MRNA IM NORTHERN BLOT IN PRIMÄREN TUMORZELLINIEN ...	40
4.7 ANTI-TIRC7 MAK HEMMEN DIE PROLIFERATION VON TUMORZELLINIEN	42
5. DISKUSSION	46
5.1 TIRC7-MOLEKÜL	46
5.2 T-ZELL-PROLIFERATIONSHEMMUNG DURCH TIRC7-ANTI-KÖRPER	47
5.3 TIRC7 UND RECALL-ANTIGENSTIMULATION	49
5.4 TUMORZELLEN UND TIRC7-EXPRESSION	49
6. ZUSAMMENFASSUNG	52
7. LITERATURVERZEICHNIS	53

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	<i>Arbitrary Unit</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CONA	Concavalin A
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	<i>Cytotoxic lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und Mitarbeiter
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoreszenzeinisothiozyanat
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICAM	intracelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kd	Kilo-Dalton
KF	Kontrollfragment
LAC	Lymphokinaktivierte Killerzellen
MACS	Magnetische Zellseparation
MHC	<i>major histokompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLC	gemischte Lymphozytenkultur
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	<i>phosphor buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
TCR	T-Zell Rezeptor
TH-Zelle	T-Helferzelle
TIRC7	T cell immune response cDNA 7
TNF	Tumornekrosefaktor

1. Einleitung

Eines der Ziele der Forschung in der Immunologie ist es neue Therapieformen zu entwickeln, die durch selektive Hemmung des Immunsystems und gezielte Steuerung ein spezifisches Eingreifen in das Immunsystem ermöglichen.

Die therapeutische Prävention der unerwünschten Immun-Aktivierung bei einer Reihe von Erkrankungen, wie Abstoßung von Organtransplantaten sowie Autoimmunerkrankungen, ist zur Zeit auf immunsuppressive Medikamente angewiesen, die mit intrazellulären Targets interferieren. Der große Nachteil dieser Medikamente besteht in der Pansuppression des Immunsystems mit entsprechend daraus resultierenden Nebenwirkungen wie Infektion, Organtoxizität als auch Tumorentstehung (Frezza et al. 1997; Checka et al. 1998; de Mathos et al. 2000).

Aus diesem Grunde stellt die spezifische Regulation der Immunantwort ein bedeutendes Ziel in der immunologischen Forschung dar.

1.1 T-Zell-Aktivierung

Die T-Zell-Aktivierung ist ein fortlaufender Prozess in den unterschiedliche Signalwege involviert sind, die letztendlich eine veränderte Genexpression zur Folge haben. Diese veränderte Genexpression führt zur klonalen Expansion mit einer möglichen Differenzierung der T-Zellen in die Subpopulationen Th1 und Th2 (Abbas, A.K et al. 1996; Glimcher, L.H. et al. 2000). Diese Subpopulationen können anhand ihrer Zytokinmuster und der Art und Weise der Immunantwort unterschieden werden (O`Garra, A. 1998; Mosmann, T.R. et al. 1986).

Die T-Zell-Antwort wird durch Interaktion des Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR) mit Peptiden, welche vom MHC-Komplex auf der Oberfläche Antigen präsentierender Zellen (APCs) präsentiert werden, initiiert (1.Signal) (Crabtree, G.R. 1989).

Zusätzliche Signale (2.Signal) werden durch eine Vielzahl von Rezeptor-Liganden-Interaktionen über verschiedene Membranproteine wie z.B. CD28/CTLA4 und B7-1, B7-2, CD40/CD40L, LFA-1/ICAM-1 vermittelt. Diese Membranmoleküle werden als kostimulatorische Signalmoleküle zusammengefasst (Riley, J.L. et al. 2002; Salomon, B. et al. 2001, Linsley, P.S. et al. 1993; Walunas, T.L. et al. 1994; Schwarz, R.H. et al.

1992). Ein wichtiger kostimulatorischer Weg wird durch CD28 und seine Liganden B7-1(CD80) und B7-2(CD86) vermittelt (Sharpe, A.H. et al. 2002; Lenschow, D.J. et al. 1996).

Hinsichtlich der Stärke des kostimulatorischen Effektes wurden Unterschiede zwischen B7-1 und B7-2 festgestellt (van Dijk, A.M.C. et al. 1996). Beide Signalwege induzieren eine IL-2 und IFN γ Produktion. Die Kostimulation über B7-2 führt jedoch zur Verstärkung der Signale, die eine Entwicklung der naiven T-Zelle in einer Th2-Richtung lenkt, durch Induktion der Produktion von IL-4 und TNF β (Freeman, G.J. et al. 1995).

Durch Modulation dieser kostimulatorischen Moleküle durch Antikörper (CD40L) oder lösliche Proteine (CTLA4-Ig) ist es möglich, die T-Zell-Aktivierung auf verschiedenen Wegen zu verändern, und so die Immunantwort durch die Integration positiver oder negativer Signale zu modulieren.

Viele Moleküle, durch deren Modulation die effektive Immunantwort beeinflusst werden kann, interferieren entweder mit dem TCR, blockieren die kostimulatorischen Signale oder inhibieren intrazelluläre Aktivierungssignale, die in der Kaskade „downstream“ der primären signalauslösenden Oberflächenmoleküle liegen.

Besondere Beachtung erlangte in diesem Zusammenhang CTLA-4, welches eine Homologie zu CD28 aufweist. Es bindet ebenfalls B7-1 und B7-2 jedoch mit vielfach höherer Affinität als CD28 (Mueller, D.L. 2000). Es wird jedoch erst 24 h nach T-Zell-Aktivierung exprimiert und wirkt negativ regulatorisch (Rothstein, D.M. et al. 2003; Boussiotis, V.A. et al. 1996).

1.2 T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion

An der Oberfläche aller kernhaltiger Zellen werden intrazelluläre Antigene im Komplex mit MHC I Molekülen exprimiert. Dadurch erlangt das Immunsystem z.B. Kenntnis über Virusinfekte der Zelle (Präsentation von viralen Antigenen) oder maligner Entartung (Präsentation von Tumorantigenen). Diese Antigene werden z.B. von CD8 $^+$ -T-Zellen erkannt und über Aktivierung verschiedener Wege erfolgt eine Abwehr der z.B. intrazellulären Erreger oder auch Tumorzellen (Kronfeld, K. et al. 2005; Berke, G. et al. 1994).

MHC II Moleküle werden an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC) z.B. dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Monozyten/ Makrophagen, Endothelzellen exprimiert (Knight, S.C. et al. 1993).

MHC II stellen besondere Peptidstrukturen dar. Voraussetzung für die Entstehung dieser Peptidstrukturen ist die Antigenerkennung, die anschließende Phagozytose gefolgt von Lyse und endosomalem Abbau sowie die nachfolgende Präsentation an der Oberfläche der APC. Es handelt sich dabei überwiegend um Peptidantigene von Bakterien und Toxinen. Diese MHC II dienen als Bindungsstellen für T-Zell-Rezeptoren. T-Zell-Rezeptoren sind Polypeptidketten, die aus einer α - und einer β - Untereinheit bzw. seltener aus einer γ - und einer δ - Untereinheit bestehen (Madden, D.R. et al. 1995).

Eine Aktivierung von T-Zellen erfordert neben der Interaktion von T-Zell-Rezeptor und MHC II-AG-Komplex die Anwesenheit weiterer kostimulatorischer Signale wie z.B. B7/CD28 Wechselwirkung (Sharpe, A.H. et al. 2002; Riley J.L. et al. 2002)

Der Aktivierung der T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor folgt die Expression von Zytokinrezeptoren sowie die Sekretion von Zytokinen, die DNA-Replikation und weitere Zelldifferenzierung in spezifische T-Zell-Subklassen.

Welches genetische Programm nach Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor abläuft, ob Anergie, Apoptose oder klonale Expansion/ Differenzierung Th1-Th2, hängt somit von einer Vielzahl kostimulatorischer/-inhibitorischer Regulationsmechanismen ab.

1.3 T-Zell-Subklassen

CD4⁺T-Zellen interagieren mit MHC II und können eine entsprechende Immunantwort auslösen. Nach der Aktivierung erfolgt eine Produktion unterschiedlicher Zytokine.

In Abhängigkeit vom vorherrschenden Zytokinmilieu erfolgt eine Differenzierung der T-Helferzelle in eine Th1- oder Th2- Zelle (O`Garra, A. 1998; Glimcher, L.H. et al. 2000; Abbas, A.K. et al. 1996). Dieser Vorgang ist abhängig u.a. von der Antigenart, sowie der Erstkontakt-Zelle.

Die Differenzierung in Richtung Th1-Zelle wird u.a. durch IL-12 induziert, welches von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet wird (Schweitzer, A.N. et al. 1998).

Von Th1-Zellen wird vor allem IL-2, IFN γ , TNF α , sowie GM-CSF sezerniert und führt zu einer proinflammatorischen Immunantwort. Das von Th1-Zellen gebildete IFN γ fördert die Aktivierung antigenpräsentierender Makrophagen und zusammen mit IL-2 die Differenzierung von CD8⁺Zellen zu zytotoxischen T-Zellen (Glimcher, L.H. et al. 2000).

IL-4 beeinflusst die Differenzierung der Th0-Zelle in Richtung Th2-Zelle (Seder, R.A. et al. 1994). Th2-Zellen bilden vor allem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern (z.B. IgE). Die Th2-Antwort führt einerseits zu einer Unterdrückung akuter und chronischer Entzündung und andererseits zu einer Förderung allergischer Reaktionen. Verschiedene kostimulatorische Signale können jedoch die T-Zell-Differenzierung regulativ beeinflussen, z.B. hemmt die fehlende Kostimulation über CD28/B7 die Produktion von IL-4 (Schweitzer, A.N. et al. 1998).

Die Entwicklung der naiven CD8+T-Zelle nach Antigenstimulation erfolgt in 3 Phasen (Klebanoff, A.C. et al. 2006). Die Initialphase ist charakterisiert durch eine klonale Expansion antigenspezifischer Zellen, Zytokinfreisetzung und zytolytischer Aktivität. In der 2. Phase (auch „Death“-Phase genannt) kommt es zu einem schnellen apoptoseinduzierenden Prozess der antigenspezifischen Effektor-T-Zellen. Die 3. Phase ist charakterisiert durch die Bildung einer persistierenden Population antigenerfahrener Zellen, welche das sogenannte immunologische Gedächtnis bilden. Ein Hauptteil (ca. 90%) der aktivierten CD8+T-Zellen folgen Phase 2 (Apoptose). Nur ein geringer Teil (ca. 10%) gehen in Phase 3 über und bleiben als immunologisches Gedächtnis erhalten.

1.4 Das immunologische Gedächtnis

Von entscheidender Bedeutung für das Immunsystem ist die korrekte Erkennung und Eliminierung von potentiell schädlichen Antigenen. Ein erneuter Antigenkontakt sollte darüber hinaus eine schnelle und effektive Antwort nach sich ziehen.

Dieses sogenannte immunologische Gedächtnis besteht aus langlebigen Lymphozyten sowohl vom B- als auch vom T-Zell-Typ.

B-Gedächtniszellen zeichnen sich durch eine erhöhte Expression von MHC-II-Molekülen und IgG-, IgA- oder IgE-Antikörper auf ihrer Oberfläche aus (nicht IgM oder IgD), die auch eine höhere Antigenaffinität aufweisen.

Durch die unterschiedliche Differenzierung der T-Lymphozyten entwickelt sich aus der sogenannten naiven T-Zelle nach Antigenkontakt die sogenannte geprimte (antigenerfahrene) Zelle. Diese geprimten T-Zellen lassen sich unterteilen in Effektorzellen und Gedächtniszellen. Die Effektorzellen können innerhalb kürzester Zeit ohne weitere Kofaktoren nach dem erneuten Zusammentreffen mit „ihrem“ Antigen aktiv werden (Matzinger, et al. 1994).

Kehrt eine Antigen-geprimte Zelle nach erfolgter Aktivierung wieder in einen ruhenden Zustand zurück, wird sie als Gedächtniszelle bezeichnet. Diese benötigt nach erneutem Antigenkontakt Kofaktoren, um gegen das Antigen wirksam werden zu können (Philgren et al. 1996).

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mehrfach antigen-geprimte Zellen zumeist CD28 negativ und CD57 positiv sind. Es wird angenommen, dass es sich dabei um enddifferenzierte Langzeit-Gedächtniszellen handelt (Klebanoff, A.C. 2006; Kern et al. 1999; Monteiro et al. 1996).

Nur eine kleine Population der mehrfach antigen-geprimten Effektorzellen ist befähigt, als Langzeitgedächtniszelle zu überleben. Untersuchungen zeigten, dass in diesen Langzeit-Gedächtniszellen u.a. eine Expression von apoptosehemmenden Proteinen erfolgt, wie z.B. lysosomale Proteinaseinhibitoren (Spi2A) (Liu et al. 2004). Sie besitzen darüber hinaus die Fähigkeit zur antigenunabhängigen Selbsterhaltung durch eine sogenannte homeostatische Proliferation in Anwesenheit von IL-7, IL-15, IL-21 (Kaech, S.M. et al. 2003; King, C. et al. 2004). Dadurch sind sie zu einer schnelleren Aktivierung der Effektorfunktion und klonalen Proliferation nach erneutem Antigenkontakt in der Lage (Barber, D.L. et al. 2003).

Eine wichtige Bedeutung scheinen die CD4⁺T-Zellen bei der Induktion und Erhaltung der antigenspezifischen Gedächtnis CD8⁺T-Zelle zu haben (Kronenberg, M. et al. 2005).

Vermutlich initiieren CD4⁺T-Zellen eine entsprechende Programmierung der antigenspezifischen Gedächtnis CD8⁺T-Zellen nach Antigen-Erstkontakt der CD8⁺T-Zellen. Es wurde eine weitere Subpopulation von CD4⁺T-Zellen beschrieben, welche eine negativ regulatorische Rolle in der Aktivierung und Erhaltung der Gedächtnis CD8⁺T-Zellen zu haben scheinen (Murakami, M. et al. 2002, Suvas, S. et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine spätere Reaktionen auf ein schon bekanntes Antigen in immunen Personen primär durch Gedächtniszellen erfolgt. Diese Reaktionen laufen dann in der Regel schneller und effizienter ab und führen so zumeist zu weniger stark ausgeprägten oder sogar fehlenden klinischen Symptomen.

Man nutzt diese Leistung des Immunsystems z.B. bei Impfungen aus. Dabei wird durch gezielte Verabreichung von Antigenen eines potentiell pathogenen Erregers versucht, ein immunologisches Gedächtnis und damit einen Schutz vor dem entsprechenden Pathogen aufzubauen.

Diese protektive Wirkung von Impfungen resultiert aus der Bildung von Antikörpern, die von B-Lymphozyten nach entsprechender Vaccinierung produziert werden (Zinkernagel, 2003). Darüber hinaus können Gedächtnis-CD4+ und Gedächtnis-CD8+Zellen einen effektiven Schutz gegen virale und bakterielle Infektionen auf Grund ihrer schnellen Effektorfunktion und Expansion vermitteln (Badovinac et al. 2004; Lauvau et al. 2001). Die Gedächtnis-CD4+ und Gedächtnis-CD8+Zellen sind auch wichtig für die Entwicklung von Impfstoffen gegen obligat intrazelluläre Erreger wie z.B. bei Malaria, TBC oder HIV (Janssen et al. 2003; Sun et al. 2003).

1.4.1 Recall-Antigene

Das Immunsystem eines erwachsenen Menschen hat sich im Laufe seines Lebens bereits vielfältig mit unterschiedlichen Antigenen auseinandergesetzt, sei es durch Impfungen oder ubiquitär vorkommenden Erregern. Entsprechend ist davon auszugehen, dass für häufig auftretende Erkrankungen bei einer Vielzahl von Individuen bereits Gedächtnis-Zellen vorhanden sind. Nach erneutem Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen (Recall-AG) wie z.B. Tetanus, CMV, Pertussis Influenza und Candida, ist davon auszugehen, dass die vorhandenen Gedächtnis-Zellen aktiviert werden.

Tetanus

Clostridium tetani ist ein sporenbildendes Bakterium, welches vor allem im Erdreich anzutreffen ist. Eine Infektion mit dem Bakterium *Clostridium tetani* führt zu einer Schädigung des infizierten Organismus überwiegend durch die Freisetzung von toxischen Proteinen (Exotoxinen). Diese binden an der Oberfläche der infizierten Zelle, gelangen in das Zytoplasma und führen zum Zelltod. Von entscheidender Bedeutung für die Infektabwehr, sind die von B-Zellen gebildeten Antikörper, welche die Bindung des Toxins an die Zellen blockieren können und somit die Infektion mit *Clostridium tetani* bekämpfen. Eine entsprechende Impfprophylaxe führte in den Industrieländern zu einem deutlichen Rückgang der Morbidität, dennoch wird die jährliche Mortalität weltweit auf ca. 1 Million geschätzt.

Humane Zytomegalie-Viren (CMV)

Eine Infektion mit Zytomegalie-Viren führt meist nicht zu einer klinischen Manifestation nach Infektion. Man geht davon aus, dass die Durchseuchung der Bevölkerung im Alter

von 20-40 Jahren bei 50-90% liegt, mit steigendem Alter entsprechen höher (Werner, et al. 1991) CMV produzieren 2 Proteine, US2 und US11, die zu einer Blockade in der MHC I Synthese und damit zu einer fehlerhaften Antigenpräsentation führen. Das wiederum kann zu einer unzureichenden Erregerabwehr führen und zu einem Persistieren des Virus im Organismus, dann vor allem in endothelialen und myeloischen Zellen (van Leeuwen, E.M.M. et al. 2004). Inflammatorische Prozesse oder immunsuppressive Therapien können dann zu einer Stimulation und Reaktivierung der Viren führen, mit entsprechend schweren klinischen Verläufen. Interessanterweise zeigte sich eine Persistenz der CMV u.a. bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Hooper, M. et al. 1999).

Pertussis Toxin

Bordetella pertussis, Erreger des Keuchhustens, ist ein Bakterium welches ein virulentes Exotoxin bildet. Diese virulente Aktivität beruht auf der ADP-Ribosylierung eines regulatorischen Proteins, welches die Adenylatcyklase normalerweise inhibiert. Durch die ADP-Ribosylierung wird das Protein in seiner inhibitorischen Wirkung gehemmt. Das führt zu einer Anreicherung von cyclischem AMP im Cytosol (Katana et al. 1982). Eine B-Oligomer-Komponente des Toxins bindet an Glycoprotein Rezeptoren auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen und verursacht so eine polyklonale T-Zell-Aktivierung (Burnette, et al.1993).

Influenza

Eine der wichtigsten epidemischen Infektionskrankheiten wird durch Influenzaviren ausgelöst. Das Virus versucht der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen durch einen Antigen shift/ Antigen drift, das heißt, es ist eine sogenannte dynamische Veränderung der Antigenität zu beobachten.

Gegen ein Influenzavirus eines bestimmten Typs entwickelt sich in der Regel eine Immunität in Form von neutralisierenden Antikörpern gegen Hämagglutinin oder Neuramidase, zwei Oberflächenproteine des Virus. Durch Punktmutation in den Genen kann das Virus nun seine antigenen Eigenschaften variieren. Ein Grossteil nach einem Erstkontakt gebildeter Antikörper kann so nicht mehr wirkungsvoll binden. T-Zellen und einige Antikörper können jedoch noch bestimmte unveränderte Epitope erkennen und so verursacht diese Antigen drift eine milder verlaufende Erkrankung.

Candida albicans

Gehört zur Gattung der Sprosspilze und lebt auf den Schleimhäuten der meisten Menschen, in der Regel ohne eine Schädigung hervorzurufen. Bei sehr vielen klinisch gesunden Menschen sind niedrige Titer humoraler Antikörper nachweisbar. Dies bedeutet, dass ein funktionierendes Immunsystem bestimmte Pilze als Kommensalen in Schach hält. Systemische Pilzkrankungen sind ein eher seltenes Krankheitsbild, zumeist bei immunsupprimierten Menschen, wobei eine T-Zell-vermittelte Makrophagenaktivierung eine Rolle spielt.

1.5 Immunologie und Tumoren

Die meisten Tumoren entstehen durch Teilung aus einer Mutterzelle, bei der aufgrund somatischer Mutationen Entwicklungskontrollgene aktiviert oder Tumorsuppressorgene und Differenzierungsgene inaktiviert werden. Maligne Tumoren können Tumorantigene bilden, die von den Zellen des Immunsystems erkannt werden. Antigen spezifische CD8+T-Zellen erkennen dann diese durch MHC I Moleküle präsentierten Antigene und sind somit für die Tumorabwehr verantwortlich (in ihrer Mehrzahl handelt es sich um zytotoxische Zellen) (Abbas, A.K. et al. 2005; Kaech, S.M. et al. 2002). Die zytotoxischen CD8+T-Zellen können über direkte und indirekte Mechanismen agieren. Direkte Mechanismen führen zur Apoptose der Zielzelle. Dies wird über Perforin, Granzym und CD95L vermittelt (Kagi, D. et al. 1995). Indirekte Mechanismen werden über Zytokinsekretion und gezielte Entwicklung tumorspezifischer zytotoxischer CD8+T-Zellen vermittelt (Schlom, J. et al. 2003, von Mehren, M. et al. 2001).

Tumorzellen sind jedoch häufig keine geeigneten Antigen präsentierenden Zellen, da ihnen wichtige kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 fehlen. Einige Tumorzellen sind in der Lage die Synthese des Tumorantigens einzustellen oder es werden immunsuppressive Substanzen wie z.B. IL-10 oder TGF β produziert.

In einigen Tumorzellen werden tumorassoziierte Antigene überexprimiert. So wird z.B. in Melanomzellen das Enzym Thyrosinase überexprimiert. Patienten mit einer Melanomerkkrankung bilden Thyrosinase-spezifische-T-Zellen, die diese Melanomzellen erkennen und vernichten können (Burmester, G.-R. et al. 1998). Therapeutisch versucht man dies durch Tumovaccinierung mit Hilfe dendritischer Zellen auszunutzen (Grosenbach, D.W. et al. 2001).

Ein chronischer Antigenstimulus wie beispielsweise bei chronisch viralen Infekten oder Tumorerkrankungen, führt jedoch zu einer negativen Beeinflussung der Funktion der CD8+T-Zellen mit unzureichender, ineffektiver Immunantwort (Barber, D.L. et al. 2006).

Eine Kombination unterschiedlicher immunologischer Aktivierungswege (z.B. Induktion tumorassoziierter Antigene und Antikörper) führt möglicherweise zu einer effektiveren Tumorthherapie (Zhu, M.Z. et al. 2000).

1.6 Ein neues Membranprotein–TIRC7 (T cell immune response cDNA7)

Auf der Suche nach neuen Genen, die an der T-Zell-Aktivierung beteiligt sind, wurde im Rahmen einer Studie „Analyse der frühen Genexpression allogene stimulierter T-Zellen in der gemischten Lymphozytenkultur“ ein cDNA-Fragment isoliert, welches nach 24 h Allostimulation hochreguliert ist und eine Länge von 350 bp aufweist (Utku, N. et al. 1998).

Die vollständige cDNA des Gens mit einer Gesamtgröße von 2488 bp wurde aus einer λ -gt10-cDNA-Bibliothek PHA-stimulierter T-Zellen und humaner Milz kloniert. TIRC7 weist einen offenen Leserahmen von 1842 bp auf und kodiert für ein Protein von 614 Aminosäuren (errechnetes Molekulargewicht 68,623 kD).

Die Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz ergab die hypothetische Struktur eines Transmembranproteins mit sieben transmembranären Domänen, einen intrazellulären N-Terminus und einen extrazellulären C-Terminus. (Abb.1)

Es gibt mehrere posttranslatorische Modifizierungsstellen: zwei Glykosylierungen (AS 267 und 287), drei Phosphorylierungen für Proteinkinase C (AS 58, 98, 148) sowie eine Phosphorylierung für Proteinkinase A (AS 21).

TIRC7 zeigt zu einem murinen Immunsuppressorprotein J6B7 eine 38% Homologie auf Proteinebene (Lee, C. et al. 1998), eine 12-71% Homologie zu verschiedenen putativen Protonen-ATPase-Untereinheiten, sowie eine hohe Sequenzhomologie zu einer humanen osteoklastenspezifischen cDNA (Li, Y.P. et al. 1996).

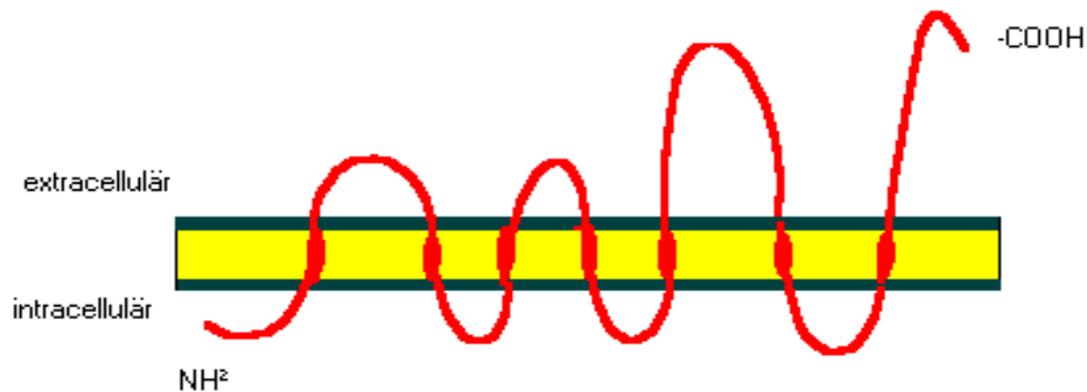


Abb.1: Hypothetische Struktur von TIRC7, mit 7 transmembranären Domänen (NH₂-Terminus intrazellulär, COOH-Terminus extrazellulär)

Mittels Northern-Blot Analyse konnte die Hochregulation der mRNA nach Allostimulation peripherer mononukleärer Zellen nachgewiesen werden. TIRC7-Expressionsanalysen der Gewebeverteilung auf mRNA-Ebene mittels Northern-Blot ergaben eine Expression in Milz, Lymphknoten, Appendix, Knochenmark, Leber, Herz, Pankreas, und Nebenniere.

Das in vitro translatierte Protein von TIRC7 zeigt in der gemischten Lymphozytenkultur eine dosisabhängige Inhibition der allogenen Immunreaktion von 70-90%.

Zur genaueren TIRC7-Proteinanalyse wurden 14 polyklonale Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt. Die Antikörper sind gegen verschiedene intra- und extrazelluläre Domänen von TIRC7 gerichtet. Mit Hilfe dieser Antikörper konnte sowohl in Wester-Blot-Analysen aus humanen Lymphozyten als auch anhand konfokaler mikroskopischer Untersuchungen der peripheren Lymphozyten die Expression von TIRC7 bestätigt werden. Mehrere Antikörper zeigten in vivo und in vitro eine Hemmung der Immunantwort.

In einem Rattenmodell konnte eine einwöchige Therapie mit TIRC7-Antikörper signifikant die akute Nierentransplantatabstoßung vorbeugen (Utku, N. et al. 1998).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im Gelenkgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis TIRC7 hochreguliert ist. Nach Einsatz des monoklonalen TIRC7–Antikörpers wurde die Induktion und Progression der Kollagen induzierten Arthritis im Mausmodel (CIA) und die Kollagen spezifischen Antikörper IgG1 und IgG2 gehemmt (Utku, N. et al. 2006).

Auf Grund dieser Untersuchungen ist anzunehmen, dass TIRC7 eine entscheidende Rolle in der T-Zell-Aktivierung und damit in der Immunregulation besitzt. Es ist nach bisherigem Wissensstand ein negativ regulatorisches Zelloberflächenmolekül, welches in T-und B-Zellen exprimiert ist.

2. Zielstellung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass TIRC7 ein funktionell wichtiges Molekül in der T-Zell-Aktivierung darstellt. Aufgabe dieser Arbeit war die Sammlung weiterer Daten, um eine genauere Aussage zu Wirkmechanismen und möglichen Nutzen als diagnostischer Marker für die Humanmedizin treffen zu können.

Eine dieser Aufgaben und Inhalt dieser Arbeit war die weiterführende funktionelle Charakterisierung der hergestellten polyklonalen und monoklonalen Antikörper gegen TIRC7. Dazu wurden verschiedene Stimulationsversuche mit unterschiedlichen Substanzen (PHA, MLC, Recall-AG) durchgeführt und der Einfluss der Anti-TIRC7-AK untersucht.

Von besonderem Interesse war dabei der Antikörpereinfluss von TIRC7 in stimulierten Gedächtniszellen, da Voruntersuchungen durch FACS-Analysen gezeigt hatten, dass TIRC7 insbesondere auf Gedächtniszellen in PBL induziert war (Winter, M. Promotionsarbeit).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die in den Vorarbeiten nachgewiesene Gewebeverteilung mittels Northern- und Western-Blot in pathologisch veränderten Zellen wie beispielsweise in Tumorzellen, TIRC7 ebenfalls nachweisbar sei und welchen Einfluss die Antikörper auf die Proliferation der Tumorzellen haben.

Zusammenfassend sollte diese Arbeit dazu beitragen, die Expression von TIRC7 im Hinblick auf einen möglichen diagnostischen Einsatz sowie die anti-TIRC7-Antikörperwirkung als therapeutischer Einsatz insbesondere bei Tumoren zu analysieren .

3. Material und Methoden

3.1 Lösungen

FACS Puffer	PBS Puffer + 0,1% Natriumazid + 2% FKS
PBS Puffer	1,4 M NaCl / 2,7mM KCl / 8,0 mM Na ₂ HPO ₄ / 1,5 mM KH ₂ PO ₄
TAE Puffer (50 x)	242g Tris-Base /100ml 0,5 M EDTA / 57,1 ml Eisessigsäure /Aqua dest. ad 1000 ml
MOPS Puffer (10%)	20,93g MOPS / 3,402g NaOAc / 10ml EDTA(0,5M) / Aqua dest. ad 500ml / pH 7.0
SSC (20 x)	3 M NaCl / 0,3 M NaCitrat, / pH 7.0
LB Medium	0,75% NaCl / 1% Bacto-Trypton / 0,5% Hefeextrakt

3.2 Chemikalien

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Agar	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bafilomycin	
Baktotrypton	DIFCO, Detroit (USA)
Chloroform	Merck, Darmstadt
ConA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CFDA-SE(carboxyfluoreszeindiacetat succinimidyl ester)	(Mo Bi Tec, Göttingen, BRD)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
[α - ³² P]-dCTP	Amersham Buchler, Braunschweig
DNA-Marker 1kb	Gibco BRL, Eggenstein
dNTP	Pharmacia LKB-Biotechnology, Freiburg
DTT (Dithiothreitol)	Gibco BRL, Eggenstein

Ethidiumbromid	Stratagene, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
EDTA	Serva-Feinbiochemika, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ficoll-Paque	Pharmacia Biotech, Freiburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Glutamin	Seromed, Berlin
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Heringssperma-DNA	Boehringer, Mannheim
Hybridisierungslösung (Quick Hyb)	Stratagene, Heidelberg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ 15mM (PCR)	Promega, Madison (USA)
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
PCR Puffer (10x)	Perkin Elmer, Branchburg (USA)
PBS (Mg, Ca, Endotoxin frei)	Gibco BRL, Eggenstein
PHA (Phytohämagglutinin)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Pertussis Toxin	Alexis, Lausen, Schweiz
Primer Oligo dT	Pharmacia LBK Biotechnology, Freiburg
Puffer OPA: Hind III, Eco RI	Gibco BRL, Eggenstein
ReverseTranskriptase	Gibco BRL, Eggenstein
RNA-Marker G319	Promega, Madison (USA)
RNase-Inhibitor	Serva-Feinbiochemika, Heidelberg
RT-Puffer	Gibco BRL, Eggenstein
RPMI 1640 Kulturmedium	Seromed, Berlin
Taq-Polymerase	Perkin Elmer, Branchburg (USA)
TIRC7 Peptide	Genpat77 Pharmacogenetics AG
[³ H]-Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Trypanblau	Gibco BRL, Eggenstein
x-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

3.3 Geräte

Autoradiographiekassette	Amersham Buchler, Braunschweig
Analysenwaage SBC 31	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Brutschrank IG 150	Jouan, Saint Nazaire (F)
Zell-Harvester	Inotech, Basel (CH)
β-Counter Trace 96	Inotech, Basel (CH)
Elektrophoresekammer Easy Cast B2	AGS, Heidelberg
Feinwaage SBC 53	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Gel Imager	Herolab, Wiesloch
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Berlin
Homogenisator Potter S	B.Braun Biotech International, Melsungen
Hybridisierungsöfen	GFL, Burgwedel
Kalkulator RNA/DNA Gene Quant II	Pharmacia, Upsalla
Kryo Behälter	Cryoson GmbH, Schöllkrippen
Kühlschrank	Liebherr
Laminar Flow Box (BS 5726)	Cotech, Berlin
Magnetrührer	H&P Labortechnik, München
Mikroskop (BH 2)	Olympus, Berlin
Mikrowelle (Mikromat)	AEG, Berlin
pH Meter	Schmidt Laborbedarf, Berlin
Schüttelinkubator Scientific innova 3240	New Brunswick, Edison (USA)
Schüttler (Vortexer VF2)	Jahnke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
Speed Vac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterilwerkbank Steril Gard Calss II A1/V37	Sanford (USA)
Stromversorgungsgerät Concorc 835	AGS, Heidelberg
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Norewalk (USA)
Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Norewalk (USA)
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühltruhe QBF 1490 V14	Queue Systems, Asheville (USA)
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Bosch
Transilluminator TMV –20	San Gabriel, CA (USA)
Videoprinter	Mitsubishi, Tokyo (Japan)

Wasserbad GFL 1038	GFL Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen:	
<i>Biofuge pico</i>	<i>Hereus, Hanau</i>
<i>Universal 32</i>	<i>Hettich, Tuttlingen</i>
<i>Megafuge 1.0</i>	<i>Hereus, Osterode</i>

3.4 Kits

DNA-Markierungssystem (Rediprime)	Amersham Buchler, Braunschweig
DynalBeads	Dynal, Hamburg
JETsorb Gel-Extraktionskit	Genomed, Bad Oeynhausen
JETstar Plasmid Midiprep Kit/50	Genomed, Bad Oeynhausen
RNAzol B	Tel-Test, Inc., Friendswood, USA

3.5 Verbrauchsmaterialien

3MM Whatman Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
96 Well Rundboden Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten	Clontech, Berlin
FACSort-Durchflußzytometer	Becton Dickinson
Frischhaltefolie	
Filterpapier –96 für Cell Harvester	Packard, Meriden (USA)
Gewebekulturflaschen (50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Nylon Membran Hybond N	Amersham Buchler, Braunschweig
Neubauer Zählkammer	Fein Optik, Bad Blankenburg
Objektträger	Neolab, Heidelberg
Pasteur Pipetten	Schmidt Laborbedarf, Berlin
Petrischalen (d=16 cm)	Clontech, Berlin
Pipetten und Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen, Eppendorf safe lock (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen, Falcon (50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Röhrchen, Gewebekultur (10ml)	Greiner, Nürtingen

Röhrchen, Kryo (2ml)	Clotech, Berlin
Röntgenfilm Hybond MP	Amersham Buchler, Braunschweig
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Chalon (F)

3.6 Antikörper

Anti-CD3-APC	BD, N.J., USA)
Polyklonale TIRC7 Antikörper (Rabbit)	Genpat77 Pharmacogenetics AG
Monoklonale TIRC7 Antikörper (Maus)	Genpat77 Pharmacogenetics AG

3.7 Computersoftware

MS Word für Windows 2000	Microsoft Corporation, USA
Corel Photopaint	Corel Corporatopn, USA
Cell-QuestTM	Becton Dickinson, USA
Excel 2000	Microsoft Corporation, USA

3.8 Zellen

Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut gesunder humaner Spender (PBL).

Des weiteren wurden Zellenlinien aus der Pathologie der Charité Berlin verwendet, die von Patienten stammten, die an malignen Tumoren erkrankt waren. Drei kutane Lymphomzelllinien wurden von der Dermatologie der Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Zelllinien stammen von ATCC (USA).

3.8.1 Zelllinien

Tabelle1: Übersicht der Zelllinien

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft
Jurkat E6-1	T-Zell-Leukämie (T-Lymphozyt) Human	ATCC (USA)
MOLT-4	T-Zell-Leukämie (T-Lymphoblast) Human	ATCC (USA)
CCRF-CEM	Akute Lymphoblasten- Leukämie (T-Lymphoblast) Human	ATCC (USA)
CCRF-SB	Akute Lymphoblasten-	ATCC (USA)

	Leukämie (T-Lymphoblast) Human	
HPB-ALL	T-Zell-Leukämie Human	ATCC (USA)
SUP-T1	Lymphoblasten-Leukämie Human	ATCC (USA)
NCI-BL2171	Lymphoblasten-Leukämie Human	ATCC (USA)
U-937	Monozytäres Lymphom Human	ATCC (USA)
HL-60	Akute promyeloblastische Leukämie/ Human	ATCC (USA)
Raji	Burkitt Lymphom Human	ATCC (USA)
RL	Non-Hodgkin-Lymphom Human	ATCC (USA)
Colo 201	Colorektales Adenokarzinom Human	ATCC (USA)
AsPC-1	Adenokarzinom des Pankreas Human	ATCC (USA)
C-33 A	Cervixkarzinom Human	ATCC (USA)
SK-HEP-1	Adenokarzinom der Leber Human	ATCC (USA)
SeAx	kutanes Lymphom (Sézary Syndrom) Human	Dermatologie (Charité Berlin)
SeTep	kutanes Lymphom (Sézary Syndrom) Human	Dermatologie (Charité Berlin)
MyLa	kutanes Lymphom (Mykoisis fungoides) Human	Dermatologie (Charité Berlin)
HAT 29 P	Colon Karzinom Human	Pathologie der Charité Berlin

257/85 P, P499	Magen Karzinom Human	Pathologie der Charité Berlin
D181/85 P219	Pancreas Karzinom Human	Pathologie der Charité Berlin
P33 54/97	Bronchial Karzinom Human	Pathologie der Charité Berlin
D43/86 P, P47	Nebennieren Karzinom Human	Pathologie der Charité Berlin

3.9 Isolation von peripheren mononuklearen Zellen im Blut (PBL)

Blut von gesunden Spendern wurden in 10 ml Spritzen aufgezogen und dabei mit dem in der Spritze befindlichen Natriumzitrat vermischt. Natriumzitrat dient dabei der Hemmung der Blutgerinnung. Alternativ wurde auch bereits präparierter Buffy coat verwendet. Aus dem so gewonnenen Blut wurden mittels FicollPaque-Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen isoliert. 10ml des Zitratblutes wurde mit PBS 1:2 verdünnt. Anschließend wurden 3 ml Ficoll in Gewebekulturröhrchen gefüllt und mit 10 ml des Zitratblut-PBS-Gemisches vorsichtig überschichtet und 40 Minuten mit 1500 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der an der Phasengrenze gebildete Ring enthält B- und T-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen, minimal Granulozyten, sowie Thrombozyten. Über dem Ring befindet sich das Plasma, unter dem Ring das Erythrozyten/Granulozytengemisch. Der Ring wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen („geerntet“). Die so gewonnenen Zellen wurden zum Waschen in ein 50 ml Röhrchen gegeben und PBS auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation 10 Minuten mit 1100 U/min bei Raumtemperatur. Dabei wurden vor allem Verunreinigungen beseitigt, die durch den Ficoll-Anteil entstanden sind. Der Überstand wurde abgekippt und durch kräftiges Aufschütteln das gebildeten Pellet resuspendiert. In einem zweiten Waschschrift wurde bei 1000U/min und Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert, wodurch zusätzlich Thrombozyten abgetrennt werden. Anschließend erfolgte das vorsichtige Abkippen des Überstandes und nachfolgendes Aufschütteln des Pellets.

3.10 Kultivierung von Zellen

Die unter Punkt 3.9 gewonnenen Zellen wurden in Kulturmedium RPMI 1640 aufgenommen. Aus 10 ml Blut konnten ungefähr 1×10^7 Zellen PBL isoliert werden.

Dem Kulturmedium wurden zusätzlich 10% FKS + 2 mM Glutamin 0 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt. Um eine entsprechende Zelldichte zu erreichen, empfahl es sich, 1×10^6 Zellen in 1 ml Medium aufzunehmen und dann in einer entsprechend großen Kulturflasche im Brutschrank aufzubewahren. Der Brutschrank sollte 37°C sowie eine CO₂ Konzentration von 5% haben. Je nach Zielstellung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Zytokinen stimuliert.

3.11 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

Die in Punkt 3.9 isolierten Zellen von verschiedenen gesunden Probanden (Spender und Empfänger) wurden wie unter Punkt 3.10 angegeben in ein Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden je nach Fragestellung die Zellen des Spenders mit 30 Gray radioaktiv inaktiviert. Gleiche Anteile von Spender und Empfänger (Konzentration je 1×10^6 Zellen/ml) wurden in den Wells einer 96-Well-Rundboden-Mikrotiterplatte kultiviert und für 4 Tage bei 37°C in einer 5%igen CO_2 Atmosphäre inkubiert.

3.12 RNA Isolation.

Die gesamte Isolation von RNA erfolgte auf Eis. Das PBL-Zellpellet wurde in 0,2 ml RNAzol B pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Dadurch wurden die Zellen lysiert und die RNA war durch einen RNase Inhibitor sofort geschützt. Auf 2 ml Homogenisat wurden 0,2 ml Chloroform gegeben, durch Schütteln gut durchmischt und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde für 15 Minuten bei $12000 \times g$ zentrifugiert, wodurch sich zwei Phasen bildeten. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, während DNA und Proteine in der organischen und Interphase vorlagen. Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol für 30 Minuten bei 4°C die RNA gefällt. Durch eine Zentrifugation bei $12000 \times g$ für 15 Minuten bei 4°C wurde sie pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 75%igem Ethanol gewaschen und bei $7500 \times g$ für 8 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet kurz unter Vakuum 1-2 Minuten in der SpeedVac getrocknet und in 20 μl DEPC-behandeltem H_2O aufgenommen. Die RNA wurde bei -70°C gelagert. Die Konzentration wurde mittels GeneQuant Spektrometer anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und die Reinheit durch das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm bestimmt. Zusätzlich wurde eine Probe der RNA auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel auf Degradierung überprüft. Dazu wurde die Proben nach einem Zusatz von Ethidiumbromid 1h bei 120V aufgetrennt. Zwei scharf vom Hintergrund abgrenzbare 18-S- und 28-S-Banden waren das Maß für eine gute Qualität.

3.13 Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.

Nukleinsäuren liegen im alkalischen und schwach sauren pH-Bereich als Polyanion vor. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können sie daher nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Bei der Agarosegelelektrophorese bewegen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente in dem elektrischen Feld durch das Agarosegel zum positiven Pol. Dabei besteht ein proportionales Verhältnis zwischen dem Molekulargewichte der Fragmente und der Wanderungsgeschwindigkeit. Der Proportionalitätsbereich kann durch die Wahl der Porengröße, das heißt der Agarosekonzentration des Gels, beeinflusst werden. Für größere Fragmente als 1kb wurden Gelkonzentration zwischen 1,2% und 2%, für kleinere zwischen 0,8% und 1,2% gewählt. Die Agarose wurde in 1xTAE in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 20µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA Proben werden mit 1/5 Probenpuffer versetzt und in die Taschen des erkalteten polymerisierten Gels pipettiert. In einer horizontalen Gelelektrophoresekammer mit 1xTAE als Laufpuffer wurde die DNA bei einer Spannung von 5-10V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Als Größenstandards wurde 500ng der 1kb DNA-bzw. 100bpRNA- Leiter eingesetzt. Durch den Einbau des lumineszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid in die DNA/RNA, konnte diese anhand eines Transilluminators sichtbar gemacht werden. Mittels des Imaging-System und des Computersoftwareprogramms konnten die Mengen der zu analysierenden DNA im Verhältnis zu den Größenstandards errechnet werden.

3.14 Northern –Blot

Lösungen (RNase frei):

MOPS-Lösg. 10 %:(20,9g MOPS; 3,4g NaAc 10ml EDTA in 500ml Aqua dest.,
0.2M MOPS 50mM Na-Acetat pH8,8; 10mM EDTA pH 8,0)

Formaldehydgellaufpuffer (MOPS-Lösg. 1%)

Formaldehydgel (2% Agarose, 1x MOPS, Formaldehyd 37%)

20x SSC pH 7,0 (3M NaCl,0,3Mna-Citrat, in DEPC- H₂O lösen)

DEPC- H₂O (Diethyl Pyrocarbonat)

Ladepuffer (15µl Formamid, 3µl MOPS, 5µl Formaldehyd, 0,8µl Ethidiumbromid)

Die nach dieser (in Punkt 3.12 beschriebenen) Qualitäts- und Quantitätsprüfung ausgesuchten RNA-Proben wurden in gleichem Verhältnis auf ein 1% Formaldehydagarosegel aufgetragen. Die Proben wurden zuvor mit 23,8 µl Ladepuffer versetzt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert anschließend kurz auf Eis gelagert. Die Gellaufzeit betrug 2h bei 90 V. Als Vergleichstandard wurden 3 µg RNA-Marker aufgetragen. Zur Vorbereitung des Blottens wurde eine Nylon-Hybrid Membran in Gelgröße ausgeschnitten und 10 Minuten in 20x SSC eingeweicht. Ebenso wurde 3mm starkes Whatmanpapier mit 20x SSC befeuchtet. Unter Zuhilfenahme einer Wanne und einer Glasplatte, schichtete man das Gel luftblasenfrei umgekehrt auf das in 20x SSC getränkte 3 mm Whatman-Papier. Darauf folgte ebenfalls luftblasenfrei die Nylon-Hybrid-Membran, die anschließend mit einem Parafinring nach außen abgedichtet wurde, wiederum gefolgt von 3 mm Whatman-Papier. Darüber wurden Papiersaugtücher zu einer Höhe von ca. 10 cm aufgeschichtet und die Anordnung zum Transfer gleichmäßig beschwert. Nach ca. 24 h legte man die Nylonmembran für 5 Minuten in 20x SSC. Das Crosslinking erfolgte anschließend unter einem UV-Stratalinker.

3.15 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur Herstellung radioaktiv-markierter doppelsträngiger DNA- Fragmente wurde das Rediprime-Labeling-System von Amersham Buchler verwendet. Zuerst löste man 50 ng der Sonden-DNA in 45 µl H₂O bei 95°C, um die Doppelstrangbindung zu lösen. Anschließend wurde der Reaktionsmix dazugegeben bestehend aus dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I , Zufallsprimern, dGTP, dCTP und dTTP. Danach wurden 5 µl [α -³²P]-dCTP zugegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Oligonukleotide lagerten sich an verschiedenen Stellen der denaturierten Einzelstrang DNA als Hybride an und verlängerten den zu syntetisierenden komplementären Strang bei gleichzeitigem Einbau von [α -³²P]-dCTP. Durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA wurde die Reaktion gestoppt. Nicht eingebaute [α -³²P]-dCTP wurden durch Gelfiltration über eine G-25-Sephadex-Säule (Quick Spin Column) abgetrennt. Die Säule wurde durch Zentrifugation bei 1100x g 4 Minuten abzentrifugiert. Das Eluat enthielt die gereinigte, markierte spezifische Sonde.

3.16 Hybridisierung von Northern Blots

Zur Prähybridisierung wurde die Nylon Hybond Membran mit 150µl /cm² Quick Hyb-Hybridisierungslösung für 2 h bei 65°C im Rotationsinkubator inkubiert. Die markierte Sonde wurde in einer Menge verwendet, die 25000 cpm entsprach und mit 100 µl Lachssperma bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und in die Hybridisierungslösung gegeben. Das Lachssperma verhinderte dabei die unspezifische Bindung der Sonde während der Inkubation über 12 h bei 65°C. Danach wurde der Blot mit Waschlösung I (2x SSC ; 0,1%SDS) 2x gespült. Unter Benutzung von Waschlösung II (0,1x SSC; 0,1%SDS) näherte man sich der Hybridisierungstemperatur (beginnend bei 58°C) mit Waschschritten von 10 Minuten, bis nur noch spezifische Bindungen verblieben. Um das Signal sichtbar zu machen, exponierte man die Membran bei -70°C für 2-3 Tage (je nach Stärke der Restradioaktivität) auf einem Kodak X-ray Film.

3.17 cDNA-Synthese.

1 µg der RNA wurden auf ein Endvolumen von 20µl mit DEPC behandeltem H₂O eingestellt und nach Zugabe von 0,1 mg/ml Oligo-dT-Primer für 5 Minuten auf 85°C erhitzt, um die RNA vollständig zu denaturieren. Danach wurde sie unverzüglich auf Eis überführt. Nachfolgend wurde ein cDNA-Synthese-Ansatz („Mastermix“) vorbereitet.

cDNA-Mastermix:	5x RT-Puffer	4µl
	dNTPs (2,5mM)	4µl
	Oligo dT Primer	2µl
	DTT (0,1M)	4µl
	RNAsin	1µl
	DNase I	1µl

Eine Inkubation für 30 min bei 37°C gewährleistete den DNase Verdau. Anschließend wurde die DNase für 5 min bei 75°C inaktiviert.

Nach erneuter Zugabe von RNAsin und Reverser Transkriptase erfolgte bei 42°C für eine Stunde die cDNA-Synthese. Durch Erhitzen für 5 Minuten auf 95°C werden Enzymreste abschließend inaktiviert. Die cDNA wurde anschließend sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.18 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur in vitro-Amplifikation größerer Mengen spezifischer DNA-Fragmente (Mullis et al. 1987). Die PCR basiert auf einer enzymatischen Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes, das durch zwei Oligonukleotide (Primer) flankiert wird, die nach Denaturierung mit je einem der „aufgeschmolzenen“ Einzelstränge der Targetsequenz an dessen 5`Ende hybridisieren. Die Primer sind mit ihren 3`Enden einander zugewandt. Wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung der DNA-Fragmente, spezifische Bindung der Primer an die Komplementärsequenz („Annealing“) und von den Primern ausgehende Synthese der DNA mittels der DNA Polymerase („Elongation“) führt zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Jedes Syntheseprodukt des einen Primers dient dabei dem anderen Primer als Target, was theoretisch zur Verdoppelung der DNA Fragmente nach jedem Zyklus führt.

Um die PCR erfolgreich durchführen zu können, müssen einige Faktoren beachtet werden. Neben der richtigen Primerauswahl, dem Zustand der DNA-Matrize, dem pH-Wert des Reaktionsgemisches, der Wahl der optimalen Temperaturen für die einzelnen Schritte jedes Zyklus und die Anzahl der Zyklen, gilt es vor allem die Kontamination durch winzigste Mengen bereits amplifizierter DNA zu vermeiden.

Um die Expression von mRNA zu untersuchen wird eine Reverse Transkriptase PCR (RT PCR) durchgeführt. Dabei wird die zuvor isolierte mRNA mittels der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese komplementäre cDNA ist das Ausgangsmaterial für die anschließende PCR, und lässt direkte Rückschlüsse auf die Expression der mRNA des Untersuchungsmaterials zu.

Zur Aufdeckung evtl. aufgetretener Verunreinigungen wurden bei jeder PCR eine negativ-Kontrollansatz mitgeführt.

3.18.1 Primerauswahl

Die Auswahl der PCR Primer orientierte sich an der Sequenz der cDNA von TIRC7. Es wurden Primer mit ähnlicher Hybridisierungstemperatur und geringer Komplementarität untereinander ausgewählt.

Primer	Sequenz
C7 5' Hind	CCT CAA GCT TGC CGC TAC CAG GAG GTC AAC GCA TGC CAC GTA AGC GAA
C7 3' Eco	CCG AGA ATT CTC CAG CCC GAG GGG AAG ATG GAG ATC CAG CTG CCA G

3.18.2 Durchführung der PCR

Es wurde ein Ansatzvolumen von 25µl je Probe gewählt.

10x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	2,0 µl
dNTP Mix (0,2 mM)	0,5 µl
Taq Polymerase (1U)	0,25µl
Wasser	16,75µl
Primer(S+A;400 nM) je	1,0µl

Diese Komponenten wurden zu einem „Mastermix“ zusammenpipetiert, wobei die Taq-Polymerase als letzte dazugegeben wurde. Die unterschiedlichen cDNAs wurden am Ende hinzugefügt.

Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle der cDNA Wasser enthielt.

Die Reaktion wurde in einem Termocycler 2400 durchgeführt.

TIRC 7: initiale Denaturierung für 5 min. bei 94°C, in 30 Cyclen wurde anschließend 30 sec. bei 94°C denaturiert, 30 sec. bei 60°C die Primeranlagerung (Annealing) und anschließend 30 sec. bei 72°C die Primer komplementär zum Matrizenstrang durch die Taq-Polymerase verlängert (Elongation). Abschließend erfolgte durch eine Temperatur von 72°C für 7 min. die Extension.

3.19 BrdU-Assay

BrdU-Labeling-Lösung wurde im Verhältnis 1:100 mit sterilem Kulturmedium verdünnt (100 µM) (2MI auf 200MI für 20 wells)

Anschließend wurden die Zellen des Anti-Sense-Proliferationstestes für 48h, 72h und 96h in 96-well Platten (Rundboden) bei 37 °C inkubiert (20 000 Zellen in 100 µl), danach mit 10 µl der frisch angesetzten BrdU-Labeling-Lösung pro well gelabelt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für weitere 20 h bei 37°C mit nachfolgender Zentrifugation der Platte für 10 min bei 1500 rpm und Abgießen der Überstände.

Es erfolgte nun eine Trocknung der Zellen für 1h bei 60°C. Im Anschluss wurde je Well 200 µl FixDenat hinzugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur belassen. Während dieser Zeit erfolgte der Ansatz der Anti-BrdU-POD Arbeitslösung. Dazu wurde anti-BrdU-POD-Stammlösung im Verhältnis 1:100 mit der AK-Verdünnungslösung gelöst.

Im weiteren Schritt erfolgte zunächst ein vorsichtiges Ausklopfen des FixDenat, anschließend wurde je Well 100 µl anti-BrdU-Arbeitslösung hinzugefügt und für 90 min bei Raumtemperatur belassen.

Danach erfolgte die Entfernung des AK-Konjugates und Ausspülung der Well 3x mit 200-300 µl Waschlösung pro Well und vorsichtiges Entfernen der Waschlösung durch Ausklopfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Substratlösung und Inkubation für 10 und 30 min bei Raumtemperatur.

Abschließend erfolgte die Messung nach jeweils 10 und 30 min im Elisa-Reader bei 370 nm (Referenzwellenlänge: 492 nm).

3.20 [³H]-Thymidin-Proliferationsassay

Die Zellproliferation nach in vitro-Stimulation kann durch Messung des Einbaus von [³H]-Thymidin (β –Strahlenemission) in die DNA sich teilender Zellen gemessen werden (Trebber GW, et al 1984).

PBL wurden stimuliert mit PHA (1µg/ml). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit unterschiedlichen TIRC7-AK-Konzentrationen (10 µl/well, 20 µl/well) in 96 well Mikrotiterplatten mit 100.000 Zellen/well auf ein Gesamtvolumen von 100 µl/well (Antikörper-Konzentration in der Stocklösung in PBS: 0,6-0,9 mg/ml) für 5 Tage bei 37°C, 5% CO² im Brutschrank. Nach 4 d Inkubationszeit wurde 1µCi [³H]-Thymidin (20 µl der [³H]-Thymidinarbeitslösung) pro Well hinzugegeben und es erfolgte eine erneute

Inkubation für 24 bei 37 °C, 5% CO². Im Anschluss erfolgte die Absaugung der Zellen mit Hilfe eines Zell-Harvesters auf eine Filtermembran. Diese wurde bei 65 °C für 30 min getrocknet. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels eines β -Counters. Die Menge der β -Strahlenemission korrelierte mit der Proliferationsrate (Messung in „counts per minutes“-cpm). Pro Messansatz wurden drei Messwerte erhoben und daraus der jeweilige Mittelwert gebildet.

3.21 Durchflußzytometrie

Prinzip: Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte monoklonale Antikörper binden an Antigene von Zellen. Wurden diese Zellen dann in den Strahlengang eines Lasers (FACSsort) gebracht, führte dies zu einer Aussendung eines charakteristischen Lichtes einer bestimmten Wellenlänge. Zusätzlich können Informationen über Granularität und Größe der Zellen gewonnen werden.

Es wurden PBL in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen / ml FACS-Puffer mit dem entsprechenden fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper (FITC/PE) 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, danach mit 1ml FACS Puffer gewaschen und im FACSsort gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem LYSIS II Software Paket.

3.21.1.CFDA-SE-Färbung (carboxyfluoreszein diacetat succinimidyl ester)

CFDA-SE ist ein unpolares Molekül, welches in der Lage ist, Zellmembranen spontan zu penetrieren. Intrazellulär konvertiert es durch eine Esterase zu anionischem CFSE. Ein Kopplung von CFSE an intrazelluläre Proteine führt zu einer Langzeitretention. Mittels Durchflußzytometrie kann die Fluoreszenz von CFSE dann gemessen werden.

PBL (Zellkonzentration 1×10^7 /ml RPMI 1640) wurden mit CFSE Arbeitslösung im Verhältnis 1:1 gemischt (CFSE Stockkonzentration 5mM, 1 ml CFSE Arbeitslösung (5 μ M): 1 μ l Stock plus 999 μ l PBS).

Während einer drei minütigen Inkubation erfolgte eine irreversible Kopplung des CFSE an zelluläre Proteine (Lysin). Anschließend wurde durch Zugabe volumengleicher Anteile RPMI-1640 (serumfrei, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) die Inkubation gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert für 10 min bei 1000 rpm, danach der Überstand abgegossen, erneut gewaschen mit 10 ml RPMI-1640 Medium. Anschließend Antikörpercoating in sterilen 5ml Polystyrene Round Bottom Tubes; 24 h bei 4 °C (Antikörperkonzentration 25 μ g/ml + 300 μ l PBS), danach waschen mit 5 ml PBS.

Die gefärbten Zellen wurden nunmehr stimuliert mit dem Recall AG Mix (RAG Mix) und/oder den gecoateten Anti-TIRC7 mAK.

RAG Mix (Gesamtvolumen in 2ml RPMI 1640) beinhaltet :

Tetanus (Merieux)	1: 100	20µl
Influenza (Begrivac)	1 :100	20µl
PPD	1:25	80µl
CMV (v.Baehr)	1:50	40µl
Candida (Alyostal)	1:100	20µl

Assay Mix (Gesamtzellkonzentration 1×10^6 Zellen in 500µl):

- 250µl Zellsuspension (4×10^6 Zellen/ml)
- 50µl RAG Mix
- 250µl RPMI, 5%AB Serum

Es erfolgte eine Inkubation für 6 Tage bei 37°C /5 % CO² im Brutschrank. Anschließend wurden die Platten mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm erfolgte das Dekantieren, anschließend Addition von 3 ml 2mM EDTA und erneute Inkubation für 10 min bei 37°C im Wasserbad. Nach einem weiteren Waschschrift mit Waschpuffer (Cell-Wash, BD) und Zentrifugation/Dekantierung wurden die Zellen mit entsprechenden farbstoffgekoppelten Antikörpern (1,5 µl CD3-APC (BD)) markiert (100 µl Gesamtvolumen für 30 min bei 4 °C im Dunkeln) und nach einem erneuten Waschschrift wurde die Proliferationsrate durchflusszytometrisch am FACS gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Funktionelle Charakterisierung polyklonaler TIRC7 Antikörper in der gemischten Lymphozytenkultur

Es wurden für die Untersuchung 14 polyklonale Kaninchen-Hyperimmunseren verwendet, die gegen 7, entsprechend der Aminosäuresequenz von TIRC7 ausgewählte und synthetisch hergestellte Peptide, gerichtet sind. Dadurch stand ein spezifisches Detektionssystem für TIRC7 auf Proteinebene zur Verfügung. (Utku, N. et al. 1998)

Abb.1

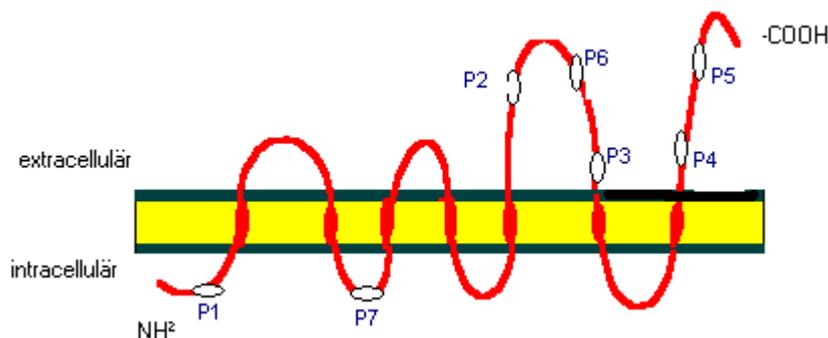


Abb.1: Hypothetisches Strukturmodell von TIRC7 mit Lokalisation der Peptidomänen gegen die entsprechende Antikörper generiert wurden. (NH²-N-Terminus; COOH- C-Terminus)

P 2 - AK 79/80

P 3 – AK 81/82

P 4 – AK 73/74

P 5 – AK 83/84

P 6 – AK 75/76

4.2 Auswahl funktioneller polyklonale Antikörper durch Untersuchung der Proliferationshemmung in allogenen stimulierten T-Lymphozyten mittels [³H]-Thymidin-Proliferationsassay

Die verschiedenen Antiseren wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (1:100 und 1:50) in der MLC eingesetzt wie im Methodenteil beschrieben. Dabei zeigte sich eine stärkere Hemmung der Proliferation in der MLC bei einer AK-Verdünnung von 1:50 im Vergleich zu einer AK-Verdünnung von 1:100 (Abb. 3).

Eine besonders starke Hemmwirkung der Zellproliferation wurde mit den AK 73 (Peptid 4), AK 76 (Peptid 6), AK 79 (Peptid 2) und AK 83 (Peptid 5) erreicht, die gegen extrazelluläre Epitope von TIRC7 gerichtet sind.

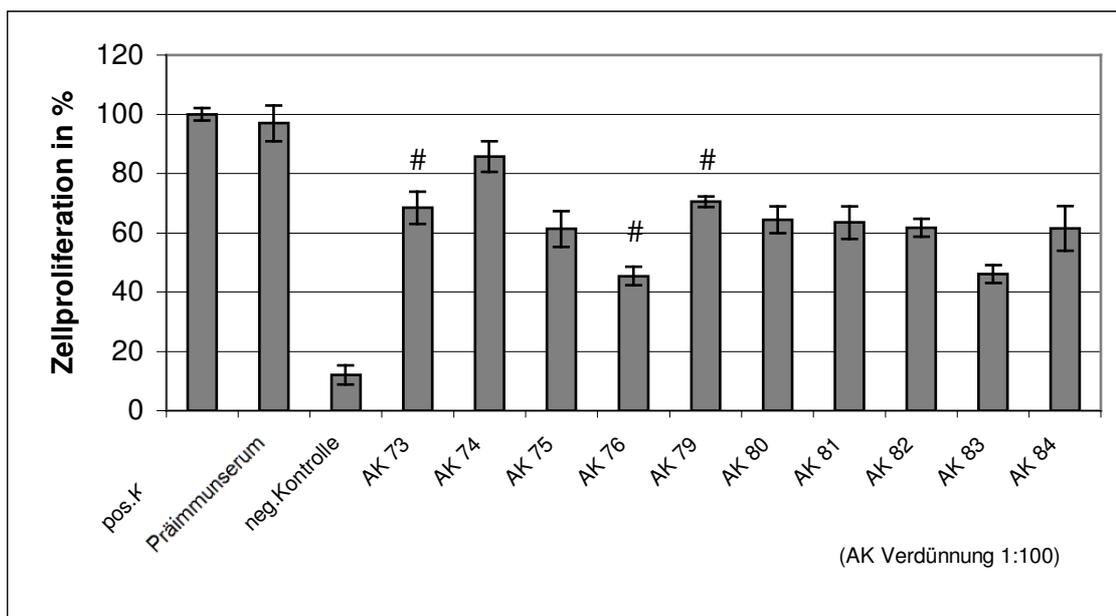


Abb 2: Polyklonale TIRC7-AK hemmen signifikant die Zellproliferation der MLC (AK-Verdünnung 1:100) Humane PBL (2×10^6 Zellen/ml) wurden 5 d im gleichen Verhältnis miteinander kultiviert. pos.Kontrolle =stimulierte Zellen-MLC, neg.Kontrolle =PBL bestrahlt. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen [³H]-Thymidinaufnahme als Maß für die Zellproliferation während der letzten 18 h der Kultur (n=3 in 3-facher Bestimmung; +/- Standardabweichung; #p<0,05 gegenüber der pos. Kontrolle).

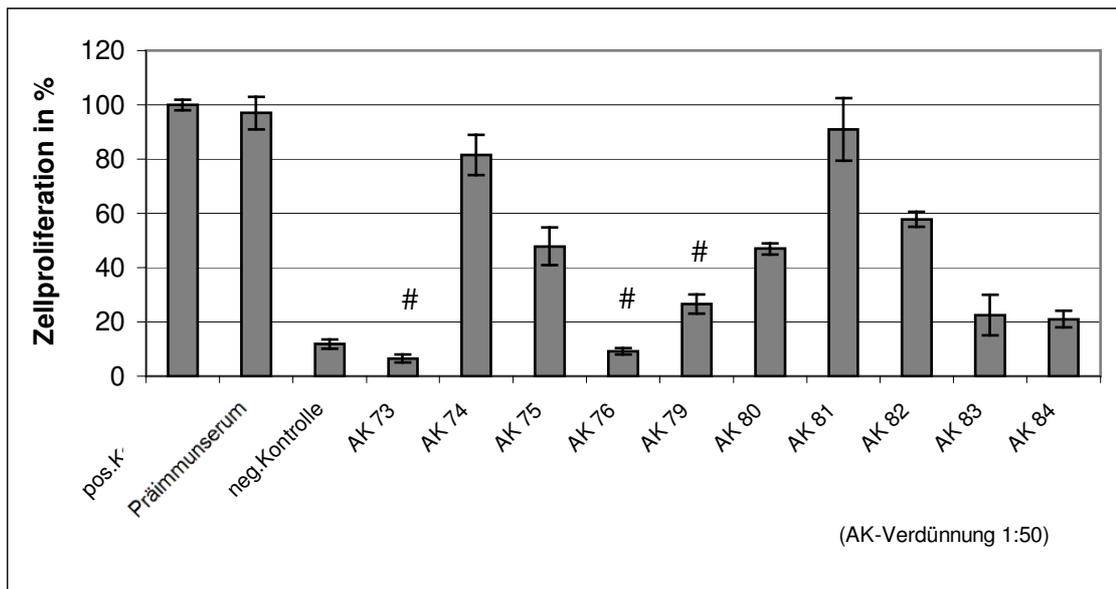


Abb.3: Polyklonale TIRC7-AK hemmen signifikant die Zellproliferation der MLC (AK-Verdünnung 1:50) Humane PBL (2×10^6 Zellen/ml) wurden 5 d im gleichen Verhältnis miteinander kultiviert. pos.Kontrolle =stimulierte Zellen-MLC, neg.Kontrolle =PBL bestrahlt.

Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen [3 H]-Thymidinaufnahme als Maß für die Zellproliferation während der letzten 18 h der Kultur (n=3 in 3-facher Bestimmung; +/- Standardabweichung; #p<0,05 gegenüber der pos. Kontrolle).

4.3 Reversibilität der proliferationshemmenden Wirkung der AK 73, 76, 79 durch die spezifischen Peptide 4, 6, 2

Entsprechend der Proliferationshemmstärke erfolgte eine Selektierung der AK für weitere funktionelle Studien. Um die Spezifität der AK zu demonstrieren, wurden die unterschiedlichen Peptidbereiche (AK 73 [Peptid 4], AK 76 [Peptid 6] und AK 79 [Peptid 2]) mit den Antikörpern inkubiert. Es zeigte sich nach Zugabe des spezifischen Peptids, dass die proliferationshemmende Wirkung der AK teilweise wieder rückgängig gemacht werden konnte. Bei schwächerer Verdünnung der AK (1:50) wurde eine bessere Reversierbarkeit der Proliferationshemmung als bei einer Verdünnung von 1:100 erzielt. (Abb. 5)

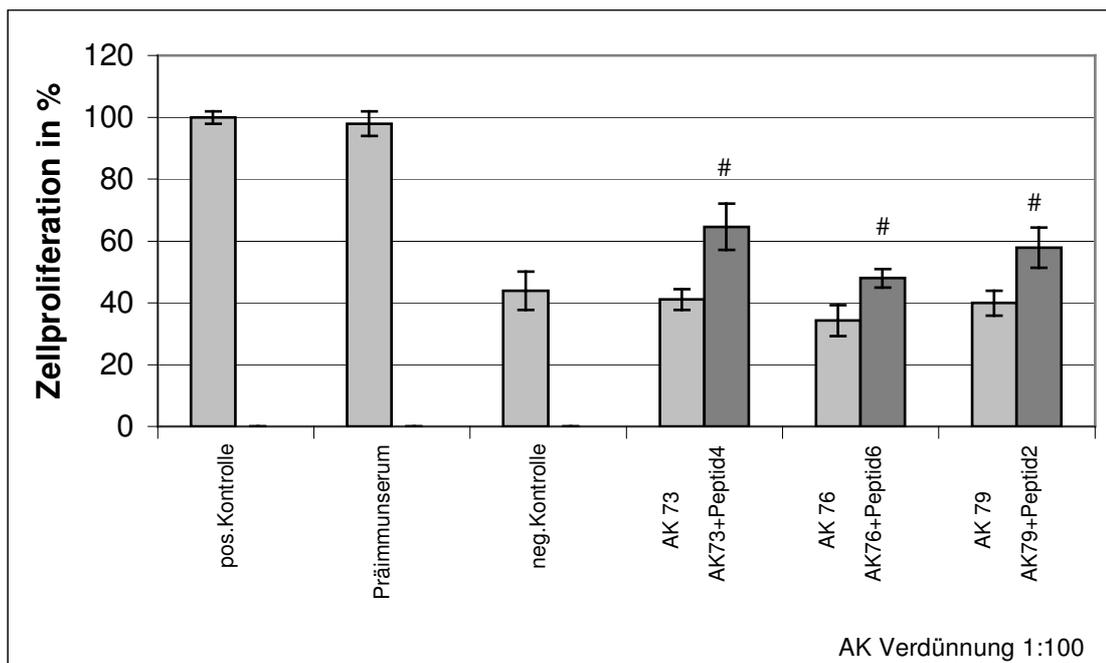


Abb.4: Polyklonale TIRC7-AK 73/ 76/ 79 hemmen die Zellproliferation der allogenen stimulierten T-Zellen (AK-Verdünnung 1:100). Nach Zugabe des entsprechenden Peptides P4 oder P6 oder P2 (Verdünnung 1:100) konnte diese Hemmung teilweise wieder rückgängig gemacht werden.

Humane PBL (2×10^6 Zellen/ml) wurden 5 d im gleichen Verhältnis miteinander kultiviert.

pos.Kontrolle =stimulierte Zellen-MLC, neg.Kontrolle =PBL bestrahlt.

Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen [^3H]-Thymidinaufnahme als Maß für die Zellproliferation während der letzten 18 h der Kultur (n=3 in 3-facher Bestimmung;

+/- Standardabweichung; #p<0,05 gegenüber der pos. Kontrolle).

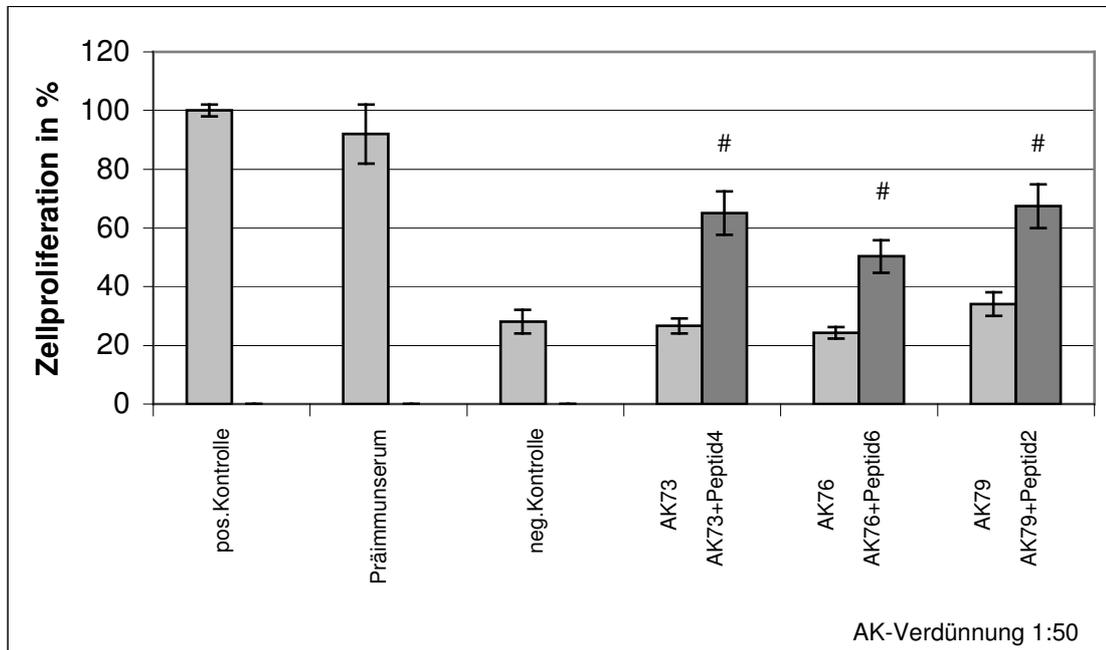


Abb.5: Polyklonale TIRC7-AK73/ 76/ 79 hemmen die Zellproliferation der allogenen stimulierten T-Zellen (AK-Verdünnung 1:50). Nach Zugabe des entsprechenden Peptides P4 oder P6 oder P2 (Verdünnung 1:50) konnte diese Hemmung teilweise wieder rückgängig gemacht werden. Humane PBL (2×10^6 Zellen/ml) wurden 5 d im gleichen Verhältnis miteinander kultiviert. pos.Kontrolle = stimulierte Zellen-MLC, neg.Kontrolle = PBL bestrahlt. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen [^3H]-Thymidinaufnahme als Maß für die Zellproliferation während der letzten 18 h der Kultur (n=3 in 3-facher Bestimmung; +/- Standardabweichung; #p<0,05 gegenüber der pos. Kontrolle).

4.4 Monoklonaler TIRC7–Antikörper 18 hemmt dosisabhängig die Proliferation der T- Memory-Zellen

Im Rahmen einer Promotionsarbeit von Angelika Schweizer wurden mehrere monoklonale Maus-Antikörper gegen TIRC7-Protein (Peptidbereich 4 und 6) hergestellt, und eine ähnliche proliferationshemmende Wirkung wie bei den polyklonalen Antikörpern nachgewiesen (Angelika Schweitzer, Dissertation 2002).

In Voruntersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass TIRC7 auf Gedächtniszellen exprimiert ist (Michael Winter, Dissertation 2003). In dieser Arbeit sollte daher die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss die monoklonalen TIRC7-AK auf die Proliferation der Gedächtniszellen haben.

Methodisch wurde am FACS die CFSE-Signalreduktion in PBL nach Recall–AG-Stimulation unter Einwirkung des anti-TIRC7 mAk18 bestimmt. Der Mix der verschiedenen Recall –AG (Tetanus, Influenza, CMV, Pertussis und Candida) soll dabei eine potentielle Immunantwort auslösen, da man davon ausgeht, dass eine Mehrzahl der Individuen bereits Antigenkontakt mit einem oder mehreren in dem Recall Mix enthaltenen Antigenen hatte und somit entsprechend zu aktivierende Gedächtniszellen vorhanden sind.

Im Ergebnis zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation der PBL in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration. (Abb.6)

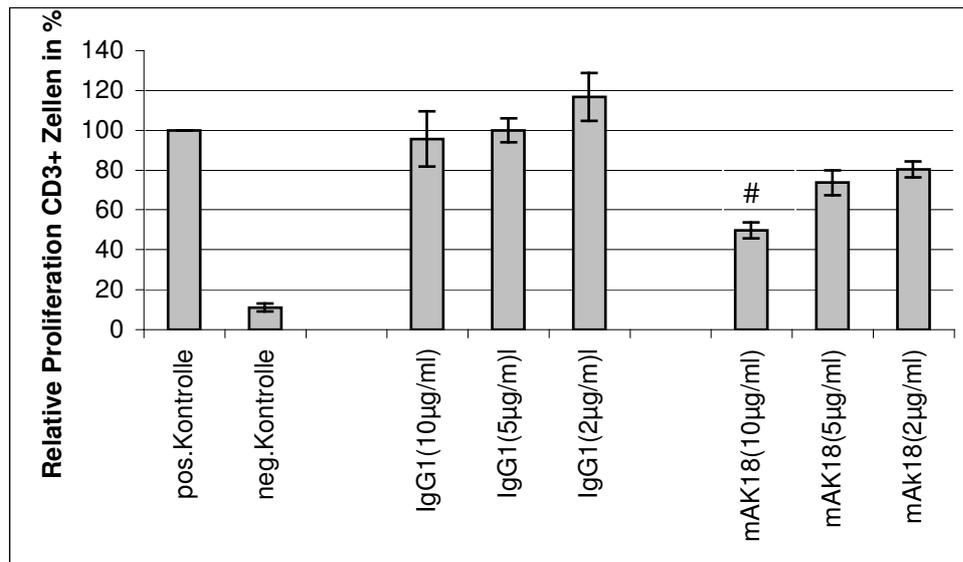


Abb.6: Hemmung der Proliferation der CD3+ Zellen nach Recall AG Stimulation von PBL durch anti-TIRC7 mAK 18 ist konzentrationsabhängig. pos.Kontrolle = stimulierte Zellen; neg.Kontrolle = unstimulierte Zellen. Gemessen wurde die CFSE Reduktion mittels FACS-Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Proliferation der CD3+Zellen +/- Standardabweichung (n=3); #p<0,05 gegenüber der pos. Kontrolle.

4.5 Nachweis von TIRC7 in verschiedenen Tumorzelllinien durch PCR

Die in den Vorarbeiten nachgewiesene TIRC7- Gewebeverteilung mittels Northern- und Western-Blot veranlassten dazu, der Frage nachzugehen, ob in pathologisch veränderten Zellen wie beispielsweise in Tumorzellen, TIRC7 nachweisbar sei.

Mit Hilfe der PCR konnte in den nachfolgend aufgeführten humanen Tumorzelllinien TIRC7 nachgewiesen werden. Es wurden 3 verschiedene kutane Lymphomzelllinien getestet, 12 hämatologisch/onkologische Zelllinien und 12 Zelllinien von soliden Gewebetumoren. (Tab.2 / Abbildungen 7-10)

Tabelle 2 : Übersicht der TIRC7 Expression in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (PCR)

Tumorzelllinien	Zellart/Erkrankung	TIRC7 mRNA Expression (PCR)
Jurkat	T-Zell-Leukämie	+
Molt 4	T-Zell-Leukämie	+
HPB-ALL	T-Zell-Leukämie	+
HL-60	Akute promyeloblastische Leukämie	+
K562	Chronisch myeloische Leukämie	+
NCI-BL2171	Lymphoblasten-Leukämie	+
CCRF-CEM	akute lymphoblastische Leukämie	+
CCRF-SB	akute lymphoblastische Leukämie	+
CRL 5969 /NCIBL 2171	akute lymphoblastische Leukämie	+
Sup-T1	lymphoblastische Leukämie	+
Raji	Lymphoblasten/ Burkitt Lymphom	+
RL	Non-Hodgkin-Lymphom	+
U-937	Monozytäres Lymphom	+
SeAx	kutanes Lymphom (Sézary Syndrom)	+
SeTep	kutanes Lymphom (Sézary Syndrom)	+
MyLa	kutanes Lymphom (Mykoisis fungoides)	+
Colo 201	Colorektales Adenokarzinom	+
C-33 A	Cervixkarzinom	+
SK-HEP-1	Adenokarzinom der Leber	+

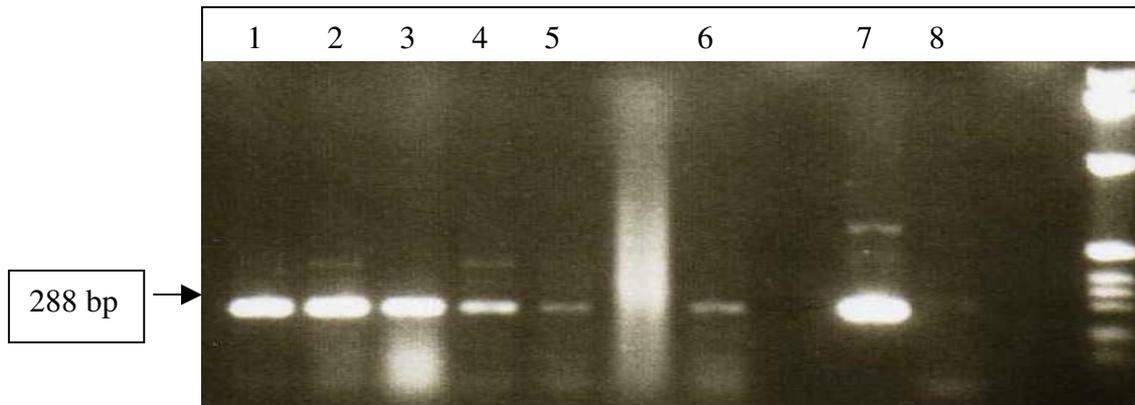


Abb.7: PCR zum Nachweis von TIRC7 in verschiedenen Tumorzelllinien

- 1- SeAx (Kutanes Lymphom)
- 2- SeTep (Kutanes Lymphom)
- 3- CCRF-CEM (Akute lymphoblastische Leukämie)
- 4- HBPAII (T-Zell-Leukämie)
- 5- Jurkat (T-Zell-Leukämie)
- 6- Molt4 (T-Zell-Leukämie)
- 7- Pos.Kontrolle c783
- 8- NaCl

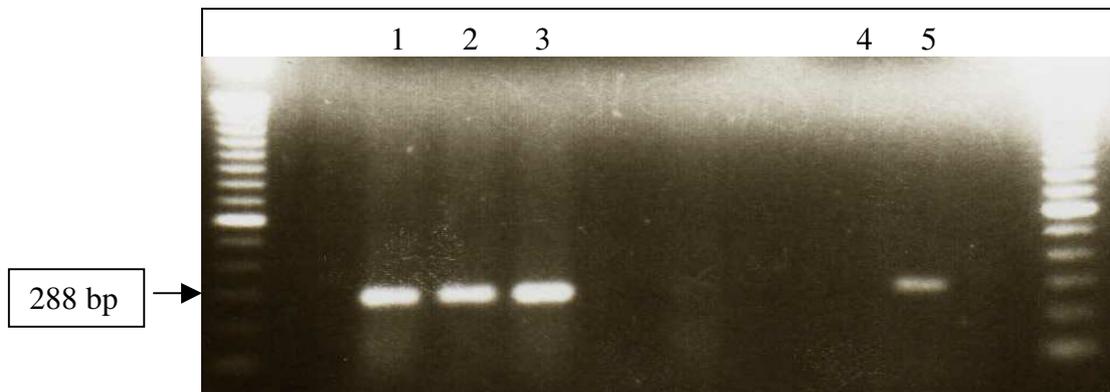


Abb.8: PCR mit Nachweis von TIRC7 in drei kutanen Lymphomzelllinien

- 1- SeAx (Kutanes Lymphom)
- 2- MyLA (Kutanes Lymphom)
- 3- SeTep (Kutanes Lymphom)
- 4- NaCl
- 5- Pos.Kontrolle c783

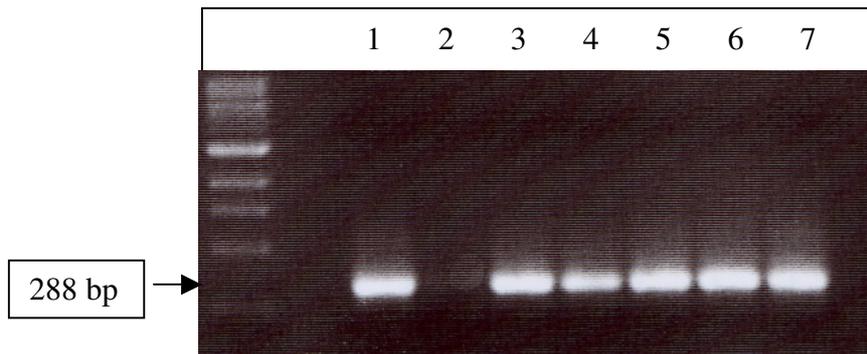


Abb.9: PCR mit Nachweis von TIRC7 in verschiedenen Tumorzelllinien

- 1- AsPC-1 (Pankreaskarzinom)
- 2- SUP-T1 (Lymphoblasten Leukämie)
- 3- K562 (Chronisch myeloische Leukämie)
- 4- CCRF-CEM (Akute lymphoblastische Leukämie)
- 5- U-937 (Monozytäre Leukämie)
- 6- HL-60 (Akute promyelozytäre Leukämie)
- 7- C-33 A (Cervixcarcinom)

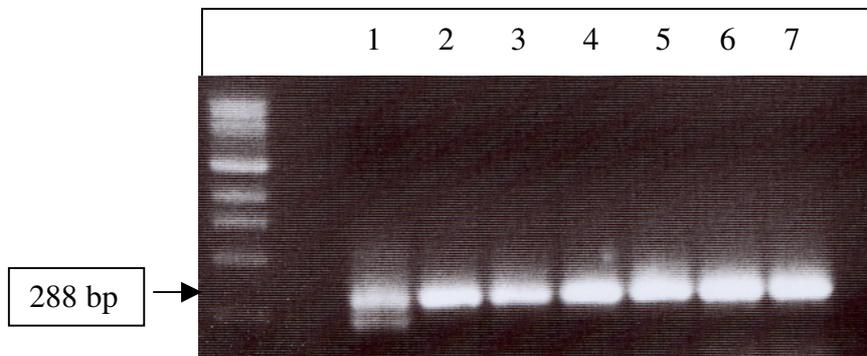


Abb.10: PCR zum Nachweis von TIRC7 in verschiedenen Tumorzelllinien

- 1- Colo 201 (Colorektales Adenokarzinom)
- 2- MIA PaCa-2 (Pankreaskarzinom)
- 3- Molt 4 (T-Zell-Leukämie)
- 4- CCRF-SB (Akute lymphoblastische Leukämie)
- 5- Jurkat (T-Zell-Leukämie)
- 6- Raji (Burkitt Lymphom)
- 7- RL (Non-Hodgkin Lymphom)

4.6 Nachweis von TIRC7-mRNA im Northern Blot in primären Tumorzelllinien

Aus der Pathologie der Charite wurden für die weitere Untersuchungen Zelllinien zur Verfügung gestellt, die aus malignen Primärtumoren verschiedener Patienten isoliert wurden. (Tabelle 3 / Abbildung 11)

Es konnte in allen Tumorzelllinien eine TIRC7-mRNA-Expression nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Übersicht der TIRC7 Expression in primären Tumorzelllinien (Northern Blot)

Tumorzelllinien	Zellart/Erkrankung	TIRC7 mRNA Expression (Northern Blot)
M M	Malignes Melanom Human	+
MCF-7- P122	Mamma Karzinom Human	+
HAT 29 P	Colon Karzinom Human	+
257/85 P, P499	Magen Karzinom Human	+
D181/85 P219	Pancreas Karzinom Human	+
P33 54/97	Bronchial Karzinom Human	+
D43/86 P, P47	Nebennieren Karzinom Human	+
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie	+ (nicht gezeigt)
Molt4	Humane T-Zell-Leukämie	+ (nicht gezeigt)
CCRF-CEM	Humane akute lymphoblastische Leukämie	+ (nicht gezeigt)
Se Ax	kutanes Lymphom (Sésary Syndrom) Human	+ (nicht gezeigt)
Se Tep	kutanes Lymphom (Sésary Syndrom) Human	+ (nicht gezeigt)

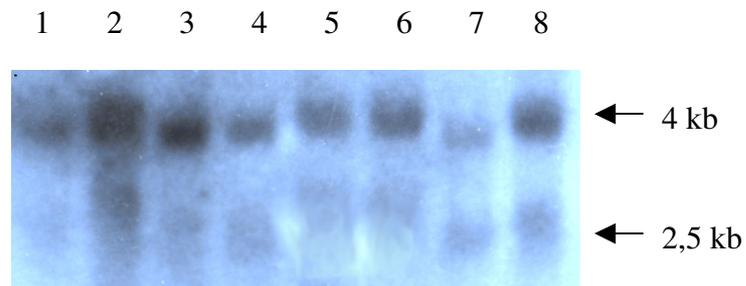


Abb.11: Northern-Blot mit Darstellung der Expression der TIRC7-mRNA in verschiedenen Tumorzelllinien

- 1- PBMC
- 2- Bronchial Karzinom
- 3- Malignes Melanom
- 4- Colon Karzinom
- 5- Magen Karzinom
- 6- Pankreas Karzinom
- 7- Mamma Karzinom
- 8- Nebennierenrinden Karzinom

4.7 Anti-TIRC7 mAK hemmen die Proliferation von Tumorzelllinien

Entsprechend der Voruntersuchung wurden verschiedene Tumorzelllinien ausgewählt, mit verschiedenen anti-TIRC7 mAK inkubiert. Im BrdU-Proliferationstest konnte bei drei der getesteten Zelllinien eine signifikante Hemmung der Proliferation nachgewiesen werden. (Tabelle 4 / Abbildungen 12-14)

Im [³H]-Thymidin-Test konnte bei 1 Zelllinie eine signifikante Proliferationshemmung nachgewiesen werden. (Tabelle 5 / Abbildung 15)

Tabelle 4 : Proliferationshemmung von Tumorzelllinien durch anti TIRC7 mAK (BrdU Test)

Tumorzelllinien	Zellart/Erkrankung	Proliferationshemmung BrdU-Proliferationstest
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie	+
Sup-T1	Humane lymphoblastische Leukämie	+
HPB-ALL	Humane T-Zell-Leukämie	+

Tabelle 5: Proliferationshemmung von Tumorzelllinien durch anti TIRC7 mAK ([³H]-Thymidin)

Tumorzelllinien	Zellart/Erkrankung	Proliferationshemmung [³ H]-Thymidintest
Raji	Humane Lymphoblasten/ Burkitt Lymphom	+

Jurkat + anti-TIRC7mAK 9,17

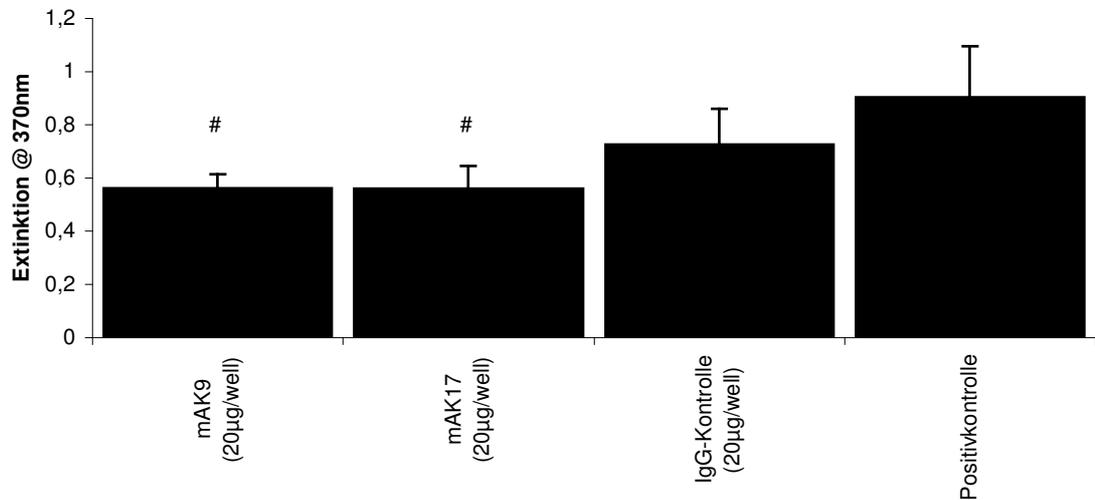


Abb 12: Jurkatzellen (T-Zell-Leukämie) zeigen eine signifikant verminderte Proliferation unter Einwirkung des anti-TIRC7 mAK 9 und 17
 Humane Tumorzelllinien (1×10^6 Zellen) wurden mit $200 \mu\text{g/ml}$ anti-TIRC7 mAK oder IgG Kontrolle 48 h inkubiert und anschließend die Zellproliferation mittels BrdU-ELISA gemessen.
 Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen;
 # $p < 0,05$ gegenüber der pos.Kontrolle.

HPB-ALL +anti-TIRC7 mAK 17

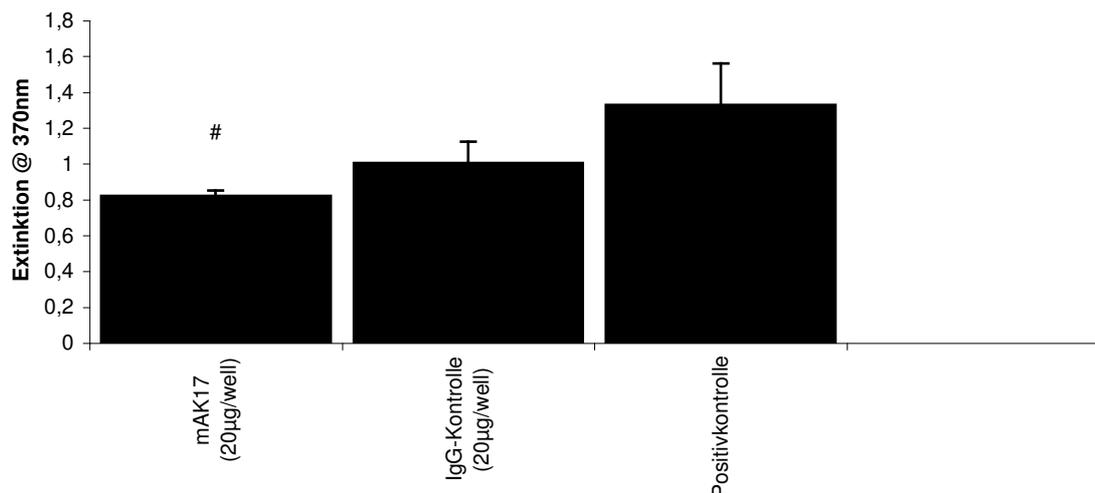


Abb 13: HPB-ALL-Zellen (T-Zell-Leukämie) zeigen eine signifikant verminderte Proliferation unter Einwirkung des anti-TIRC7 mAK 17
 Humane Tumorzelllinien (1×10^6 Zellen) wurden mit $200 \mu\text{g/ml}$ anti-TIRC7 mAK oder IgG Kontrolle 48 h inkubiert und anschließend die Zellproliferation mittels BrdU-ELISA gemessen.
 Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen;
 # $p < 0,05$ gegenüber der pos.Kontrolle.

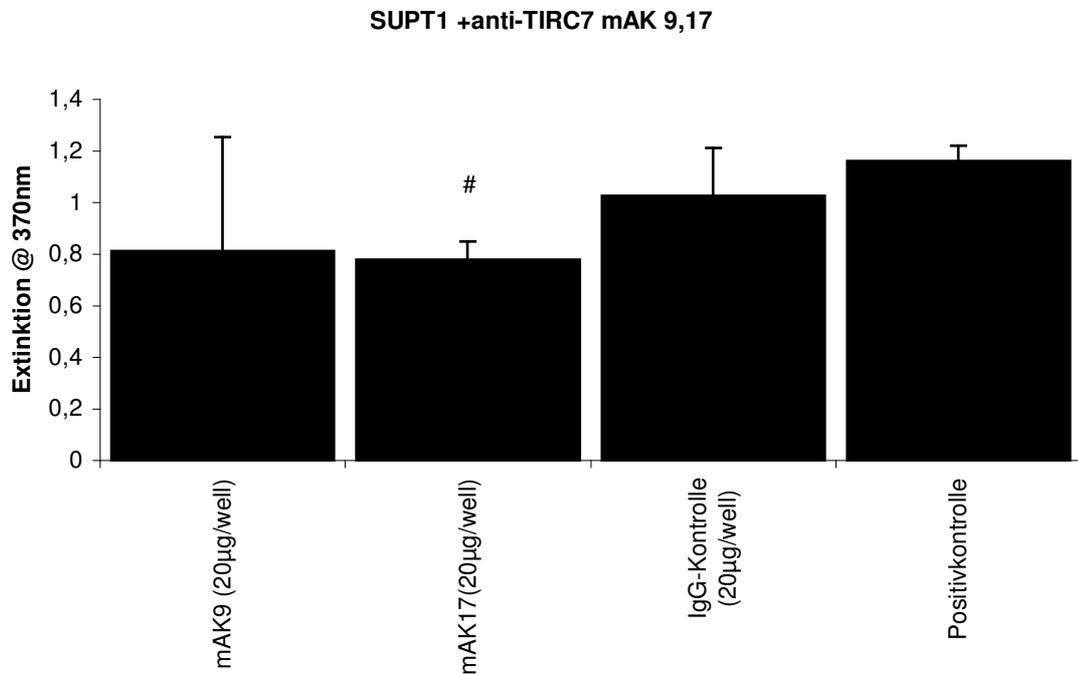


Abb 14: SUPT1-Zellen (T-Zell-Leukämie) zeigen eine signifikant verminderte Proliferation unter Einwirkung des anti-TIRC7 mAK 17 aber nicht signifikant unter mAK 9. Humane Tumorzelllinien (1×10^6 Zellen) wurden mit $200 \mu\text{g/ml}$ anti-TIRC7 mAK oder IgG Kontrolle 48 h inkubiert und anschließend die Zellproliferation mittels BrdU-ELISA gemessen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen; # $p < 0,05$ gegenüber der pos.Kontrolle.

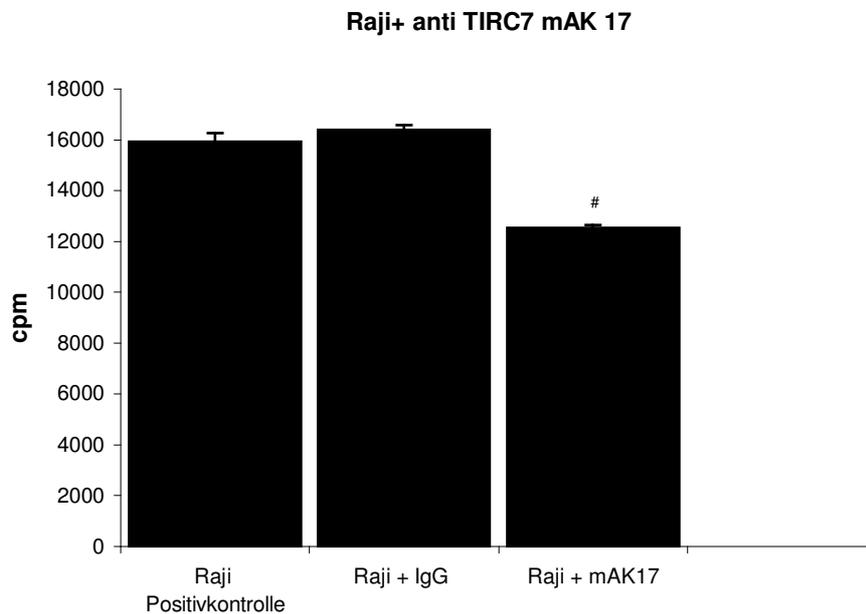


Abb 15: B-Zellen eines Burkitt Lymphoms (Raji) zeigen eine signifikant verminderte Proliferation unter Einwirkung des anti-TIRC7 mAK 17. Humane Tumorzelllinien (1×10^6 Zellen) wurden mit $200 \mu\text{g/ml}$ anti-TIRC7 mAK oder IgG Kontrolle 5 d inkubiert, am 4.Tag Zugabe von $[^3\text{H}]$ -Thymidin, am 5.Tag Messung der β -Strahlenemission. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der $[^3\text{H}]$ -Thymidinaufnahme (cpm), als Maß für die Zellproliferation während der letzten 18 h der Kultur ($n=3$ in 3-facher Bestimmung) # $p < 0,05$ gegenüber der pos.Kontrolle.

5. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte eine weiterführende funktionellen Charakterisierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen TIRC7, einem neuen immunmodulatorischen Molekül, welches an der frühen T-Zell-Aktivierung beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass TIRC7 in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert ist, und die poly- und monoklonalen Antikörper die Zellproliferation der Tumorzellen hemmen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von Gedächtnis-Zellen durch Recall-Antigene, es unter dem Einfluß von monoklonalen anti-TIRC7-AK, zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation der CD3⁺ Zellen kommt.

5.1 TIRC7-Molekül

In Vorarbeiten ist mittels „differential display RT-PCR“ das Genexpressionsmuster humaner Lymphozyten in allogenen stimulierter gemischter Lymphozytenkultur analysiert worden. Dabei wurde ein nach 24 h hochreguliertes Genfragment identifiziert und als „T-cell immune response cDNA7“ = TIRC7 bezeichnet (Utku, N. et al. 1998).

Utku et al. wiesen nach, dass es sich um ein Molekül handelt, welches in der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielt. Im Verlauf der Differenzierung des Aktivierungszustandes von der naiven T-Zelle zur Gedächtnis-Zelle zeigt TIRC7 ein charakteristisches Expressionsmuster (Winter, M. Promotionsarbeit 2003).

Weitere Voranalysen zeigten, dass TIRC7 Protein auf allen peripheren lymphozytären und monozytären Zellen exprimiert ist. Dies lässt die Vermutung nahe liegen, dass TIRC7 nicht nur eine regulatorische Rolle in der T-Zell-Aktivierung hat, sondern auch eine Bedeutung für andere Zellsubpopulationen.

Andere kostimulatorische Oberflächenmoleküle der T-Zell-Aktivierung sind ebenfalls nicht nur auf T-Zellen allein anzutreffen. Beispielsweise ist CTLA-4 auch auf der Oberfläche von B-Zellen (Kuiper et al. 1995), sowie auf Muskelzellen (Nagaraju et al. 1999) nachweisbar.

CD 28 wird ebenfalls auf B-Zellen und zusätzlich auf Plasma Zellen exprimiert. Auf aktivierten T- und B-Zellen ist beispielsweise CD40/CD40-Ligand nachweisbar (Grammer et al. 1995).

5.2 T-Zell-Proliferationshemmung durch TIRC7-Antikörper

Entsprechend der Aminosäuresequenz von TIRC7 wurden verschiedene Peptide synthetisch hergestellt. Gegen diese Peptide wurden polyklonale Antikörperseren durch Immunisierung von Kaninchen synthetisiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch diese polyklonalen TIRC7-Antikörper, die gegen potentiell extrazelluläre Epitope des TIRC7-Moleküls gerichtet sind, eine signifikante Proliferationshemmung von Lymphozyten erreicht werden kann.

Nach einer Peptidblockade der Antikörper konnte diese Proliferationshemmung teilweise wieder rückgängig gemacht werden, was für die Spezifität der Antikörper spricht.

Im Ergebnis dieser Analyse wurden für weiterführende Untersuchungen mehrere monoklonale anti-TIRC7- Maus-Antikörper generiert.

Diese monoklonalen TIRC7-AK gerichtet gegen das Epitop Nr. 6 der großen extrazellulären Schleife und gegen das Epitop Nr. 4 des C-Terminus zeigen in vitro eine signifikante Hemmung der Zellproliferation der T-Zell-Leukämiezelllinien Jurkat und Sup-T1, sowie der Lymphom Zelllinie Raji.

Eine Inhibition der T-Zell-Antwort durch Antikörper ist durch Blockierung der kostimulatorischen Aktivierungswege z.B. CD28, B7-1/B7-2 bereits verschiedentlich beschrieben worden (Chen, C. et al. 1994). Es werden vermutlich die Bindungsstellen von CD28 und B7 durch die Antikörper auf der Zelloberfläche der Zellen blockiert, so dass die Ligandenbindung und die Kostimulation nicht mehr erfolgen kann.

Vergleichbare inhibitorische Effekte konnten mit dem löslichen Protein CTLA4-Ig gezeigt werden. Es bindet mit einer höheren Affinität als CD28 an B7 und verhindert damit eine Signalauslösung über CD28 und somit eine Kostimulation der T-Zelle (Rothstein, D.M. et al. 2003; Linsley, P.S. et al. 1992; Akalin, E. et al. 1996).

Vergleichbar gute Ergebnisse wurden durch die Blockade der CD40-Ligand/CD40-Interaktion beschrieben (Kirk, A.D. et al. 1999; Iwakoshi, N.N. et al. 2000). Der CD40-Ligand bindet an CD40, das auf dendritischen und Endothelzellen exprimiert wird und stimuliert die Freisetzung von Cytokinen wie IL6, IL8, und IL12 aus diesen Zellen.

Es könnte vermutlich auch bei der Bindung der TIRC7-Antikörper eine Verstärkung der Blockade des für die T-Zell-Aktivierung notwendigen positiven Signals oder Verstärkung der inhibitorischen Signale ausgelöst werden.

Das *in vitro* translatierte lösliche TIRC7-Protein zeigte ebenfalls eine proliferationshemmende Wirkung auf stimulierte T-Zellen in der MLC (Utku, N. et al. 1998). Ursächlich ist auch hierbei vermutlich die Bindung an einen potentiellen Liganden.

Utku, N. et al. zeigten darüber hinaus, dass TIRC7 spezifische Antikörper in einem Nierentransplantationsmodell (Lewis Ratten) die Überlebenszeit nach der Transplantation signifikant verlängerten. Histologische Untersuchungen, der mit TIRC7 Antikörper behandelten Ratten, demonstrierten eine vollständige Erhaltung der Gewebestrukturen, wogegen in Histologien der Kontrollgruppen deutliche mononukleäre Infiltrationen mit massiver Zerstörung des Nierengewebes auffindbar waren (Utku, N. et al. 1998).

In einer weiteren Untersuchung herztransplantierte Patienten konnte gezeigt werden, dass die TIRC7-mRNA-Expression, im Gewebe welches abgestoßen wird, signifikant ansteigt (Shulzhenko, N. et al. 2001; Morgun, A. et al. 2001).

Ebenfalls gezeigt wurden, dass anti-TIRC7-mAK die Progredienz der Arthritis in der Maus vorbeugen können, was die blockierende Wirkung der Antikörper auf die Th1 Reaktion untermauert (Utku, N. et al. 2006).

Die bemerkenswerte inhibitorische Wirkung der spezifischen monoklonalen TIRC7-Antikörper, die Überlebensrate von Transplantaten signifikant zu verlängern, sowie eine Arthritis vorzubeugen, könnte ein neuer Ansatz für eine selektive Hemmung der T-Zell-Aktivierung bei einer Vielzahl von immunologischen Erkrankungen sein.

5.3 TIRC7 und Recall-Antigenstimulation

Das Prinzip einer Recall-Antigenstimulation beruht auf der Annahme, dass eine Mehrzahl der Individuen bereits Antigenkontakt, mit einem oder mehreren in dem Recall Mix enthaltenen Antigenen hatte und somit entsprechend zu aktivierende Langzeitgedächtniszellen vorhanden sind. Weiterhin wird angenommen, dass eine spätere Reaktionen auf ein schon bekanntes Antigen in immunen Personen nur von den Gedächtniszellen und nicht von naiven Lymphozyten hervorgerufen wird. Diese Reaktionen laufen dann in der Regel schneller und effizienter ab.

Die Auswahl der im Mix enthaltenen potentiell als Antigen wirkenden Substanzen sollte dabei eine entsprechende Immunantwort auslösen.

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass TIRC7 auf Gedächtniszellen nachweisbar ist (Michael Winter, Dissertation 2003).

Nach Stimulation einer PBL mit einem Antigen-Mix aus Tetanustoxoid, Pertussis, Candida, CMV und Influenza zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation der Zellen in Gegenwart des monoklonalen TIRC7 AK 18, abhängig von der Antikörperkonzentration. Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass sich die Aktivierung der Gedächtniszellen durch die TIRC7-Antikörperwirkung reduzieren, wenn nicht sogar verhindern lässt.

5.4 Tumorzellen und TIRC7-Expression

In den Vorarbeiten konnte durch Expressionsanalyse der Gewebeverteilung auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass TIRC7 in Milz, Lymphknoten, Appendix, Thymus, und Knochenmark exprimiert ist.

Von Interesse war nunmehr eine genauere Kenntnis einer möglichen Veränderung der TIRC7 Expression im Zusammenhang mit einer malignen Entartung von Zellen.

Im Ergebnis dessen konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Northern Blot nachgewiesen werden, dass in maligne entarteten Zelllinien von Geweben aus Mamma, Colon, Magen, Pankreas, Nebenniere, Bronchien und Haut (Melanozyten) TIRC7-mRNA ebenfalls exprimiert ist. Durch PCR-Analysen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

Weiterführend konnte durch PCR-Analyse eine TIRC7 Expression in verschiedenen Zelllinien von z.B. T-Zell-Leukämien (Jurkat, MOLT4, CEM) sowie in cutanen T-Zell-Lymphomzelllinien (SeAx, SeTep, MyLa) nachgewiesen werden.

Maligne Zellveränderungen sind sehr vielfältig und es können unterschiedliche Reaktionen in einem Organismus hervorgerufen werden.

Bei den Zelllinien Jurkat und Molt handelt es sich um T-Zell-Lymphom-Zellen von Patienten die an einer akuten lymphatischen Leukämie erkrankten. Jurkat-Zellen exprimieren TCR, CD3, CD2 und CD28, jedoch nur in sehr geringem Maße CD45. Eine Induktion der IL-2-Produktion ist nur über Calciumkanäle oder Phorbol-Ester möglich nicht jedoch über den TCR oder CD2 Stimulation (ATCC).

In den MOLT4-Zellen liegt eine Mutation des p53 Genes vor. Es werden CD1, CD2, CD3A/B/C, CD4, CD5, CD6 und CD7 exprimiert, jedoch erfolgt keine Produktion von Immunglobulinen (ATCC).

Pankreaskarzinomzellen besitzen Fähigkeiten, sich der immunologischen Abwehr zu entziehen. Es werden Zell-Oberflächenrezeptoren exprimiert die nicht zur adäquaten Antigenpräsentation befähigt sind, es werden Zelltod blockierende Moleküle gebildet (bcl2, bcl-xL) und es erfolgt eine Expression von Liganden die eine Apoptose in Immunzellen hervorrufen (Saleh, M.I. et al. 2001).

Bei den cutanen T-Zell-Lymphomen Sezary und Mycosis fungoides handelt es sich um Erkrankungen, bei denen es zu einer malignen Veränderung der CD4+T-Lymphozyten kommt (in unterschiedlich starker Ausprägung), mit einer klinisch auffälligen Manifestation in der Haut. Beobachtet wurde, dass die Mehrzahl der Sezary Zellen vom Th2-Typ sind und verstärkt Zytokine vom Th2-Zelltyp produzieren (Yoo, E.K. et al. 2001), wogegen es zu keiner Produktion von Th1-Zytokinen wie IL-12 kommt (Zaki, M.H. et al. 2002). Darüber hinaus ist in diesen Zellen eine IFN γ -Resistenz festgestellt worden (Dummer, R. et al. 2001). IFN γ ist ein natürlicher Inhibitor der klonalen T-Zell-Proliferation. In vitro Versuche mit IL-12 sind vielversprechend, da eine Kombination von IL-12 und IL-2 synergistische Effekte auf die Aktivität der NK-Zellen hat. Es könnten sich daraus durchaus neue Therapiestrategien ergeben (Zaki, M.H. et al. 2002).

Neue Therapiestrategien ergeben sich in jüngerer Zeit auch durch den Einsatz von Tumor-Zell-Lysat gepulsten dendritischen Zellen z.B. bei akuten lymphatischen Leukämien (Pospisilova, D. et al. 2002), beim malignen Melanom (Yang, S. et al. 2002; Thurner, B. et al. 1999), beim Ovarial Carzinomen (Zhao, X. et al. 2001),

Nierenzellcarzinom (Gitlitz, B.J. et al. 2001), beim Sezary Syndrom (Vonderheid, E.C. et al. 2002) sowie auch beim Colon Carzinom. Beim letztgenannten beispielsweise erfolgte in vivo und in vitro eine Induktion der T-Zell-Antwort nach Transfektion von Colon Carzinom-RNA in dendritische Zellen (Smita, K. et al. 2002).

Erste klinische Erfolge wurden bei einer immunmodulatorischen Kombinationstherapie (Interferon + extrakorporale Photopherese) bei Patienten mit Sezary Syndrom erreicht (Richardson, S.K. et al. 2006). Kombinationstherapien mit apoptoseinduzierenden Liganden (TRAIL) sind ebenfalls eine mögliche neue Strategie in der Tumorbekämpfung (Kim, J.H. 2003).

Die vielversprechende Tumurvaccinierung scheint jedoch vorerst nur von kurzzeitigem Erfolg zu sein. Wiederholte in vitro Stimulation von CD8+T-Zellen durch MHC I-Präsentation von Teilen des Melanom-AG-Peptides (gp100) führten zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Effektorfunktion (Gattinoni, et al. 2005). Zukünftig ist es daher erforderlich, immer mehr auch die immunologischen Zusammenhänge in der modernen Tumorthherapie zu verstehen und zu berücksichtigen.

Die Resultate der TIRC7 Expressionsanalysen in den untersuchten Tumorzelllinien könnten möglicherweise zu neuen Therapieüberlegungen führen. Daher ist es wichtig, die Expression von TIRC7 in weiteren Tumoren u.a. auf Proteinebene auch histologisch zu untersuchen und die Wirkung der Antikörper zu testen, da sie als potentielle Therapeutika eingesetzt werden können.

Ausgehend von dieser Frage erfolgte die Untersuchung des Einflusses monoklonaler TIRC7 Antikörper auf verschiedene maligne Tumorzelllinien.

Es ließ sich dabei z.T. eine signifikante Hemmung der Zellproliferation nachweisen. Weitere ergänzende in vivo und in vitro Studien sind erforderlich, um zu analysieren ob monoklonale TIRC7 Antikörper in der Therapie von Tumorpatienten einsetzbar sind.

6. Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Medizin schreitet in den letzten Jahrzehnten rasant voran. Es zeigte sich dabei zunehmend, dass das Immunsystem eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen spielt und es daher vor allem im Bereich der Immunregulation weiteren Forschungs- und Entwicklungsbedarf gibt.

Bedeutung erlangte in diesem Zusammenhang ein neu entdecktes immunregulatorisches Molekül TIRC7-„*T-cell immune response cDNA*“.

Anhand von Untersuchungsergebnisse aus Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass TIRC7 auf der Oberfläche immunrelevanter Zellen exprimiert ist und als membranständiges Protein in der frühen T- und B-Zell-Aktivierung eine immunregulatorische Rolle hat.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine funktionelle Charakterisierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen TIRC7 durchzuführen, sowie die Expression von TIRC7-mRNA in verschiedenen Zelllinien von Tumoren zu analysieren. Es gelang ein Nachweis von TIRC7-mRNA in verschiedenen Tumorzelllinien und es konnte eine proliferationshemmende Wirkung der monoklonalen TIRC7-AK auf einige Tumorzelllinien nachgewiesen werden.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es nach Stimulation von Gedächtniszellen der PBL durch Recall-Antigene unter dem Einfluss von TIRC7-AK, zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation kommt.

Insgesamt lässt sich anhand der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse feststellen, dass es unter dem Einfluss der TIRC7-AK zu einer Hemmung der Zellproliferation in einigen Tumorzelllinien und Gedächtniszelle in PBL kommt.

Aufgrund dieser viel versprechenden Ergebnisse erscheint es im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiestrategien wichtig, weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet durchzuführen.

7. Literaturverzeichnis

Abbas, A.K. , Murphy, K.M., Sher, A. (1996). Funktional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793

Abbas, A.K.(2005). *Cellular and Molecular Immunobiology* ,2nd edition,

Aggarwal, B.B. (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur.Cytokine.Netw.* 7:93-124

Akalin, E., Chandraker, A., Russell, M. E., Turka, L. A., Hancock, W. W., Sayegh, M. H. (1996). CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA-4 Ig in the rat renal allograft model: inhibition of cell-mediated and humoral immune responses in vivo. *Transplantation* 62, 1942

Badovinac, V.P. et al.(2004). CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat. Immunol.* 5, 809-817

Barber, D.L., Wherry, E.J., Ahmed, R. (2003) Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells, *J. Immunol* 171: 27-31

Barber, D.L. et al (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682-687

Bauer S. , Groh, V.(1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729

Berke, G. (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molekular and cellular aspects. *Annu.Rev. Immunol.* 12: 735-739

Beutler, B. et al (1993). Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit.Care.Med.* 21:423-435

Schweitzer, A.N., Sharpe, A. H. (1998). Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD 86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J.Immunol.* 161:2762-2771

Schweizer, Angelika (2002), Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin

Seder,R.A. et al. (1994).Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 12:635-673

Sharpe, A.H., Freeman G.J. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat.Rev. Immunol.* 2; 116-126

Shulzhenko, N., Morgun, A., Rampim, G. F., Franco, M., Almeida, D. R., Diniz, R.V. Z., Carvalho, A. C. C., Gerbase-DeLima, M. (2001). Monitoring of intragraft and peripheral blood TIRC7 Expression as a diagnostic tool for acute cardiac rejection in humans. *Human Immunology* 62: 342-347

Sigal, N.H., Dumont, F.J. (1992). Cyclosporin A, FK-506 and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu. Rev.Immunol.*, 10: 519-560

Smita, K.N., Morse, M., Boczkowski, D., Cumming, I.R., Vasovic, L., Gilboa, E., Lyerly, K. (2002). Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Annals of Surgery* 235: 540-549

Sornasse, T., Larenas, P. V., Davis, K. A., de Vries, J. E., Yssel, H. (1996). Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J.Exp.Med.* 184(2):473-483

Sun, J.C. et al. (2003) Defective CD8+ T cell memory following acute infection without CD4+ T cell help. *Science* 300, 339-342

Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C.D., Lee, S., Rouse, B.T. (2003) CD4+CD25+ T cells regulate virus specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198: 889-904

Teebor, G.W., Frenkel, K., Goldstein, M.S. (1984) Ionizing radiation and tritium transmutation both cause formation of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in cellular DNA. *Proceedings Of The National Academy Of Science Of The United States of America*, 81 : 318-321

Thurner, B., Haendle, I., Röder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Marczek, C., Schreiner, D., von der Driesch, P., Bröcker, E.B., Steinmann, R.M., Enk, A., Kämpgen, E., Schuler, G. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced Stage IV melanoma. *J.Exp.Med.* 11: 1669-1678

Tracey, K.J. et al. (1987). Anti cachectin/TNF monoklonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteriemia. *Nature* 330:662-664

Trinchieri, G. (1994) Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of t-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 12(15): 4008-4027

Tsdo, M. et al.(1987) The p75 peptide is the receptor for IL-2 expression on large granular lymphocytes and is responsible for the IL-2 activation of these cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84: 5394-5398

Utku, N., Heinemann, T., Tullius, S. G., Bulwin, G.-C., Beinke, S., Blumberg, R. S., Beato, F., Randall, J., Kojima, R., Busconi, L., Robertson, E. S., Schüle, R., Volk, H.-D., Milford, E. L., Gullans, S. R. (1998). Prevention of acute allograft rejection by antibody targeting of TIRC7, a novel T cell membrane protein. *Immunity* 9: 509-518

Utku, N., Heinemann, T., Winter, M., Bulwin, C.G., Schlawinzy, M., Fraser, P., Nieuwenhuis, E.E.S., Volk, H.-D., Blumberg, R.S. (2006) Antibody targeting of TIRC7

results in significant therapeutic effects on collagen-induced arthritis in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 144: 142-151

van Dijk, A. M., Otten, H. G., Vercauteren, S. M., Kessler, F. L., de Boer, M., Verdonck, L. F., de Gast, G. C. (1996). Human B7-1 is more efficient than B7-2 in providing co-stimulation for alloantigen-specific T cells. *Eur.J.Immunol.* 26, 2275-2278

van Leeuwen, E.M.M., Remmerswaal, E.B.M., Vossen, M.T.M., Rowshani, A.T., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van Lier, R.A.W., ten Berge, I.J.M. 2004
Emergence of a CD4⁺ CD28⁺ granzyme B⁺, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *The Journal of Immunology*, 173: 1834-41

Vonderheid, E.C. (2002). Treatment of cutaneous T cell lymphoma. *Recent Results Cancer Res.* 160: 309-320

Von Mehren, M., Arlen, P., Gulley, J., Rogatko, A. Cooper, H.S., Meropol, N.J., Schlom J, Weiner, L.M. (2001) The influence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor on prior chemotherapy on the immunological response to a vaccine (ALVAC-CEA B7.1) in patients with metastatic carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 7: 1181-1191

Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405-413

Werner, H. (1991) *Medizinische Mikrobiologie*. Verlag Schattauer, Stuttgart

Willems, F. et al. (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur.J.Immunol.* 24: 1007-1009

Winter, Michael (2003) Phänotypische Charakterisierung des neuen immunmodulatorischen Moleküls TIRC7, Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin, Fachbereich Immunologie

Yang, S. Linette, G.P., Longerich, S., Haluska, F.G. (2002) Antimelanoma activity of CTL generated from peripheral blood mononuclear cells after stimulation with autologous dendritic cells pulsed with melanoma gp100 peptide G209-2 M is correlated to TCR avidity. *J Immunol.* 7 1; 169

(1): 531-9.

Yoo, E.K., Cassin, M., Lessin S.R., Rook, A.H. (2001). Complete molecular remission during biologic response modifier therapy for Sezary syndrome is associated with enhanced helper T type 1 cytokine production and natural killer cell activity. *J.Am.Acad.Dermatol.* 45(2):208-216

Zaki, M.H., Wysocka, M., Everetts, S.E., Wang, K.S., French, L.E., Ritz, J., Rook, A.H. (2002). Synergistic enhancement of cell-mediated immunity by interleukin-12 plus interleukin-2: basis for therapy of cutaneous T cell lymphoma. *I.Invest.Dermatol* 118(2): 366-371

Zhang, S., Lukacs, N. W., Lawless, V. A., Kunkel, S. L., Kaplan, M. H. (2000). Cutting edge: Differential expression of chemokines in Th1 and Th2 cells is dependent on Stat6 but not Stat4. *J.Immunol.* 165:10-14

Zhao, X., Wei, Y.Q., Peng, Z.L. (2001). Induction of T cell responses against autologous ovarian tumors with whole tumor cell lysate-pulsed dendritic cells. *Immunol.Invest.* 30(1): 33-45

Zheng, B., Lam, C., Im, S., Huang, J., Luk, W., Lau, S.Y., Wong, C.K., Yao, K., Ng, M.H. (2001). Distinct Tumour specificity and IL-7 requirements of CD56⁻ and CD56⁺ subsets of Human γ,δ T cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 53/1:40

Zhu, M. Z., Marshall, J., Cole, D., Schlom, J., Tsang, K.Y., (2000) Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. *Clin. Cancer Res.* 6: 24-33.

Zinkernagel, R.M. (2003) On natural and artificial vaccinations. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 515-546

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Anke Schulze, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema:

Funktionelle Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen TIRC7, einem neuen negativ immunregulatorischen Zelloberflächenmolekül.

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 21.11.2008

Anke Schulze

Danksagung

Frau Dr. Nalan Utku und Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung und Bereitstellung des Promotionsthemas.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité Berlin für das Vertrauen, die Unterstützung und produktive Atmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Grit-Carsta Bulwin, die mir während der gesamten Zeit eine sehr große Hilfe war.

Bei den Mitarbeitern der Firma Genpat77 Pharmacogenetics AG möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung bedanken, vor allem bei Frau Körner und Mirko Schlawinsky.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie vor allem bei Annalena, Friederike, Amelie und Mathias für die Geduld und Unterstützung während der entbehrungsreichen Zeit.