elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Aus dem Institut für Pathologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann

# Einfluss der TGF-beta1 Expression auf das in-vivo Wachstum der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HRT-18

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Stephan Fuhrmann
geboren am 05.11.1979 in Berlin

Gutachter:

1. PD Dr. C. Hoang-Vu
2. Prof. Dr. G. Barretton (Dresden)

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 18.12.2007
Datum der Promotion: 20.06.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014029**
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014029]

Für meine Eltern

## Referat und bibliographische Beschreibung

Die direkte Umgebung einer Tumorzelle, das Tumorstroma, ist eine wichtige Komponente eines Karzinoms und kann sowohl Tumorprogression als auch Metastasierung aktiv fördern. Im Stroma vorhandene Zellen (Myofibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen) stehen unter dem Einfluss der von Tumorzellen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren. Einer dieser Mediatoren ist TGF-ß1, ein Wachstumsfaktor, der proliferationsfördernd auf mesenchymale Zellen wirkt. Das Verhalten von Tumorzellen gegenüber TGF-ß1 ist variabel, sowohl Proliferationshemmung als auch Proliferationsteigerung sind möglich. TGF-ß1 fördert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und hemmt die Zytotoxizität tumor-assoziierter Makrophagen.

Diese Arbeit untersuchte das Wachstumsverhalten einer kolorektalen Karzinomzelllinie (HRT-18) nach Transfektion mit einem anti-TGF-ß1-Ribozym. Ein Tumorzellklon mit reduzierter TGF-ß1-Expression wurde in SCID-Mäuse transplantiert. In einem Tumorzell-Makrophagen-Kokulturmodell wurde untersucht, wie durch Ausschaltung von TGF-ß1 in den Tumorzellen die Zytotoxizität von Makrophagen beeinflußt wird.

Die TGF-ß1-Inhibition bewirkte ein verlangsamtes Tumorwachstum und histologisch besser differenzierte Tumoren. Die Hemmung der ROI-Produktion der Makrophagen durch die Tumorzellen war durch die Transfektion mit dem Ribozym reversibel und korrelierte mit einem verzögerten Tumorwachstum.

Diese Daten zeigen das mögliche Potential von TGF-Inhibitoren in der Therapie des kolorektalen Karzinoms.

**Transforming growth factor-β1, kolorektales Karzinom, real-time-PCR, molekulare Therapie**

Fuhrmann, Stephan: Einfluss der TGF-beta1 Expression auf das in-vivo Wachstum der humanen kolorektalen Adenokarzinomzellinie HRT-18. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 66 Seiten, 2007

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| bp | Basenpaare |
| ca. | circa |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CSF-1 | Kolonie-stimulierender Faktor 1 |
| DMEM | Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| E.coli | Escherichia coli |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EGF | Epidermal growth factor |
| FCS | Fetal Calv Serum (fötales Kälberserum) |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| $H_2O$ | Wasser |
| HPF | High power field |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| lt. | laut |
| mind. | mindestens |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| µM | Mikromolar |
| mM | Millimolar |
| min | Minuten |

| | |
|---|---|
| nm | Nanometer |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PRGF-1 | Plasminogen related growth factor-1; früher scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROI | Sauerstoffradikale (Radical Oxygen Intermediates) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Reverse Transkription |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TGF-ß1 | Transforming-Growth-Factor-β1 |
| TPA | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (4beta,9alpha,12beta,13alpha,20-Pentahydroxytiglia-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate-13-acetat) |
| V | Volt |
| vgl. | vergleiche |
| Vol% | Volumen-Prozent |

## Inhaltsverzeichnis


| | | |
|---|---|---|
| **Abkürzungsverzeichnis** | | iii |
| 1 | **Einleitung** | 1 |
| 1.1 | Das kolorektale Karzinom | 1 |
| 1.1.1 | Stadieneinteilung und Prognose | 1 |
| 1.1.2 | Stadienabhängige Therapie | 2 |
| 1.1.3 | Neue molekulare Therapien | 2 |
| 1.2 | Transforming Growth Factor-β1 (TGF-ß1) | 3 |
| 1.2.1 | TGF-ß – Struktur und Biochemie | 3 |
| 1.2.2 | Hauptwirkung und pathopysiologische Bedeutung von TGF-ß | 3 |
| 1.2.3 | Zell- und Gewebsexpression der TGF-ß-Rezeptoren | 3 |
| 1.2.4 | Signaltransduktion | 3 |
| 1.2.5 | Plastizität der TGF-ß-Signalkaskade | 4 |
| 1.2.6 | Zellzyklusregulation und autokrine Proliferationshemmung | 5 |
| 1.3 | TGF-ß1: Rolle bei Tumorentstehung und - progression | 6 |
| 1.3.1 | TGF-ß1 als Tumorsuppressor | 6 |
| 1.4 | TGF-ß1 als Progressionsfaktor | 8 |
| 1.4.1 | Modulation des Tumorstromas | 8 |
| 1.4.2 | Einfluss auf Angiogenese | 10 |
| 1.4.3 | Immunsuppressive Eigenschaften | 11 |
| 1.5 | TGF-ß1 Inhibition in der Tumortherapie | 13 |
| 1.5.1 | Bisheriger Stand | 13 |
| 1.6 | Fragestellung | 15 |
| 2 | **Material und Methoden** | 16 |
| 2.1 | Reagenzien | 16 |
| 2.2 | Reagenz-Kits | 17 |
| 2.3 | Oligonukleotide | 17 |

| | | |
|---|---|---|
| 2.4 | Antikörper | 18 |
| 2.5 | Pufferlösungen, Kulturmedien | 18 |
| 2.6 | Biologisches Material | 19 |
| 2.6.1 | humane Zelllinien | 19 |
| 2.7 | Verbrauchsmaterial | 19 |
| 2.8 | Geräte | 20 |
| 2.9 | Zellkultur | 21 |
| 2.10 | Kokulturversuch | 22 |
| 2.10.1 | Makrophagen | 22 |
| 2.10.2 | Anzucht der multizellulären Tumorspheroide (MCTS) | 22 |
| 2.10.3 | Kokultur und Messung der Radikalbildung | 23 |
| 2.11 | Erzeugung von Tumoren in SCID-Mäusen | 23 |
| 2.12 | TGF-ß1-Expressionsanalyse des Tumorgewebes | 24 |
| 2.12.1 | Isolierung der mRNA | 24 |
| 2.12.2 | Kontrolle der RNA-Qualität und Konzentrationsbestimmung | 25 |
| 2.12.3 | RT-PCR | 25 |
| 2.12.4 | Erzeugung des externen Standards | 26 |
| 2.12.5 | Quantifzierung am Light-Cycler | 26 |
| 2.13 | Immunhistologie | 29 |
| 2.13.1 | Färbung der Schnitte | 29 |
| 2.13.2 | Histologische Auswertung der Tumoren | 29 |
| 2.14 | Statistische Auswertung | 30 |
| 3 | **Ergebnisse** | 31 |
| 3.1 | Vorarbeiten: Erzeugung des Ribozymklons | 31 |
| 3.2 | ROI-Bildung im Kokulturmodell | 32 |
| 3.3 | Tumorwachstum im Tierversuch | 34 |
| 3.4 | TGF-ß1 Expression im Tierversuch | 37 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.5 | Histologie der Tumoren | 38 |
| 3.5.1 | Tumormorphologie und CEA-Produktion | 38 |
| 3.5.2 | Quantifizierung nekrotischer Areale | 39 |
| 3.5.3 | Proliferationsverhalten | 42 |
| 3.5.4 | Nachweis von Makrophagen | 43 |
| 4 | **Diskussion** | 44 |
| 4.1 | TGF-ß und Proliferation | 44 |
| 4.2 | TGF-ß und Tumorstroma | 45 |
| 4.2.1 | Modulation der Makrophagenaktivität | 46 |
| 4.2.2 | Einfluss auf die Angiogenese | 48 |
| 4.3 | Zusammenfassende Bewertung | 50 |
| 4.4 | Limitationen der Arbeit | 50 |
| 4.5 | Ausblick | 51 |
| 5 | **Literaturverzeichnis** | 53 |
| 6 | **Thesen** | 62 |
| **Selbständigkeitserklärung** | | 63 |
| **Lebenslauf** | | 64 |
| **Publikationen** | | 65 |
| **Danksagung** | | 66 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Mit geschätzten 57000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das kolorektale Karzinom in Deutschland die zweithäufigste Tumorerkrankung bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern [70]. Weltweit erkranken jedes Jahr ca. 1 Mio. Patienten, von denen etwa die Hälfte daran verstirbt. Es ist damit die vierthäufigste maligne Erkrankung [27]. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr.

Bei diesen Tumoren handelt es sich um Adenokarzinome, die vom Drüsenepithel der Kolonmukosa ausgehen. Die Hälfte der Tumoren entsteht in Sigma und Rektum, die andere Hälfte verteilt sich auf Caecum und Colon ascendens (30%), sowie Colon transversum und descendens (20%) [78].

### *1.1.1 Stadieneinteilung und Prognose*

Das pathologische Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist der wichtigste Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom. Hier spielen die Eindringtiefe des Tumors in die Darmwand, der Befall regionaler Lymphknoten und Fernmetastasen eine Rolle. Sie sind die Grundlage eines Staging-Systems, wie es von Dukes [23] vorgeschlagen und durch die Union International Contre Cancer (UICC) in die TNM-Klassifikation übernommen wurde [32]. Aus der Tabelle 1 geht hervor, dass der Befall regionärer Lymphknoten entscheidend für die 5-Jahres-Überlebensrate ist.

Tab. 1: Stadieneinteilung und Prognose beim kolorektalen Karzinom. Nach Reichardt et. al. (2003)

| Stadium | | | Pathologisches Bild | Ungefähre Fünf-Jahres-Überlebensrate in % |
|---|---|---|---|---|
| Dukes | TNM | numerisch | | |
| A | T1N0M0 | I | Infiltration beschränkt auf Mukosa und Submukosa | > 90 |
| $B_1$ | T2N0M0 | I | Infiltration erreicht die Muskularis | 85 |
| $B_2$ | T3N0M0 | II | Infiltration oder Penetration der Serosa | 70-80 |
| C | TxN1M0 | III | Befall regionärer Lymphknoten | 35-65 |
| D | TxNxM1 | IV | Fernmetastasen (z.B. Leber, Lunge etc.) | 5 |

### *1.1.2 Stadienabhängige Therapie*

Die gewählte Therapie ist abhängig vom Stadium bei Diagnosestellung. Tumoren im Stadium I und II können durch eine adäquate chirurgische Resektion kurativ behandelt werden, während bei Tumoren der höheren Stadien III und IV mit systemischer Chemotherapie eine Verlängerung des Überlebens sowie eine bessere Lebensqualität im Vergleich zu einem palliativen Ansatz erreicht wird.

Das mediane Überleben für diese fortgeschrittenen Karzinome beträgt unter supportiver Therapie lediglich 6 Monate. Erst die Anwendung von Chemotherapeutika hat für diese Patienten die Überlebensrate verbessert. Fluorouracil, mit oder ohne Folinsäure, war lange Zeit die einzige effektive Substanz zur Therapie der Erkrankung. Im letzten Jahrzehnt hat die Einführung neuer Substanzen, wie Irinotecan oder Oxaliplatin (deren Wirksamkeit in Kombination mit anderen Substanzen in klinischen Studien getestet wurde), das mediane Überleben auf über 20 Monate ansteigen lassen. Eine aktuelle Übersichtsarbeit dazu findet sich bei Meyerhardt und Mayer [59].

### *1.1.3 Neue molekulare Therapien*

Intensive Untersuchungen haben viel zum Verständnis der Biologie kolorektaler Tumoren beigetragen, da dadurch einige für das Tumorgewebe bedeutsame molekulare Veränderungen identifiziert werden konnten. Diese dienen als Ziel für die Entwicklung neuer, spezifisch wirkender Medikamente. Durch dieses gezielte Eingreifen in zelluläre Abläufe verspricht man sich eine effektivere Hemmung der Tumorprogression, ohne die toxischen Nebenwirkungen einer systemischen Chemotherapie.

Neben den direkten Veränderungen der Tumorzellen beeinflusst auch die Umgebung der Tumorzelle, das Tumorstroma, die Entstehung und Progression von Karzinomen. Physiologischerweise dient das Stroma dem Erhalt der Gewebsintegrität, doch die von Tumorzellen ausgeschütteten Zytokine verändern das Stroma und begünstigen die Bildung des Tumorstromas. TGF-ß wird von Tumorzellen sezerniert und fördert die Bildung des invasionsfördernden Tumorstromas [19].

## 1.2 Transforming Growth Factor-β1 (TGF-ß1)

### *1.2.1 TGF-ß – Struktur und Biochemie*

TGF-ß ist Teil einer großen Familie von Signalproteinen und existiert in drei Isoformen: TGF-ß1, -β2 und -β3. TGF-ß1 ist der Prototyp der Proteinfamilie, der vor allem von hämatopoetischen, Bindegewebs- und Endothelzellen gebildet wird [67].

### *1.2.2 Hauptwirkung und pathopysiologische Bedeutung von TGF-ß*

TGF-ß spielt eine wichtige Rolle bei Wachstum, Gewebsdifferenzierung und Wundheilung [12]. Es hemmt die Proliferation epithelialer, endothelialer und hämatopoetischer Zellen, während es für einige mesenchymale Zellen ein mitogener Faktor ist. TGF-ß fördert die Bildung extrazellulärer Matrixproteine und ist als antiinflammatorisches Zytokin ein wichtiger Modulator von Immunreaktionen [50].

Die Überexpression von TGF-ß fördert durch die gesteigerte Bildung extrazellulärer Matrixproteine die Fibrose in Niere, Leber, Herz und Lunge. Durch seine antiproliferative Wirkung auf glatte Muskel- und Endothelzellen wird die Entstehung artheriosklerotischer Veränderungen verzögert. Patienten mit Artheriosklerose habe erhöhte Serumspiegel von Apolipoprotein A, ein Inhibitor der proteolytischen Aktivität von TGF-ß, und reduzierte Serumspiegel von TGF-ß [12].

### *1.2.3 Zell- und Gewebsexpression der TGF-ß-Rezeptoren*

Die meisten Zelltypen besitzen die TGF-ß-Rezeptoren I und II, welche auch für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Der TGF-ß-Rezeptor III (Betaglykan) wird auch in vielen Geweben exprimiert, kommt aber auf Myoblasten, Endothel-, Epithel- und hämatopoetischen Zellen nicht vor. Endothelzellen exprimieren keinen Typ III-Rezeptor, dafür aber ein strukturell verwandtes Protein, das Endoglin (CD105) [80]. Betaglykan und Endoglin fehlt eine intrazelluläre Domäne für die Modulation der intrazellulären TGF-ß-Signalkaskade. Ihre Funktion besteht in der Ligandenpräsentation und in Interaktionen mit dem Rezeptorkomplex.

### *1.2.4 Signaltransduktion*

Alle TGF-ß-Isoformen werden als Vorläuferproteine, bestehend aus TGF-ß und Propeptid, synthetisiert und sezerniert. Die latente Form (bestehend aus 390 Aminosäuren) ist in der extrazellulären Matrix (ECM) an TGF-ß-Bindungsproteine gekoppelt. Zur Entfaltung seiner biologischen Aktivitäten muss zunächst das Propeptid aus der ECM-Bindung gelöst werden. Die proteolytische Spaltung des

Komplexes durch Plasmin führt zur Freisetzung der aktiven Form, eines 25kDa-Heterodimers [67].

Die Bindung von aktivem TGF-ß an den TGF-ß-Rezeptor II führt zur Bildung eines Komplexes mit dem TGF-ß-Rezeptor I, der dadurch aktiviert wird. Dies initiiert die Signaltransduktion. Der TGF-ß-Rezeptor I aktiviert durch Phosphorylierung die intrazellulären Signalmoleküle Smad 2 oder 3, welche in der Folge zusammen mit Smad 4 als Komplex in den Zellkern translozieren und dort durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Transkription verschiedener Zielgene initiieren. Gleichzeitig induziert TGF-ß1 die Expression von Smad 7. Smad 6 und 7 behindern die Phosphorylierung von Smad 2 und 3, wirken als Inhibitoren der Signaltransduktion und erzeugen so eine negative Feedback-Schleife [58].

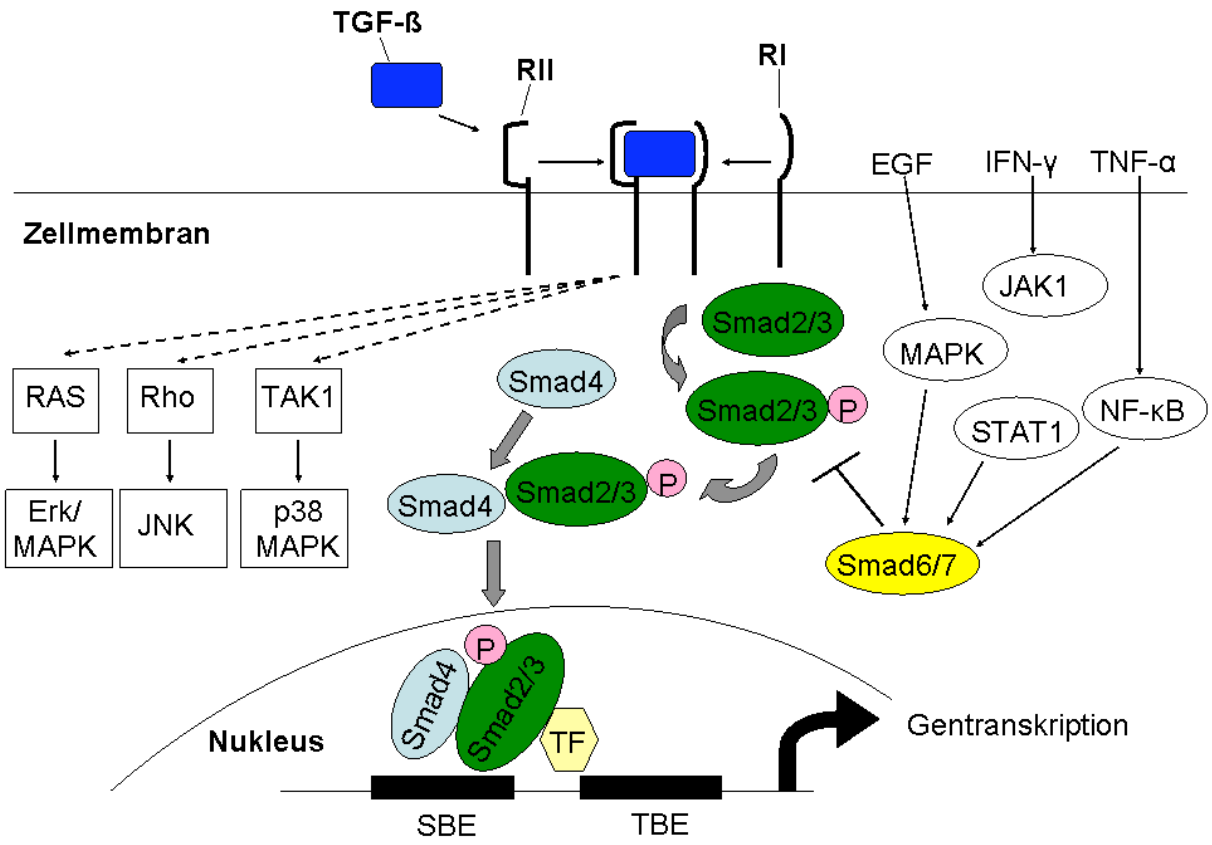


Abb. 1: TGF-ß1-Signalkaskade und Wechselwirkungen mit anderen Signalproteinen.
TF – Transkriptionsfaktor, SBE – Smad-bindendes Element, TBE – Transkriptionsfaktor-bindendes Element.

### *1.2.5 Plastizität der TGF-ß-Signalkaskade*

Dieses lineare System der Signaltransduktion aus zwei Rezeptoren und wenigen intrazellulären Signalmolekülen reicht nicht aus um die vielfältigen, oft auch gewebsspezifischen Wirkungen von TGF-ß (Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose) zu erklären. Die Gewebsspezifität kann einerseits

durch die zelluläre Distribution verschiedener Subtypen für den TGF-RI (activin-like receptors 1-7) und TGF-RII (5 Subtypen) erklärt werden, wobei ALK-5 als Prototyp des TGF-RI auf den meisten Zelltypen zu finden ist. Weiterhin existieren akzessorische Rezeptoren wie Betaglykan und Endoglin, die selbst keine Signaltransduktion bewirken, aber durch Interaktion im Rezeptorkomplex die Signaltransduktion beeinflussen.

Für die Vielfalt der TGF-ß-Effekte ist die Tatsache sehr wichtig, dass TGF-ß nicht nur über Smad2/3 signalisieren kann. Wie in Abb. 1 gezeigt ist TGF-ß auch in der Lage, die Kaskaden von JNK, p38-MAPK und Erk zu aktivieren. Darüber hinaus unterliegt auch der Smad2/3-pathway einer Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten, welche die Kaskade beeinflussen können (Abb. 2) [54].

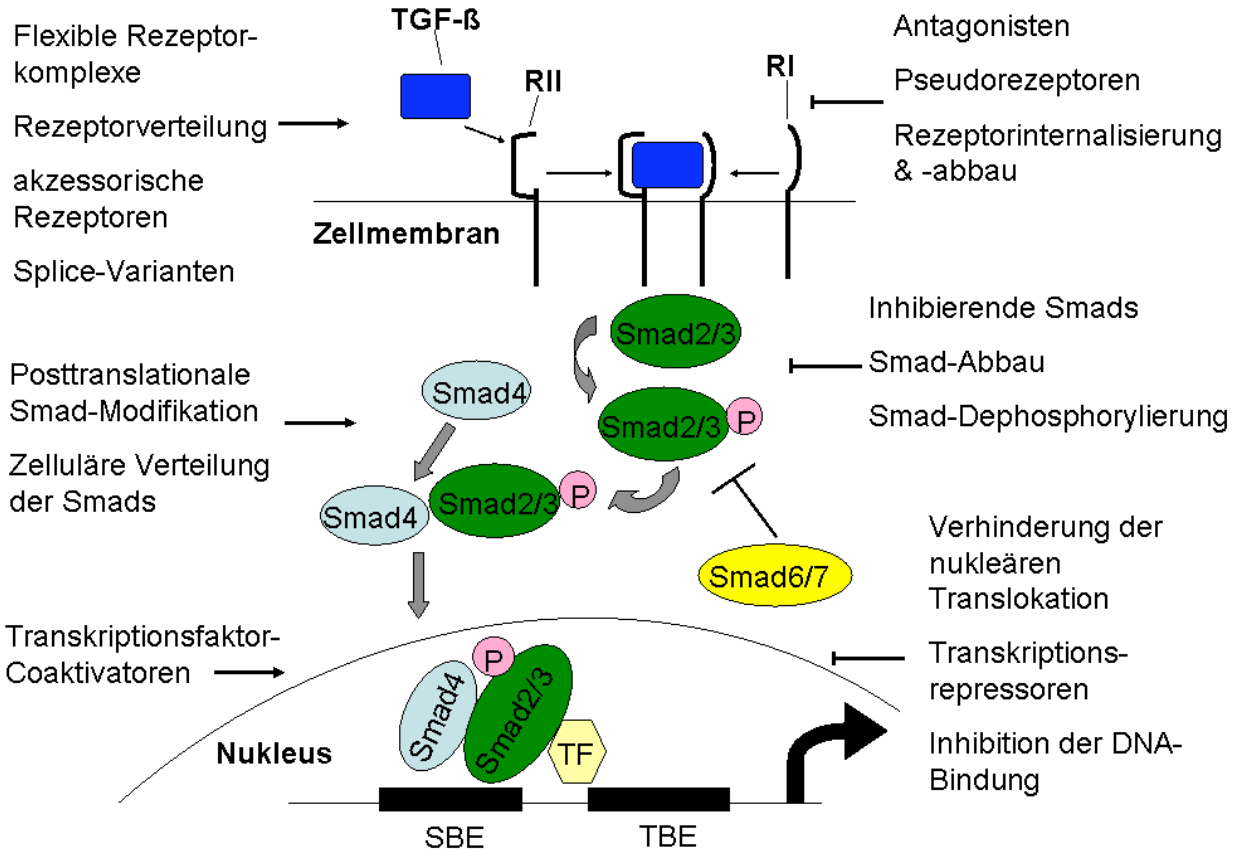


Abb. 2: Modulation der TGF-ß-Signalkaskade. Das resultierende Signal ist abhängig von den positiven und negativen Einflüssen auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion. Nach Lutz et. al. (2002).

### *1.2.6 Zellzyklusregulation und autokrine Proliferationshemmung*

Die strenge Regulation des Zellzyklus bildet die Grundlage für die Differenzierung und den Erhalt der Integrität von Geweben. Hierbei konkurrieren mitogene und wachstumsinhibierende Signale, die auf zellulärer Ebene situationsabhängig Zellteilung oder Proliferationshemmung bewirken können. TGF-ß

spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es sowohl Proliferationshemmung als auch Apoptose in epithelialen Zellen induzieren kann, während mesenchymale Zellen (aber auch hämatopoetische Stammzellen und Tumorzellen) durch TGF-ß vermehrt proliferieren [49].

TGF-ß bewirkt einen G1-Arrest und führt so zu einem Proliferationsstopp. Der Zellzyklus wird durch verschiedene Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen kontrolliert, die ihrerseits durch CDK-Inhibitoren gehemmt werden. TGF-ß moduliert den Zellzyklus vordergründig durch eine Expressionssteigerung verschiedener CDK-Inhibitioren (INK4-Familie: p15, p16, p18, p19 und KIP-Familie p21, p27, p57). Zusätzlich kommt es zu einer Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb), das in diesem Zustand die Transkriptionsfaktoren E2F/DP1 bindet. E2F/DP1 sind für die Aktivierung von Genen der S-Phase und damit für eine erfolgreiche Zellteilung notwendig [22].

Ebenfalls wurde gezeigt, dass TGF-ß Apoptose in verschiedenen Zelltypen induzieren kann. Die genauen molekularen Mechanismen sind hier noch nicht bekannt, aber veränderte Level der Signalmoleküle Smad 3, 4 und 7, sowie ein weiteres Protein (Daxx-adaptor-Protein) spielen dabei wahrscheinlich eine Rolle [73].

## 1.3 TGF-ß1: Rolle bei Tumorentstehung und - progression

### *1.3.1 TGF-ß1 als Tumorsuppressor*

Die Resistenz gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen und die daraus resultierende unkontrollierte Proliferation ist ein Schritt bei der malignen Transformation von Epithelzellen. Inaktivierende Mutationen im TGF-ß-Signalweg sind diesbezüglich eine Möglichkeit. Das die antiproliferative Wirkung von TGF-ß für den Erhalt der physiologischen Gewebsstruktur bedeutsam ist, demonstrierten Engle et. al. an einem Kolonkarzinom-Mausmodell. Hier führte die TGF-ß1-Defizienz zu einer vermehrten Proliferation des Kolonepithels mit Adenombildung [24]. Auch in vielen humanen Karzinomentitäten sind vermehrt Mutationen in der TGF-ß-Signalkaskade nachweisbar. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht bekannter, malignomassoziierter Mutationen, die zu einer Inhibition der TGF-ß1-Signaltransduktion führen.

Tab. 2: Mutationen der TGF-ß-Signalkaskade nach Akhurst et. al. (2001)

| Gen | Protein | Tumortyp | Häufigkeit |
|---|---|---|---|
| TGFBR2 | TβRII | Kolon (+MIS*) | ~ 30% |
| | | Kolon (-MIS**) | ~ 15% |
| | | Magen (+MIS) | 30 – 80% |
| | | Magen (-MIS) | < 5% |
| | | Gliom (+MIS) | ~ 70% |
| | | Gliom (-MIS) | < 5% |
| | | NSCLC*** (+MIS) | ~ 75% |
| | | NSCLC (-MIS) | < 5% |
| | | Pankreas | ~ 50% |
| TGFBR1 | TβRI | Ovar | < 5% |
| | | Mamma | < 5% |
| | | Pancreas | < 5% |
| | | T-Zell-Lymphom | < 5% |
| MADH4 (DPC4) | Smad4 | Pankreas | 25 – 90% |
| | | Kolon (-MIS) | < 5% |
| | | Kolon (+MIS) | 30% |
| MADH2 | Smad2 | Kolon&Rektum | < 5% |
| | | Lunge | < 5% |

*+MIS: Tumore mit Mikrosatelliteninstabilität; **-MIS: Tumore ohne Mikrosatelliteninstabilität; ***NSCLC: nicht kleinzelliges Lungenkarzinom

Die Mehrzahl aller Kolonkarzinome trägt mindestens eine Mutation einer Komponente der TGF-ß-Signalkaskade [31]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Gewebsexpression von TGF-ß1 und die Häufigkeit von Karzinomen in verschiedenen Regionen des Kolons invers korreliert [47]. Bei Patienten mit HNPCC (Lynch-Syndrom), einer hereditären Form des Kolonkarzinoms, sind Keimbahnmutationen des TGF-ß-Rezeptor II beschrieben [12]. Die betroffenen Patienten erkranken sehr früh (im Durchschnitt 10-15 Jahre vor der Allgemeinbevölkerung) an proximalen Kolonkarzinomen und besitzen auch ein erhöhtes Risiko für weitere Neoplasien (bei Frauen Ovarial- und Endometriumskarzinom) [70].

Nicht nur inaktivierende Mutationen, sondern auch verschiedene Onkogenproteine wie p53 [25], Myc [1], E1A [17] und RAS [44] können die TGF-ß-Signaltransduktion inhibieren und den Proliferationsstopp

aufheben. Dabei wirkt p53 synergistisch mit TGF-ß, da es auch die CDK4-Expression senkt und so einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirkt. Mutiertes p53 führt zu einer Dysregulation der CDK4-Expression und bewirkt eine Resistenz gegenüber dem antiproliferativen TGF-ß-Signal. RAS inhibiert die TGF-ß-induzierte nukleäre Akkumulation von Smad2/3.

## 1.4 TGF-ß1 als Progressionsfaktor

Lange Zeit stand die proliferationshemmende Wirkung von TGF-ß und die damit verbundene Idee der Inhibition der Tumorprogression durch erhöhte TGF-ß-Expression im Vordergrund. Hinweise auf eine gegenteilige Rolle von TGF-ß im Sinne einer Förderung der Tumorprogression kommen unter anderem aus Studien mit Nierentransplantierten, in denen diese Patientengruppe ein ca. dreifach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Neoplasie nach Transplantation aufwies. Diese Tumoren, zum überwiegenden Teil Plattenepithelkarzinome der Haut, entwickelten sich nach der Behandlung mit Immunsuppressiva wie Cyclosporin [53]. Durch tierexperimentelle Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen TGF-ß und dem Auftreten dieser Tumoren hergestellt [39]. Weitere Studien mit Mammakarzinomzelllinien zeigten, dass die Vorbehandlung dieser Zellen mit TGF-ß1 zu einer gesteigerten Metastasierung führte [86] und dass die Blockierung der TGF-ß-Signalkaskade die Entwicklung von Knochenmetastasen reduzierte [93]. In der Folge demonstrierten viele Studien, dass TGF-ß, entgegen der ursprünglichen Annahme, auch die Tumorprogression fördern und Invasivität sowie Metastasierung steigern kann [21].

Für eine Vielzahl von Neoplasien, wie maligne Melanome [43], Glioblastome [91], Kolon - [83], Magen - [71], Leber - [9], Prostata - [87] und Lungenkarzinome [79], konnte eine Überexpression von TGF-ß1 im Tumorgewebe und eine damit einhergehende schlechtere Prognose gezeigt werden.

### *1.4.1 Modulation des Tumorstromas*

Das Karzinomgewebe besteht nicht nur aus Tumorzellen, sondern enthält auch Extrazellularmatrix (ECM) und verschiedene Zelltypen (u.a. Myofibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Muskel-, dendritische Zellen), zusammen als Stroma bezeichnet. Die Interaktion der Tumorzellen mit dieser Umgebung erfolgt durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, sowie die Sekretion von Zytokinen und dient der Bildung einer wachstumsfördernden Umgebung. Die genauen Mechanismen der Tumorstromabildung werden noch nicht komplett verstanden, man weiß aber, dass Wachstumsfaktoren wie TGF-ß, PDGF, EGF und FGF-2 entscheidend daran beteiligt sind [19].

Eine zentrale Rolle spielen die Myofibroblasten des Tumorstromas [13]. Unter dem Einfluss von TGF-ß bilden sie verschiedene Kollagene (Typ I, III und V), Fibronektine, Proteoglykane und Tenascin C [36]. Dies führt zu einer Vermehrung der tumor-assoziierten ECM mit veränderter Komposition (Desmoplasie) [41]. Durch von Tumorzellen oder Myofibroblasten gebildete Proteasen (z.B. MMP´s, ADAMs) [94] oder Plasmin [3] wird latent sezerniertes oder schon im Stroma vorhandenes TGF-ß1 aktiviert und dessen

biologische Aktivität gesteigert. Es wirkt als Chemokin, das weitere Fibroblasten in das Tumorstroma rekrutiert und deren Differenzierung in Myofibroblasten fördert.

Myofibroblasten sind nicht nur Hauptproduzenten der ECM, sondern fördern auch die maligne Transformation und Invasion von Tumorzellen. Dies konnte in Kokulturversuchen von aus Tumoren isolierten Myofibroblasten mit BPH-Epithelzellen gezeigt werden. Mit den Myofibroblasten konnten Prostatakarzinome erzeugt werden, dies war mit normalen Fibroblasten nicht möglich [64]. Myofibroblasten finden sich vermehrt am Rand von Tumoren und fördern dort die Invasion der Tumorzellen ins umliegende Gewebe [19]. Zum einen sind die ECM-Bestandteile Migrationssubstrat der Tumorzellen, zum anderen induzieren die sezernierten Faktoren TGF-ß, PRGF-1, Tenascin C und Kollagen Typ I eine epithelial-mesenchymale Transformation der Tumorzellen [20]. Unter dem Einfluss der eben genannten Faktoren kommt es zu einer Dedifferenzierung der Tumorzelle mit Verlust der epithelialen Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin) und Expression mesenchymaler Marker, wie Vimentin und N-Cadherin. Das Ergebnis ist ein Abbruch der Zell-Zell-Kontakte, eine gesteigerte Motilität und eine erhöhte Invasivität der Tumorzelle. Auch durch Kooperation mit Stroma-assoziierten Makrophagen können Tumorzellen ihre Motilität steigern. Unter dem Einfluss von CSF-1 (Kolonie-stimulierender Faktor 1) sezernieren die Makrophagen EGF und ermöglichen den Tumorzellen so die Invasion von Blutgefäßen [90].

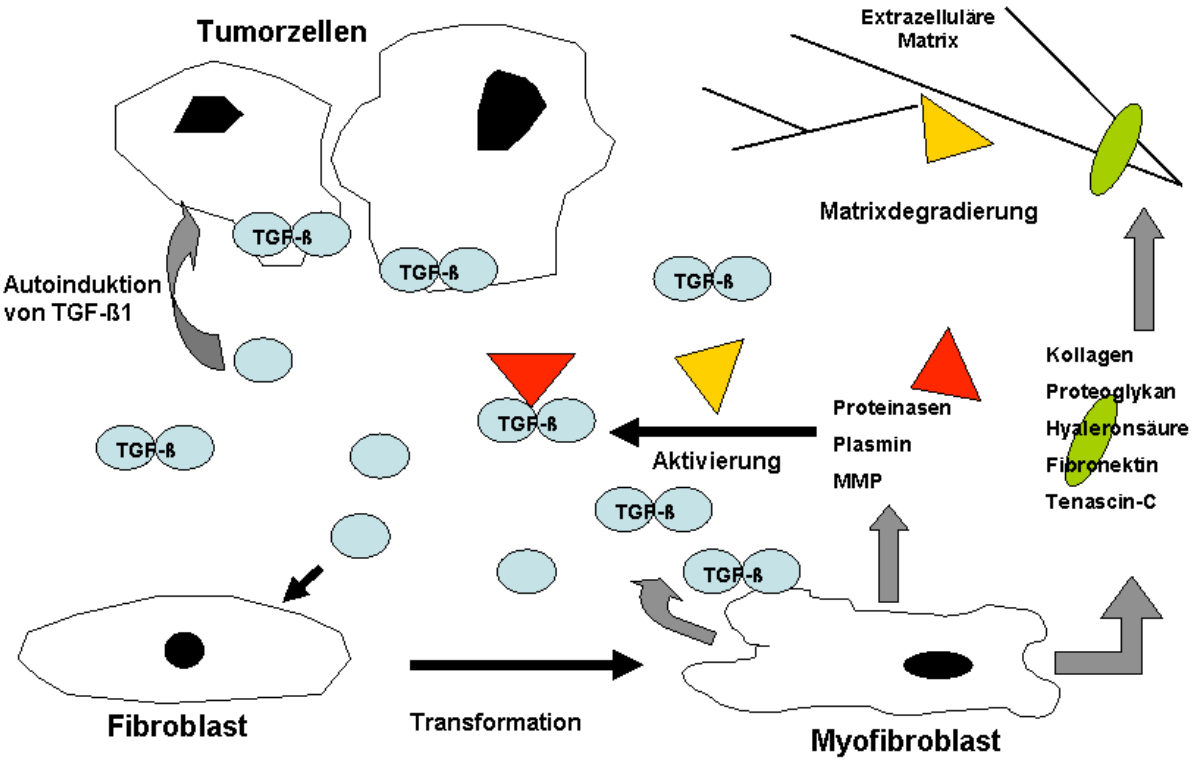


Abb. 3: TGF-ß moduliert die Stromakomposition hauptsächlich über die Myofibroblasten. Bedeutsam ist die Autoinduktion der TGF-ß1-Expression in den Tumorzellen.

### *1.4.2 Einfluss auf Angiogenese*

Die karzinominduzierte Ausbildung neuer Blutgefäße (Tumorneoangiogenese) ist für das Karzinomwachstum sehr wichtig [35]. Der Grund dafür ist, dass die Tumorzellmasse sehr schnell die nutritive Kapazität des bestehenden Gefäßnetzes erschöpft hat. Deswegen herrscht im Tumorgewebe in der Regel eine chronische Hypoxie. Für den Prozess der Tumorneoangiogenese sind verschiedene Mediatoren verantwortlich. Diese werden zum Teil von den Tumorzellen selbst, zum Teil auch von den Stromazellen (besonders den Makrophagen) gebildet. Einer dieser Mediatoren ist TGF-ß. Die TGF-ß-Rezeptoren ALK1 und Endoglin sind neben ALK5 auf Endothelzellen überexprimiert und aktivieren, im Gegensatz zu ALK5, SMAD1, SMAD5 und SMAD8, die Proliferation dieser Zellen an. Die Deletion von ALK1 und Endoglin führt bei Mäusen zu einer reduzierten Vaskulogenese mit Defekten der Endothelzellen und die Tiere versterben in der Embryonalentwicklung [52]. Deletionen im humanen Endoglin-Gen (strukturell mit dem TGFβ-Rezeptor III verwandt) sind Ursache der hereditären

hämorrhagischen Teleangiektasie, einer Erkrankung, die durch die Ausbildung vaskulärer Malformationen gekennzeichnet ist.

### *1.4.3 Immunsuppressive Eigenschaften*

TGF-ß fördert die Differenzierung von Leukozyten, hemmt ihre Proliferation und ihre Aktivierung. Seine Wirkung variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem sonstigen umgebenden Zytokinmilieu. TGF-ß wirkt als chemotaktischer Stimulus für die Leukozytenmigration und reguliert deren Homing durch die differentielle Expression von Zelladhäsionsmolekülen. TGF-ß1-Knock-out Mäuse versterben sehr früh an einer generalisierten Entzündungsreaktion. Dies unterstreicht die physiologisch bedeutsame antiinflammatorische Funktion von TGF-ß [50].

Obwohl im Tumorstroma eine Vielzahl von Immunzellen nachweisbar ist, kommt es doch nicht zu einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Für die Etablierung dieser Toleranz sind mehrere Mechanismen verantwortlich (Abb.4). Sowohl die Interferenz mit der Antigenpräsentation als auch die Wirkung über Tumorzell- T-Zellkontakt hemmt vor allem die Effektor-T-Zellen. Die von den Tumorzellen sezernierten Faktoren (TGF-ß, IL-13, IL-10, VEGF) wirken auf alle in den Tumor migrierenden Immunzellen und verändern deren Phänotyp. Besonders die antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen) sind nicht mehr zu einem effektiven T-Zellpriming fähig. Stattdessen werden tumortolerante und regulatorische T-Zellen gebildet [69].

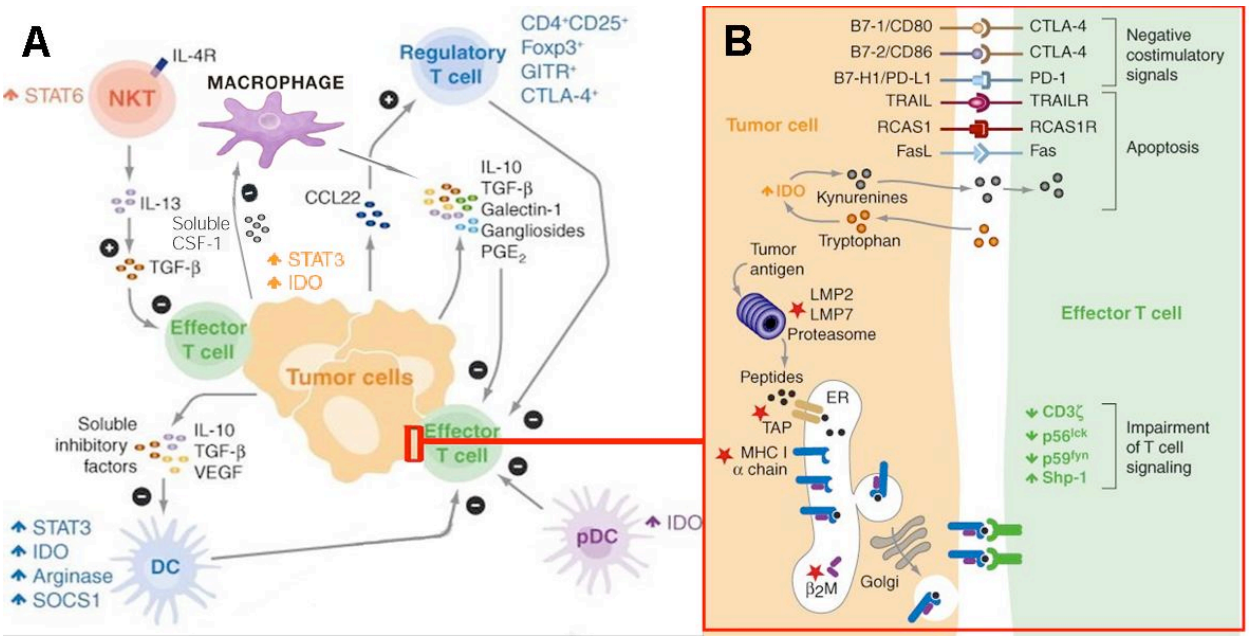


Abb. 4: Übersicht der immunsuppressiven Strategien des Tumors. A – Sezernierte Zytokine wirken auf alle Zellen im Stroma. B – Über Oberflächenrezeptoren wird die Effektor-T-Zellaktivität gebremst. NKT-Natural killer T cell; DC – dendritische Zelle; pDC – plasmozytische dendritische Zelle. Nach Rabinovich, GA et al. (2007).

Makrophagen sind wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und finden sich verteilt im Gewebe. Nach Aktivierung wirken sie zytotoxisch durch Phagozytolyse und die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen (ROI). Durch Zytokinsekretion generieren sie ein „danger"-Signal und rekrutieren weitere Immunzellen zum Entzündungsort. Als antigenpräsentierende Zellen modulieren Makrophagen die Aktivität des adaptiven Immunsystems.

Makrophagen sind in großer Zahl auch im Stroma von Karzinomen vorhanden [7]. Obwohl Makrophagen in einigen *in vitro*-Experimenten durch die Bildung von Sauerstoffradikalen in der Lage sind Tumorzellen zu lysieren [85], finden sich in vielen humanen Tumoren *in vivo* zahlreiche Makrophagen im Stroma, ohne dass dies mit regressiven Veränderungen der Tumorzellen einhergeht. Im Gegenteil gibt es Studien, die eine Korrelation zwischen hoher Makrophagendichte im Stroma und schlechter Prognose bei verschiedenen Karzinomentitäten (Mamma-, Prostata-, Lungen-, Ovarial-, Kolon-, Lungen und Zervixkarzinom) aufzeigten [11]. Aus Tumoren isolierte Makrophagen zeigen eine deutlich reduzierte Antitumoraktivität, können aber die Migration und Proliferation von Tumorzellen fördern [37]. Der Grund für die reduzierte Zytotoxizität tumorassoziierter Makrophagen liegt im Zytokinmilieu. TGF-ß kann die Bildung von ROI´s inhibieren [82]. Neben TGF-ß sollen die von den Tumorzellen sezernierten Zytokine IL-4, IL-10, Prostaglandin $E_2$ und CSF-1 für diese Phänotypveränderung verantwortlich sein [51].

## 1.5 TGF-ß1 Inhibition in der Tumortherapie

### *1.5.1 Bisheriger Stand*

Die gesicherte Rolle von TGF-ß1 bei der Tumorprogression hat dazu geführt, dass in verschiedenen experimentellen Ansätzen versucht wurde, die TGF-ß-Inhibition therapeutisch zu nutzen. Immunotherapeutische Strategien zielen darauf ab die tumorinduzierte Immuntoleranz zu durchbrechen. Alternativ dazu ist die Applikation von inhibitorischen Molekülen, anti-TGF-ß-Antikörpern oder neutralisierenden Fusionsproteinen, die die TGF-ß-vermittelten Effekte an den Tumorzellen sowie im Tumorstroma neutralisieren. Die TGF-ß-Produktion kann direkt durch antisense-Moleküle, spezifisch für TGF-ß-mRNA, gehemmt werden.

In verschiedenen Mausmodellen zu chemisch induzierten Karzinomen der Haut konnte die ambivalente Rolle von TGF-ß als hemmender und fördernder Faktor der Tumorentstehung *in-vivo* belegt werden. Die induzierte Überexpression von TGF-ß1 führte initial zu einer reduzierten Bildung von Hauttumoren der Mäuse, während in der Folge eine vermehrte Konversion dieser benignen Papillome in Karzinome mit beschleunigtem Wachstum zu beobachten war. 30% der Tumoren in den transgenen Tieren waren Spindelzellkarzinome, in den Kontrolltieren dominierten Plattenepithelkarzinome [16]. Die Spindelzellkarzinome hatten eine charakteristische EMT-Morphologie mit Verlust junktionaler Zelladhäsionsmoleküle. Dieser Phänotyp zeigte eine gesteigerte Invasivität und Metastasierung.

Die Konsequenzen einer TGF-ß-Inhibition unter therapeutischer Zielsetzung müssen wegen der beschriebenen Multifunktionalität dieses Wachstumsfaktors kritisch betrachtet werden. In der Phase, in welcher ein Karzinom klinisch in Erscheinung tritt, dürfte TGF-ß ganz vordergründig progressionsfördernde Eigenschaften haben. Dennoch wird es wegen der einem Karzinom innewohnenden genetischen und phänotypischen Heterogenität immer Tumorzellen geben, die unter TGF-ß in ihrer Proliferation gehemmt werden. Diese Zellen hätten dann durch eine TGF-ß-Blockade einen Selektionsvorteil.

Die meisten Daten zur Wirksamkeit von TGF-Inhibitoren kommen aus *in-vitro*- und Tierversuchen. Durch die Reduktion der TGF-ß-Produktion mittels antisense-RNA [26,57,66,92] konnte das Wachstum verschiedener Tumore (Gliome, Mammakarzinome, Mesotheliome) reduziert werden. Auch durch die Verwendung von anti-TGF-ß-Antikörpern [2,4,5,39,84] oder löslichen TGF-ß-Rezeptoren [8,89] ließ sich die Tumorprogression hemmen. Die Applikation eines anti-Endoglin-Immunotoxins führte durch eine Störung der Tumorvaskularisierung zu einem verzögerten Wachstum von Mammakarzinomzellen in SCID-Mäusen [74].

Auch die Kombination verschiedener Ansätze ist eine vielversprechende neue Therapieoption. So führte der Einsatz von TGF-ß-Antikörpern zusammen mit IL-2 zu einer reduzierten Tumorformation einer

hochmalignen Melanomzelllinie, die eine Resistenz gegenüber den Einzelsubstanzen zeigte [88]. Dies ist besonders interessant für Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren, die durch multiple Vorbehandlungen nur ein geringes Ansprechen auf die etablierten Therapieregime zeigen. Hier könnte möglicherweise durch den Einsatz einer anti-TGF-ß1-Strategie, analog zu den schon zugelassenen biologicals, in Kombination mit anderen Chemotherapeutika ein erneutes Therapieansprechen erreicht werden.

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es nur mit der Antisense-Strategie schon erste klinische Erfahrungen. Ein lösliches antisense-Oligonukleotid spezifisch für humane TGF-ß2-mRNA (AP12009) wurde lokal zur Behandlung von hochmalignen Gliomen eingesetzt. Da die initialen Ergebnisse gut waren (bei 7 von 24 Patienten kam es zur Stabilisierung der Erkrankung, 2 hatten eine komplette Remission) und keine signifikanten Nebenwirkungen auftraten, wird die Substanz jetzt in einer Phase IIb-Studie weiter untersucht. Ein anti-TGF-ß1-Oligonukleotid (AP11014) zur Behandlung von Kolon-, Prostata- und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom befindet sich in der präklinischen Prüfung [10].

## 1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss TGF-ß1 auf das Tumorwachstum an sich und die Interaktion von Makrophagen und Tumorzellen hat. Als Modell dient die kolorektale Adenokarzinomzelllinie HRT-18. Aus Vorarbeiten stand dazu eine mit einem anti-TGF-ß1-Ribozym transfizierte Variante dieser Zelllinie zur Verfügung, die eine reduzierte TGF-ß1-Expression zeigt.

Es soll zuerst an einem etablierten Makrophagen/Tumorzell-Kokulturmodell [37] überprüft werden, ob durch die TGF-ß1-Reduktion die ROI-Produktion (als Marker für zytotoxische Aktivität) von Makrophagen gesteigert werden kann.

Im anschließenden Tierversuch werden Xenograft-Tumoren in SCID-Mäuse (besitzen keine Makrophagen, T- und NK-Zellen) erzeugt. Hier soll untersucht werden, ob die Zugabe von humanen Makrophagen das Tumorwachstum beeinflusst und inwiefern dies durch TGF-ß1 moduliert wird. Aus Zellkulturversuchen ist bekannt, dass die Transfektion mit dem Ribozym keine Proliferationssteigerung induziert [48]. Dies soll im Tierversuch verifiziert werden.

Verglichen werden die in den SCID-Mäusen erzeugten Xenografts bezüglich Genexpression von TGF-ß1, Wachstumsgeschwindigkeit, Größe und Gewicht.

Die Tumoren werden auch histologisch und immunhistochemisch untersucht. Hier sollen das Wachstumsmuster, der Differenzierungsgrad und die Expression und Verteilung der verschiedenen Marker verglichen werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Reagenzien

| | |
|---|---|
| Agarose | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| AmpliTaq DNA Polymerase 5U/µl | Perkin Elmer, Branchburg, USA |
| Bacto Agar | Difco Laboratories, Detroit, USA |
| Bacto Hefeextrakt | Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich |
| Bacto Trypton | Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich |
| Chloroform | Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande |
| Citronensäure-Monohydrat | Merck, Darmstadt |
| 2´-Desoxyribonucleosid-5´-Triphosphate (dNTP´s), je 2,5mM | Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe |
| Diethylether | Merck, Darmstadt |
| DNA-Längenstandard 100bp | Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe |
| Essigsäure p.a. | Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande |
| Ethanol absolut | Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande |
| Ethidiumbromid | ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA |
| Ficoll | Pharmacia, Freiburg |
| Foetales Kälberserum (FKS) | PAN Biotech, Aidenbach |
| Formaldehydlösung 37% | Merck, Darmstadt |
| Hämalaunlösung (Mayer) | Dr. K. Hollborn&Söhne, Leipzig |
| Humanserum | PAA, Cölbe |
| Lucigenin | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| MMLV Reverse Transkriptase, 200 U/µl | Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe |
| 10 x PCR-Puffer, 15mM $MgCl_2$ | Perkin Elmer, Branchburg, USA |
| Percoll | Pharmacia, Freiburg |
| Propan-2-ol | Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande |
| Random Hexamere | Promega, Madison, USA |
| RNasin, 40 U/µl | Promega, Madison, USA |
| RPMI-1640 Medium | PAA, Cölbe |
| RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot | Gibco, Eggenstein |

| | |
|---|---|
| 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim |
| Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) | Merck, Darmstadt |
| Trizol Reagenz | Gibco, Eggenstein |
| Trypsin / EDTA – Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10-fach konzentriert) | Biochrom KG, Berlin |
| Tween 20 | SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Xylol | Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande |

## 2.2 Reagenz-Kits

| | |
|---|---|
| ChemMed Dako K 5005 | DakoCytomation, Hamburg |
| LightCycler – FastStart DNA | Roche, Mannheim |
| Maxi Prep Kit | Qiagen, Hilden |

## 2.3 Oligonukleotide

Tab. 3: Primer

| Bezeichnung | Sequenz | Länge des PCR-Produktes | Hersteller |
|---|---|---|---|
| TGF-ß1 sense | 5´-ggCTggAAgTggATCCACgA-3´ | 228 bp | TipMolbiol, Berlin |
| TGF-ß1 antisense | 5´-gCAggAgCgCACgATCATgTT-3´ | | |
| Aldolase sense | 5´-ATCCTggCTgCAcATgAgTC-3´ | 248 bp | BioTez, Berlin |
| Aldolase antisense | 5´-gCCCTTgTCTACCTTgATgC-3´ | | |

Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Primer Designer V3.0 (Scientific & Educational Software).

## 2.4 Antikörper

| | |
|---|---|
| CEA | DakoCytomation, Hamburg |
| CD-68 | DakoCytomation, Hamburg |
| MIB-1 | DakoCytomation, Hamburg |

## 2.5 Pufferlösungen, Kulturmedien

| | | | |
|---|---|---|---|
| **10 x Citratpuffer:** | 3,78 | g | Citronensäure |
| | 24,21 | g | Tri-Natriumcitrat-Dihydrat |
| | ad 1000,0 | ml | Aqua bidest |
| | | pH 6,0 einstellen | |
| **LB-Medium:** | 10 | g | Bacto Trypton |
| | 5 | ml | Bacto Hefe Extrakt |
| | 10 | ml | Natriumchlorid |
| | ad 1000,0 | ml | Aqua bidest |
| | | pH 7,0 einstellen | |
| **LB-Medium mit Agar** | 1000 | ml | LB-Medium |
| | 15 | g | Bacto Agar |
| **10 x PBS-Puffer:** | 82,3 | g | $Na_2HPO_4$ |
| | 23,5 | g | $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ |
| | 40 | g | NaCl |
| | ad 1000,0 | ml | $H_2O$ |
| | | pH 7,2 einstellen | |
| **50 x TAE-Puffer:** | 242,0 | g | Tris-Base |
| | 57,1 | ml | Essigsäure |
| | 100,0 | ml | EDTA 0,5M, pH 8,0 |
| | ad 1000,0 | ml | Aqua bidest |

pH 7,5 – 7,8 einstellen

autoklavieren

| | | | |
|---|---|---|---|
| **10 x TBS-Puffer:** | 9 | g | TRIS-Base |
| | 68,5 | g | TRIS-HCl |
| | 87,8 | | NaCl |
| | ad 1000,0 | ml | Aqua bidest |
| | | pH 7,4 einstellen | |

## 2.6 Biologisches Material

### *2.6.1 humane Zelllinien*

| | |
|---|---|
| **HRT-18** | Cell Lines Service, Heidelberg |
| kolorektale Adenokarzinomlinie | |

## 2.7 Verbrauchsmaterial

| | |
|---|---|
| 96-well Platten mit klarem Boden | Corning Costar, Bodenheim |
| Falconröhrchen 15 / 50 ml | Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich |
| Gewebekulturröhrchen TC, steril | Greiner Labortechnik |
| Handschuhe | SAFESKIN, Neufahrn |
| Kanülen | B. Braun, Melsungen |
| LightCycler-Kapillaren | Roche, Mannheim |
| Parafilm | American National Can, Menasha, USA |
| Petrischalen | Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich |
| Pipettenspitzen ohne Filter | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Pipettenspitzen mit Filter | Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| 0,5 / 1,5 / 2,0 ml | |
| Serologische Pipetten | Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich |
| Skalpell | Bard-Parker – Becton Dickinson, Hancock, USA |
| Spritzen 5 / 10 / 20 ml | B. Braun, Melsungen |
| Teflonfolie | Heräus, Osterode |

| | |
|---|---|
| Transferpipette | Sarstedt, Nümbrecht |
| Vitro-Clud | Langenbrinck, Emmendingen |
| Zellkulturflaschen 75 $cm^2$ | Falcon – Becton Dickinson, Le pont de Claix, Frankreich |
| Zellstoff | Hartmann, Heidenheim |

## 2.8 Geräte

| | |
|---|---|
| Abzug | Captair, Düsseldorf |
| Bakterienwerkbank | Clean Air, Göttingen |
| CASY1- Zellzähler | Schärfe System, Reutlingen |
| Dampfsterilisator Varioclav | H+P Labortechnik, München |
| Dampfsterilisator Technoclav 50 (für Bakterien) | Tecnomara, Fernwald-Steinbach |
| Elektrophoresekammern Agagel Maxi und Mini | Biometra, Göttigen |
| Elektrophoresenetzgerät Savant PS250 | Savant Instruments, Holbrook, USA |
| Gefriertruhe Revco –80°C | Kühn & Bayer, Nidderau |
| Geldokumentationsanlage | MWG Biotech, Ebersberg |
| Homogenisator | ART Labortechnik, Müllheim |
| Kühlschrank 4°C | Liebherr, Biberach an der Riß |
| Laborwaage | Sartorius, Göttingen |
| Lightcycler | Roche, Mannheim |
| Luminoskan RS luminometer | Labsystems, Helsinki, Finnland |
| Magnetrührer Variomag | H+P Labortechnik, München |
| Mikroskop | Leitz, Wetzlar |
| Mikrowelle | AEG, Nürnberg |
| pH-Meter | Mettler, Schwerzenbach, Schweiz |
| Photometer GeneQuant II | Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England |
| Pipetboy | Integra Biosciences, Fernwald |
| Pipetten | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Reinstwasseranlage Elix 10 / $MilliQ^{Plus}$ | Millipore, Eschborn |
| Schweißgerät Polystar 401 M | Rische + Herfurth, Hamburg |
| Thermocycler Trio-Thermoblock | Biometra, Göttingen |

| | |
|---|---|
| Tischzentrifuge Biofuge Pico | Heraeus, Hanau |
| Vortexer Reax 2000 | Heidolph, Schwabach |
| Wasserbad | GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Zellkulturmikroskop IMT-2 | Olympus Optical, Hamburg |
| Zellkulturbrutschrank BB 16 | Heraeus, Hanau |
| Zellkulturwerkbank | Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim |
| Zentrifuge | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge GS-6KR | Beckmann Instruments, Palo Alto, USA |
| Zentrifuge J2-MC | Beckmann Instruments, Palo Alto, USA |
| Zentrifugenröhrchen 50 ml | Beckmann Instruments, Palo Alto, USA |

## 2.9 Zellkultur

Für die Untersuchungen wurde die aus einem kolorektalen Karzinom gewonnene Zelllinie HRT-18 verwendet. Durch frühere Arbeiten stand eine durch stabile Transfektion erzeugte TGF-ß1 ribozymtragende Zellpopulation (Ribozym genannt) und eine leervektortragende Zellpopulation (Kontrolle genannt) der Ausgangszelllinie HRT-18 zur Verfügung. Diese wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die HRT-18-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit RPMI-Medium + 10% FKS kultiviert. Ribozym- sowie Kontroll-Zellen wurden im gleichen Medium, das aber zusätzlich noch 300 µg G418/ml enthielt, kultiviert. Durch diese Antibiotikaselektion wurde sichergestellt, dass nur jene transfizierten Zellen passagiert und für die folgenden Versuche verwendet wurden, welche das Antibiotika-Resistenzgen auf dem stabil transfizierten Vektor enthielten. Die Inkubation im Zellbrutschrank erfolgte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem 5%igen Volumenanteil $CO_2$.

Das Medium wurde alle 3-4 Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt. Bei ca. 80%iger Konfluenz wurden die Zellen wie folgt passagiert:

Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1xPBS-Puffer gespült. Nach erneuter Absaugung wurde 1 ml frisches Trypsin über den gesamten Flaschenboden verteilt. Im Anschluß erfolgte die Inkubation bei 37°C, bis sich alle Zellen vom Untergrund gelöst hatten. Der Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium + 10% FKS gestoppt. Von der resultierenden Zellsuspension wurden abhängig von Zelllinie und Wachstumsgeschwindigkeit 0,25 ml bis 5 ml in der Kulturflasche belassen und diese mit RPMI-Medium auf 10 ml aufgefüllt. Die entnommene Menge stand zur Anlage weiterer Zellkulturflaschen oder für Versuche zur Verfügung.

## 2.10 Kokulturversuch

### *2.10.1 Makrophagen*

Die Monozyten wurden aus Buffy-Coats (Institut für Transfusionsmedizin, Campus Mitte, Charité) wie folgt isoliert:

In Falconröhrchen wurden 15 ml Ficoll mit 35 ml Blut überschichtet und die Leukozyten durch ungebremste Zentrifugation (1500 Umdrehungen/Minute; 40 Minuten; 20°C) abgetrennt. Anschließend wurden mit einer Pasteur-Pipette die Leukozyten entnommen und in 50 ml 1x PBS-Puffer suspendiert. Zur Reinigung erfolgte eine Zentrifugation (1200 U/min; 10 min; 20°C) mit Verwerfung des Überstandes. Das entstandene Pellet wurde dann noch zweimal in der beschriebenen Weise gewaschen und anschließend in 3 ml 1xPBS-Puffer aufgenommen.

Die Abtrennung der Monozyten erfolgte mit einem Percoll-Gradienten.

Zu dessen Herstellung wurden 21 ml Percoll und 18 ml 2x PBS-Puffer gemischt und ungebremst zentrifugiert (14000 U/min; 30 min; 20°C). Der Percoll-Gradient wurde mit der Leukozytensuspension vorsichtig überschichtet und ungebremst zentrifugiert (1600 U/min; 40 min; 20°C). Die isolierten Monozyten wurden in 50 ml 1x PBS-Puffer suspendiert und wiederum durch Zentrifugation (1200 U/min; 10 min; 20°C) dreimal gewaschen. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-1640-Medium + 10% Humanserum(HS) resuspendiert und die Zellkonzentration mit einem Zellzählgerät bestimmt. Die Monozyten wurden in einer Konzentration von $2x10^6$ Monozyten/ml in einem Teflon-Beutel eingeschweißt und fünf Tage im Zellbrutschrank (37°C, 5%iger $CO_2$-Anteil) kultiviert. Unter diesen Bedingungen reifen die Monozyten zu Makrophagen.

### *2.10.2 Anzucht der multizellulären Tumorspheroide (MCTS)*

Die Tumorzellen wurden in einer Konzentration von $10^5$ Zellen/ml in mit 50 µl 0,7 %iger Agarose (Agarose in farblosem RPMI-1640-Medium) beschichteten 96-well-Platten mit klarem Boden ausgesät. Die HRT-18- und die Kontroll-Zellen wurden in farblosem RPMI-Medium plus 10% HS, die Ribozym-Zellen in farblosem RPMI-Medium aufgenommen. Pro Kavität wurden 100 µl Tumorzellen ausgesät und vier Tage im Brutschrank kultiviert. Nach 4 Tagen wurde mikroskopisch die Bildung der MCTS überprüft.

### *2.10.3 Kokultur und Messung der Radikalbildung*

Die Messung der ROI wurde nach der von Siegert [76] beschriebenen Methode durchgeführt.

Zum Ernten der Makrophagen wurde der Teflonbeutel mit den Makrophagen 15 Minuten auf Eis gelegt, um die Makrophagen von der Innenfläche zu lösen. Der Beutelinhalt wurde in ein Falconröhrchen überführt und anschließend mittels eines Zellzählgerätes die Makrophagenkonzentration bestimmt. Danach wurden die Makrophagen in einer Konzentration von $2x10^6$ Zellen/ml mit farblosem RPMI-Medium verdünnt und die MCTS mit 50 µl der Zellsuspension pro well überschichtet, was einer Ratio von 10 Makrophagen pro ursprünglich angesetzter Tumorzelle entspricht. Diese Makrophagen/Tumorzellen-Kokultur wurde für 24h im Brutschrank kultiviert.

Die Messung der Sauerstoff-Radikale (ROI) erfolgte an einem Luminometer bei 37°C:

Dazu wurden 100µM Lucigenin in jede Kavität zu den Zellen gegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation der ROI-Bildung mit 0,1 µM TPA. Zur Kontrolle wurden bei jeder Messung 16 wells mit unstimulierten Makrophagen mitgeführt (ohne Zugabe von TPA).

Die ROI-Bildung wurde über den Zeitraum von einer Stunde alle fünf Minuten gemessen und in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Für die Auswertung wurde der in der Messzeit erreichte Maximalwert (RLU) verwendet.

Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt und die Messdaten zusammen ausgewertet.

## 2.11 Erzeugung von Tumoren in SCID-Mäusen

Mit Zellen der verschiedenen Populationen (HRT-18, Ribozym) wurden Tumoren in 6 Wochen alten, weiblichen SCID-Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld) erzeugt. Die Versuchsprotokolle wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt.

Während der Dauer des Versuches befanden sich die Mäuse in einem Tierstall mit Tierversuchs- und S1-Genehmigung und wurden von professionellen Tierpflegern betreut.

Der Versuch bestand aus vier Gruppen mit jeweils fünf Mäusen. Dabei wurden entweder Tumorzellen allein oder in Kombination mit Makrophagen injiziert. Die genaue Aufteilung und die applizierte Zellmenge sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden wie unter 2.2.1. und 2.2.2.1. beschrieben präpariert, in RPMI ohne Phenolat aufgenommen und den Mäusen über der Flanke subkutan appliziert.

Tab. 4: Applizierte Zellen in den Gruppen 1-4

| Gruppe | HRT-18 | HRT-Ribozym | Makrophagen | Summe |
|---|---|---|---|---|
| **1** | $2{,}5x10^6$ Zellen | | 0 | $2{,}5x10^6$ Zellen |
| **2** | | $2{,}5x10^6$ Zellen | 0 | $2{,}5x10^6$ Zellen |
| **3** | $2{,}5x10^6$ Zellen | | $2{,}5x10^5$ Zellen | $2{,}75x10^6$ Zellen |
| **4** | | $2{,}5x10^6$ Zellen | $2{,}5x10^5$ Zellen | $2{,}75x10^6$ Zellen |

Zur Dokumentation des Tumorwachstums wurde zweimal wöchentlich Länge und Breite des Tumors gemessen und durch Einsetzen in die Formel: **Vol = 0,5236(W+L)(WxL)/2** das Tumorvolumen näherungsweise bestimmt. Nach 34 Tagen wurden die Mäuse getötet und damit der Versuch beendet. Die Tumoren wurden herauspräpariert, gewogen und fotografisch dokumentiert. Eine Hälfte jedes Tumors wurde schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert, die andere Hälfte des Tumors in Formalin fixiert. Anschließend wurden die Tiere komplett seziert und die Organe in Formalin fixiert.

## 2.12 TGF-ß1-Expressionsanalyse des Tumorgewebes

### *2.12.1 Isolierung der mRNA*

Von den bei -80 °C gelagerten Tumorproben wurde jeweils ein circa 5x5x5 mm großes Stück entnommen, in ein mit 4 ml Trizol gefülltes Röhrchen gegeben und anschließend mit einem Homogenisator zerkleinert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 800 µl Chloroform. Dieses wurde durch kräftiges Schütteln suspendiert und das Gemisch nach einer Inkubationszeit von drei Minuten bei 11000 rpm und 4 C° für 15 Minuten zentrifugiert. Die durch die Zentrifugation entstandene obere wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 2 ml Isopropanol versetzt. Anschließend wurde das Gemisch gevortext, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 11000 rpm 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde vorsichtig der Überstand entfernt, um das entstandene RNA-Pellet nicht zu zerstören. Dieses Pellet wurde in 4 ml 75%igem Ethanol resuspendiert und die Probe bei 8000 rpm und 4°C fünf Minuten zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das RNA-Pellet für 5-10 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 200 µl RNAse-freiem Wasser suspendiert.

Die RNA-Proben wurden durchgängig bei -80°C gelagert.

### 2.12.2 Kontrolle der RNA-Qualität und Konzentrationsbestimmung

Um den Erfolg der RNA-Isolierung zu überprüfen, wurde die RNA nach Zugabe von Aqua dest. und Ladungspuffer auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und dieses nach einer Elektrophorese auf einem UV-Transilluminator betrachtet. Gelang die Darstellung ribosomaler Banden, wurde eine erfolgreiche RNA-Isolierung angenommen.

Die anschließende Bestimmung der RNA-Konzentration beruht auf der Messung des Absorptionsmaximums von RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Von jeder Probe wurden zur Doppelbestimmung zwei 1:50 Verdünnungen hergestellt, deren Absorption bei 260 nm im UV-Spektrometer bestimmt wurde. Aus dem Mittelwert ergibt sich unter Einbezug des Verdünnungsfaktors und eines weiteren, für einzelsträngige Nukleinsäuren geltenden Faktors von 40 µg/µl die Probenkonzentration.

### 2.12.3 RT-PCR

Mittels reverser Transkription wurde die aus den Tumoren isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, die als Basis für die folgende PCR diente. Hierzu wurde je Ansatz das 1 µg RNA entsprechende Volumen in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und auf 5 µl ergänzt. Als Negativkontrolle wurden 5 µl Aqua dest. verwendet. Hinzu kamen jeweils 15 µl des Master-Mixes, der in einem getrennten Gefäß für alle Proben gemeinsam vorbereitet wurde und wie folgt zusammengesetzt war:

7 µl $H_2O$ (steril)
2 µl 10 x PCR-Puffer
2 µl dNTP
2 µl Hexamere
1 µl RNasin (40 U/µl)
1 µl MMLV (200 U/µl)

Die RT-PCR wurde mit folgendem Thermocyclerprogramm durchgeführt:

| | | |
|---|---|---|
| 10 | min | 22°C |
| 45 | min | 42°C |
| 5 | min | 95°C |

Anschließend wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

### 2.12.4 Erzeugung des externen Standards

Um eine Quantifizierung der Genexpression in den Tumorproben durchführen zu können, musste für die Lightcycleranalytik ein externer Standard bekannter Konzentration gewonnen werden. Hierzu wurden jeweils TGF-ß1 und Aldolaseplasmide, die das TGF-ß1- oder Aldolaseamplifikat und ein Ampicillin-Resistenzgen enthielten, in E.coli eingebracht. Nachfolgend wurden diese Bakterien auf einer Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und für 24 Stunden im Brutschrank vermehrt. Am folgenden Tag wurden Kolonien gepickt und in mit je 3 ml LB-Medium (+ 3 µl Ampicillin) gefüllte Kolben übertragen und für 6 Stunden im Schüttelbrutschrank kultiviert. Anschließend wurde jeweils die Hälfte in einen größeren Kolben überführt und mit 250 ml LB- Medium (+ 250 µl Ampicillin) aufgefüllt. Durch Zugabe des Ampicillins wurde sichergestellt, dass sich nur die plasmidtragenden Bakterien vermehren.

Nach 24 h erfolgte aus diesen Ansätzen die Isolierung der Plasmide. Diese wurde mittels eines Kits (Maxi Prep) nach der entsprechenden Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Der Plasmidgehalt der Isolate wurde mittels Spektrometrie quantifiziert und die Plasmide in Aliquots von 5 µl in Eppendorfgefäßen bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.12.5 Quantifzierung am Light-Cycler

Die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) am Lightcycler bietet gegenüber der konventionellen PCR im Thermocycler drei entscheidende Vorteile:

1. Der im Mastermix vorhandene Farbstoff bindet an die im Reaktionsverlauf gebildete doppelsträngige DNA und emittiert ein spezifisches Fluoreszenzsignal. Eine Zunahme der DNA bedeutet auch eine Zunahme des Farbsignals. Werden im gleichen Versuch Proben mit bekannter Konzentration der untersuchten DNA mitgeführt, kann über diese Proben mit Hilfe

einer Standardkurve der Ausgangs-DNA-Gehalt in der unbekannten Probe bestimmt werden. (Prinzip des externen Standards)

2. Durch die Durchführung einer Schmelzpunktanalyse lässt sich nach Abschluss der PCR feststellen, ob auch nur das gewünschte PCR-Produkt gebildet wurde. Das heißt, Amplifikation und Detektion können in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden; Kontaminationen werden ausgeschlossen.
3. Durch die im Vergleich zur konventionellen PCR höhere Sensitivität lassen sich auch kleinste DNA-Mengen spezifisch nachweisen.

Als Template wurden je Probe 2 µl aus der reversen Transkription verwendet, die um 18 µl Master-Mix, in einem getrennten Gefäß für alle Proben vorbereitet, ergänzt wurden. Der Master-Mix hatte folgende Zusammensetzung:

| | Volumen [µl] | Endkonzentration |
|---|---|---|
| $H_2O$ (steril) | 12,4 | - |
| $MgCl_2$-stock | 1,6 | 3 mM |
| LightCycler-Mix | 2 | 1x |
| forward Primer (8 µM) | 1,0 | 0,4 µM |
| reverse Primer (8 µM) | 1,0 | 0,4 µM |
| RT-PCR-Produkt | 2 | - |
| Gesamtvolumen | 20 | - |

Zusätzlich wurden in jedem Lauf eine Negativkontrolle (2 µl PCR-Wasser als Template) und fünf Plasmidproben für eine externe Standardreihe mitgeführt. Als Templates für die Standardreihe wurden hier definierte Konzentration der TGF-ß1- bzw. Aldolase-Plasmide eingesetzt, beginnend bei $10^8$ Kopien mit einer dekadischen Abnahme der Konzentration bis $10^4$ Kopien des jeweiligen Amplifikats. Aus diesen Proben berechnete das Programm eine Eichkurve für die Bestimmung des spezifischen DNA-Gehaltes in den Tumorproben. Als Reaktionsgefäße für die PCR dienten Glaskapillaren, die nach Zugabe des Mastermix+Probe-Gemisches verschlossen und kurz zentrifugiert (800 U/min; 30 sec) wurden. Anschließend wurden die Kapillaren in den LightCycler eingesetzt. Die Ansätze durchliefen im LightCycler folgendes Programm:

- **Denaturierung für 10 min bei 95°C**
- **Amplifizierung TGF-beta1 (Aldolase)**

| **Parameter** | **Wert** | | | |
|---|---|---|---|---|
| Zyklen<br>Analysemodus | 40<br>Quantifizierung | | | |
| | **Segment 1** | **Segment 2** | **Segment 3** | **Segment 4** |
| Zieltemperatur (°C) | 95 | 55 (58) | 72 | 88 |
| Inkubationszeit (s) | 15 | 5 | 10 | 0 |
| Temperaturänderung (°C/s) | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Fluoreszenzmessung | Nein | Nein | Nein | Einmalig |

- **Schmelzkurvenanalyse**

| **Parameter** | **Wert** | | |
|---|---|---|---|
| Zyklen<br>Analysemodus | 1<br>Schmelzkurve | | |
| | **Segment 1** | **Segment 2** | **Segment 3** |
| Zieltemperatur (°C) | 95 | 65 | 95 |
| Inkubationszeit (s) | 1 | 10 | 1 |
| Temperaturänderung (°C/s) | 20 | 20 | 0,1 |
| Fluoreszenzmessung | Nein | Nein | Kontinuierlich |

Zum Abschluß wurde auf eine Zieltemperatur von 40°C bei einer Inkubationszeit von 30 s herunter-gekühlt.

In jeder Probe wurde zweimal in getrennten Läufen der TGF-beta1- bzw. Aldolasegehalt quantifiziert und anschließend der Quotient aus TGF-ß1- und Aldolasegehalt für jede Probe berechnet. Aldolase gilt als sogenanntes „house-keeping-gene“, das weitgehend konstant in den Zellen exprimiert wird. Damit ermöglicht es die Umrechnung der absoluten TGF-ß1-mRNA-Werte in relative Werte (als Quotient aus TGF-ß1-mRNA und Aldolase-mRNA) für die Genexpressionsanalyse.

Nur Läufe mit einem Fehlerquotienten < 0,05 und einer Amplifikationseffizienz >1,8 wurden für die Analyse verwendet.

## 2.13 Immunhistologie

### *2.13.1 Färbung der Schnitte*

Zur histologischen Untersuchung wurden die formalinfixierten Tumorproben in Paraffin eingebettet und Feinschnitte (2 µm) angefertigt. Von jeder Probe wurde durch das Routinelabor des Instituts für Pathologie eine HE- Färbung angefertigt, um die allgemeine Tumormorphologie zu beurteilen.

Die HE-Färbung der entparaffinierten Schnitte erfolgte mit Hämalaunlösung nach Mayer für ca. 1 min und anschließender Färbung mit saurem Eosin (1%) für ca. 3 min.

Für die Immunhistologie wurden die auf Objektträger (SuperFrostPlus) aufgebrachten Schnitte über Nacht bei 50 °C im Brutschrank getrocknet. Das Paraffin der Schnitte wurde durch dreimaliges Waschen zu je 10 min in Xylol, und nachfolgend in absteigender Ethanolreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 80%, 70% Ethanol für jeweils 5 min) entfernt. Anschließend sind die Proben in Aqua dest. gewässert worden. Im nächsten Schritt wurden sie mit Citratpuffer (pH=6,0) erhitzt und 5 min im Schnellkochtopf bei Überdruck gekocht, um die Epitope für den Antikörper besser zugänglich zu machen (Demaskierung).

Bis zur Applikation des entsprechenden Primärantikörpers wurden die Gewebsschnitte in TBS-Pufferlösung abgekühlt.

Die Proben wurden nun 90 min mit dem primären monoklonalen Antikörper in Verdünnung von 1:1000 (MIB-1) bzw. 1:200 (CD-68) in der Antikörper-Verdünnungslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/Tween erfolgte daraufhin die Inkubation mit dem Zweitantikörper und der alkalischen Phosphatase des Biotin Streptavidin Amplified Detection Systems für je 20 min bei Raumtemperatur. Die Färbung erfolgte gemäß den Arbeitsanweisungen des verwendeten Kits (ChemMed Dako K 5005) bei jeweiligem Vergleich mit einer Positiv- und Negativkontrolle. Zur Kontrastierung wurden die Zellkerne zuletzt für ca. 1 min in Hämalaunlösung nach Mayer gegengefärbt und abschließend nochmals gewässert. Am Ende sind die Schnitte mit Vitro-Clud und entsprechenden Deckgläschen eingedeckt worden.

### *2.13.2 Histologische Auswertung der Tumoren*

Als erstes erfolgte eine allgemeine Bewertung der Tumormorphologie anhand der HE-gefärbten Präparate. Gleichzeitig wurde hier der Anteil der Nekrose am Tumorquerschnitt quantifiziert. Bei der MIB-1-Färbung wurde am Lichtmikroskop das Verhältnis von gefärbten zu ungefärbten Kernen ausgezählt und als Prozentangabe der gefärbten Zellkerne für die Erstellung eines Proliferationsindexes verwendet. Die CD-68-Färbung diente der Darstellung von Makrophagen. Es wurde bestimmt, wie viele Makrophagen

durchschnittlich in einem HPF (40fache Vergrößerung) bei zehn pro Schnitt ausgezählten HPF zu finden sind. Die erhobene histologische Auswertung wurde durch einen Pathologen überprüft. Bei Unstimmigkeiten legte man einen Bewertungskonsens fest.

## 2.14 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde das Statistikprogramm SPSS 11.0 verwendet. Es kamen durchgängig nichtparametrische Tests zur Anwendung, da die Gruppen bei der Radikalbildung nicht normal verteilt waren und die im Tierversuch generierten Daten eine kleine Fallzahl aufwiesen. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Vorarbeiten: Erzeugung des Ribozymklons

Die Auswahl eines TGF-ß1-mRNA spaltenden Ribozyms anhand der Sekundärstruktur der humanen TGF-ß1-mRNA, die Überprüfung der Spaltungseffizienz des Ribozyms *in vitro*, sowie die Etablierung stabil Ribozym-exprimierender Zellklone waren Grundlage für die durchgeführten Experimente dieser Arbeit [48]. Nachfolgend werden die genannten Arbeitsschritte kurz erläutert. In Abb. 5 sind das ausgewählte Ribozym und die entsprechende TGF-ß1-mRNA schematisch dargestellt. Die Spaltungsaktivität dieses Ribozyms wurde *in vitro* nachgewiesen. Zur Generierung Ribozym-exprimierender Zellklone wurde das Ribozym in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert und in die humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie HRT-18 stabil transfiziert. Nach Etablierung von Zellklonen wurde anhand der TGF-ß1-Expression ein Zellklon (Ribozym genannt) mit einer ca. 60 % verminderten TGF-ß1-Expression gegenüber der parentalen Zelllinie HRT-18 ausgewählt. Als Kontrolle diente ein Zellklon (Kontrolle genannt), der nur mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert worden war. Diese beiden Zellklone, sowie die Wildtypzelllinie HRT-18 bildeten den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

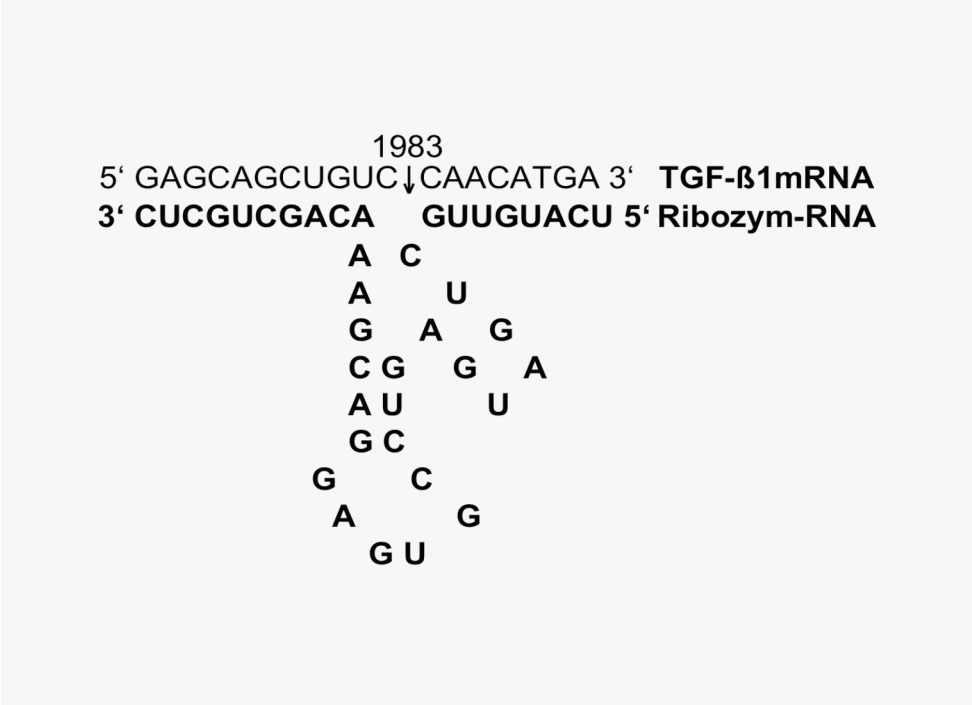


Abb. 5: Schematische Darstellung des „hammerhead“-Ribozyms. Die angelagerte TGF-ß1-mRNA wird an Position 1983 nach einem GUC-Motiv gespalten.

Bei dem verwendeten TGF-ß1-mRNA-spaltenden Ribozym handelt es sich um einen Vertreter aus der Gruppe der „hammerhead“-Ribozyme, der Familie mit den kleinsten natürlich vorkommenden Ribozymen. Diese haben als katalytische RNA die Fähigkeit, mRNA spezifisch zu spalten. Die „hammerhead“-Ribozyme sind die experimentell zur Zeit am häufigsten verwendete Ribozymklasse und spalten nach NUH-Triplets, wobei N irgendeine Nukleinsäure, U konserviert und H eine andere Nukleinsäure außer Guanin ist. Dabei spalten sie besonders effektiv nach GUC- oder AUC-Motiven [72]. Dies trifft auch für das hier verwendete Ribozym zu (siehe Abbildung 1).

## 3.2 ROI-Bildung im Kokulturmodell

Da aus der Literatur bekannt ist, dass kolorektale Karzinomzellen TGF-ß1 produzieren und auf diese Weise die zytotoxischen Eigenschaften von Makrophagen hemmen können, wurde untersucht, ob die Transfektion der Tumorzellen mit dem TGF-ß1-Ribozym deren Interaktion mit menschlichen Makrophagen beeinflußt. In Voruntersuchungen zeigte sich, dass HRT-18-Zellen sowie rekombinantes TGF-ß1 die ROI-Produktion von Makrophagen inhibiert [76]. Die ROI´s sind Mediatoren der tumoriziden Makrophagenaktivität (vgl. Abb. 6).

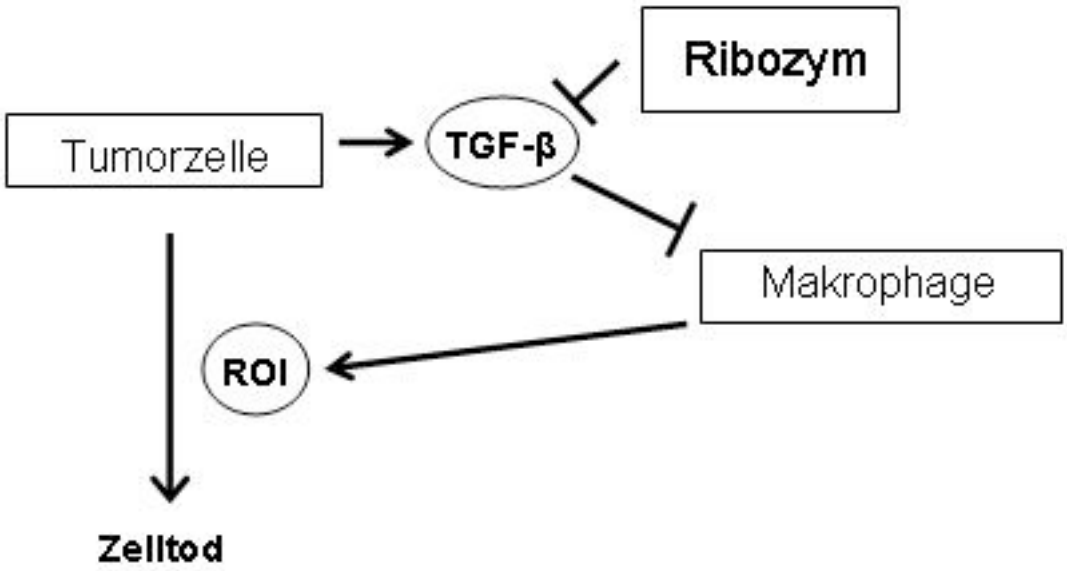


Abb. 6: Modell der ROI-Hemmung durch TGF-ß.

Vor Beginn des Tierversuches wurde die Fähigkeit von Makrophagen zur Bildung von Sauerstoffradikalen (ROI) nach Kokultur mit den drei Tumorzellklonen in drei unabhängigen Versuchen bestimmt und die Messwerte zusammen ausgewertet (Abb. 7). Es zeigte sich, dass die 24stündige Inkubation von Makrophagen mit HRT- Zellen initial eine statistisch signifikante Reduktion der ROI-Bildung von 20% bewirkt (p<0,001). Diese Suppression konnte durch den Einsatz von Ribozymzellen wieder aufgehoben werden (p<0,001).

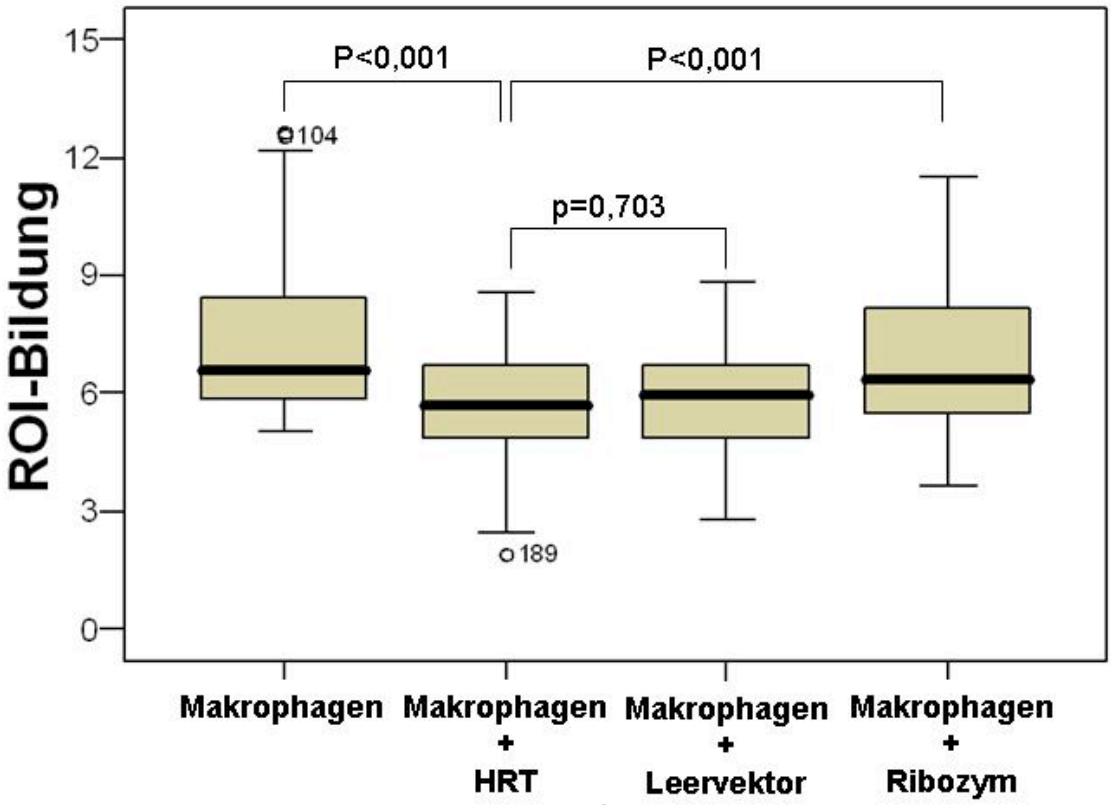


Abb. 7: ROI-Bildung.

## 3.3 Tumorwachstum im Tierversuch

Die vielfältigen auto- und parakrinen Effekte von TGF-ß1 machen es schwierig, die Veränderungen im Wachstumsverhalten der Tumoren nach TGF-ß1-Inhibition vorherzusagen. Das Gesamtergebnis setzt sich aus dem Proliferationsverhalten der Tumorzellen (siehe 1.3.5), dem Einfluss auf immunkompetente Zellen und den induzierten Veränderungen im Tumorstroma zusammen. Dies ist in Abb. 8 dargestellt.

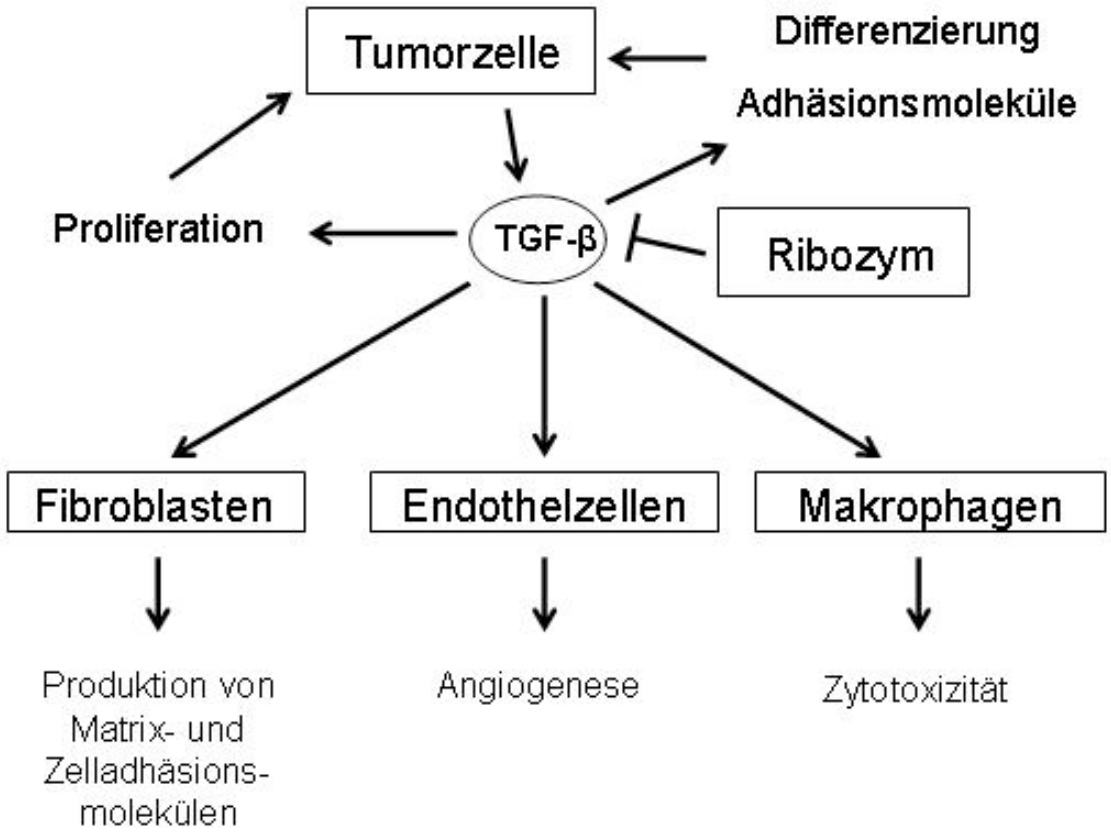


Abb. 8: Mögliche Ribozymeffekte auf Tumor- und Stromazellen.

Um den Einfluss der TGF-ß1-Sekretion auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie von Tumorzellen allein und in Kokultur mit humanen Makrophagen zu untersuchen, wurde durch subkutane Injektion von Tumorzellen der parentalen Zelllinie HRT-18, des Ribozymklons, HRT-18 parental plus Makrophagen (im Verhältnis 10:1) und des Ribozymklons plus Makrophagen (ebenfalls 10:1) in SCID-Mäusen Tumorwachstum induziert und dieses verglichen (siehe Tab. 4).

In jedem der 20 Versuchstiere führte die Applikation der Tumorzellen zum Wachstum eines subkutanen Tumors (Abb. 9). Die Tumoren wurden zweimal pro Woche manuell gemessen und daraus das Tumorvolumen berechnet.

Zu Beginn des Versuches wuchsen die Ribozymtumoren sehr viel schneller als die Kontrolltumoren. Dieser Wachstumsrückstand verkleinerte sich in der zweiten Hälfte des Versuches. Die Tumoren, die in Kokultur mit Makrophagen wuchsen, entwickelten sich langsamer als die jeweils vergleichbare Monokultur. Es dauerte vier Tage länger, bis bei diesen Tieren Tumoren palpabel waren. Auch im Vergleich der Kokulturtumoren zeigte sich, dass die ribozymtransfizierten Zellen erst schneller wuchsen als die HRT-Kokulturen. In der zweiten Hälfte des Experimentes entwickelten sich die HRT-Tumoren schneller und deshalb nährten sich die Wachstumskurven der Mono- als auch der Kokulturen einander an. In der paarweisen Varianzanalyse zeigt sich, dass die Ribozymkokulturtumoren signifikant langsamer wuchsen als die Ribozymtumoren, während im Vergleich der Wildtyptumoren dieser Unterschied keine Signifikanz erreichte.

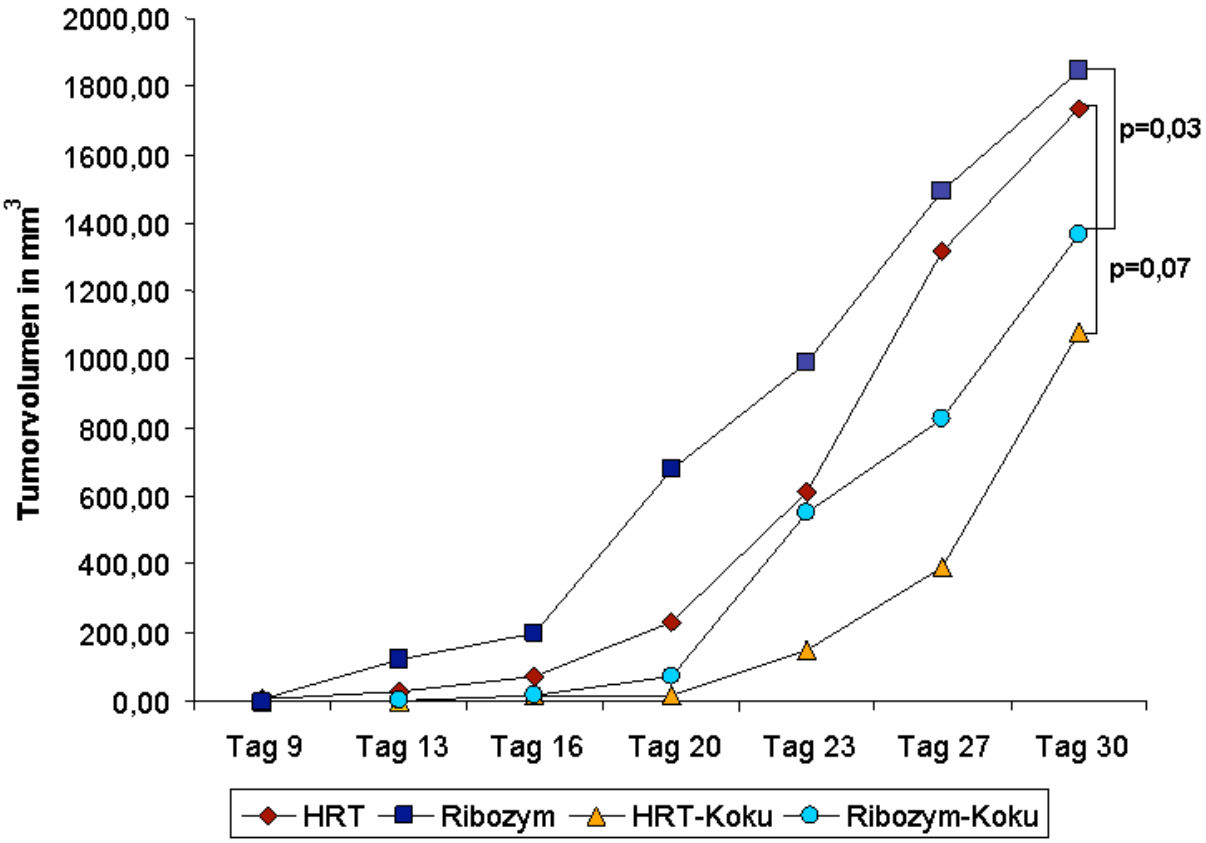


Abb. 9: Tumorwachstum im Tierversuch.

Am Tag 34 wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entnommen. Diese wurden gewogen und danach mittels RT-PCR und Immunhistochemie weiter untersucht.

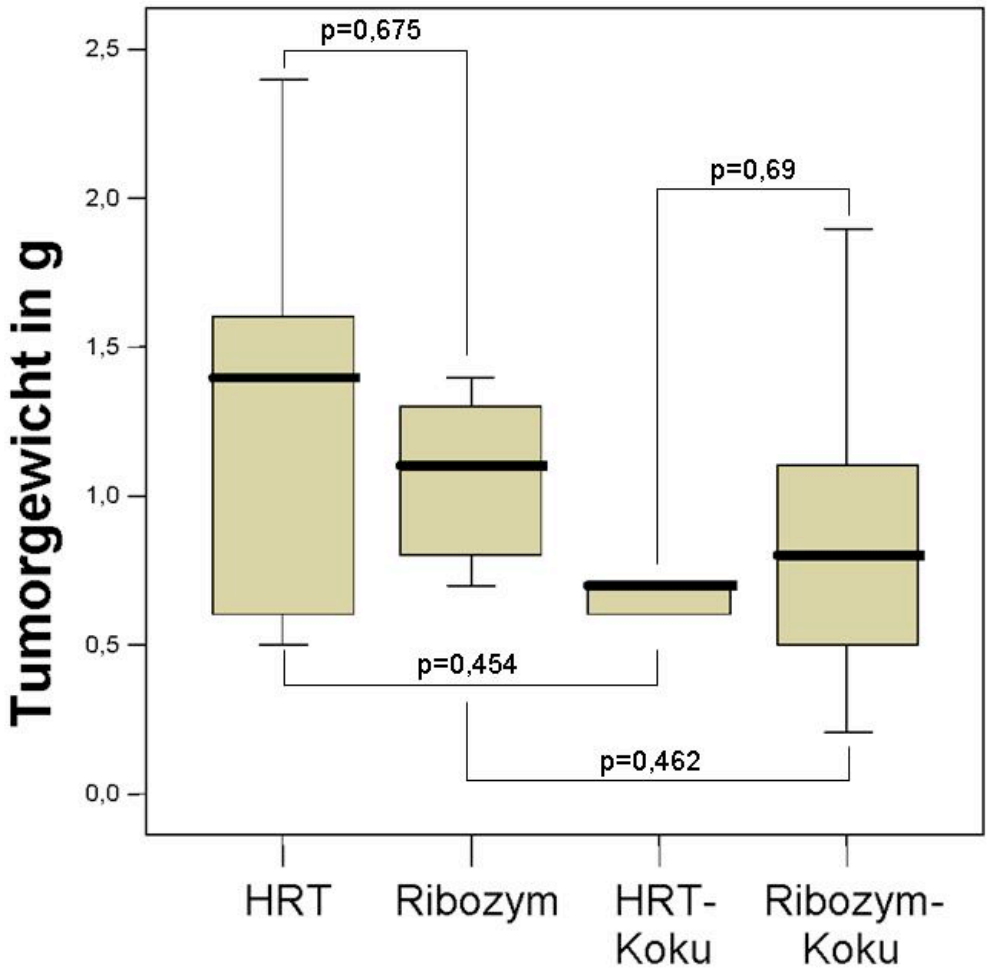


Abb. 10: Tumorgewichte am Versuchsende.

Abb. 10 zeigt die am Versuchsende gemessenen Tumorgewichte. Bei den Monokulturen waren die Kontrolltumoren schwerer als die Ribozymtumoren, während bei den Kokulturtumoren die Ribozymtumoren schwerer waren. Im Vergleich mit der Monokultur sind die Kokulturtumoren leichter. Sowohl im paarweisen Vergleich der Wildtyptumoren mit den Ribozymtumoren (Abb. 10), als auch im Vergleich der transfizierten mit den untransfizierten Tumoren (p=0,568) sind keine signifikanten Unterschiede im Tumorgewicht nachweisbar.

Die mit der unter 2.2.3 angegebenen Formel bestimmten Tumorvolumina korrelieren signifikant mit den Tumorgewichten (r=0,74; p<0,01). Damit ist die hier verwendete Methode zur Bestimmung der Tumorvolumina einfach und zuverlässig anwendbar, um das Tumorwachstum im Verlauf eines solchen Experimentes zu bestimmen.

Nach makroskopischer und histologischer Untersuchung fanden sich bei keinem der Versuchstiere Anzeichen für eine Metastasierung.

## 3.4 TGF-ß1 Expression im Tierversuch

Aus dem Tumorgewebe wurde mRNA extrahiert, um mittels quantitativer RT-PCR-Analyse die TGF-ß1-mRNA Expression zu vergleichen.

Es zeigte sich eine ca. 30%ige Reduktion der TGF-ß1-Expression in den Ribozymtumoren im Vergleich zu den Kontroll-Tumoren. In Abbildung 11 ist dies als Vergleich der Ribozym-Zellen mit den HRT-Zellen dargestellt. Die erzielte Reduktion erreicht keine statistische Signifikanz (p=0,151). Die Zugabe der Makrophagen erhöht signifikant die TGF-ß1-Expression in den Ribozymtumoren, während es bei den HRT-Tumoren zu einer leichten Reduktion kommt (p=0,421 für Kontrolle; p=0,008 für Ribozym).

In einem ähnlichen Experiment, das vor diesem Versuch durchgeführt wurde, zeigte sich ebenfalls eine 30%ige Reduktion der TGF-ß1-Expression durch das Ribozym. Da bei diesem Versuch die Tumoren bereits nach 27 Tagen entnommen wurden, konnten diese Ergebnisse nicht in die statistische Berechung einbezogen werden.

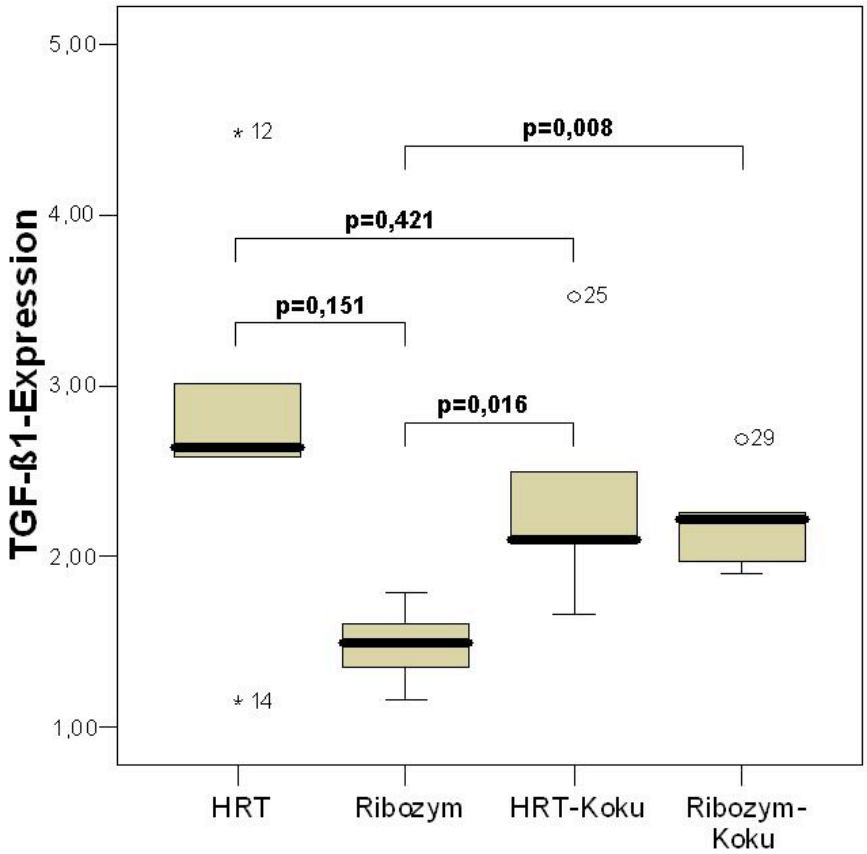


Abb. 11: TGF-ß1-Expression in den Xenografts.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der TGF-ß1-Expression und dem Tumorgewicht (p=0,371), sowie dem Tumorvolumen (p=0,324).

## 3.5 Histologie der Tumoren

### *3.5.1 Tumormorphologie und CEA-Produktion*

Die Wildtyptumoren zeigten in der HE-Färbung das Bild eines schlecht differenzierten Adenokarzinoms. Es dominieren solide, spindelzellige Anteile, nur vereinzelt finden sich Siegelringzellen, ganz spärlich auch kleine, muzinhaltige Drüsen. Die Zellen besitzen polymorphe Kerne mit aufgelockertem Chromatin und prominenten Nukleolen. Demgegenüber sind die Ribozymtumoren besser differenziert. Die drüsigen Anteile sind deutlich stärker ausgebildet (Abb. 12).

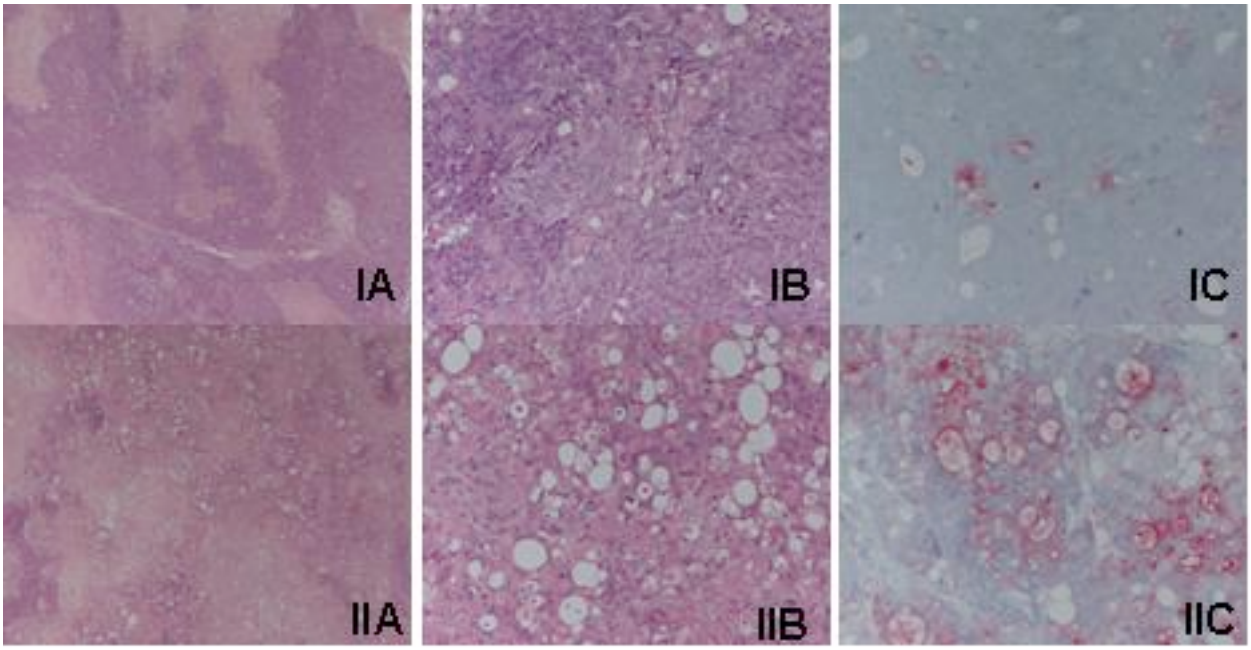


Abb. 12: Histologie der untransfizierten (I) und transfizierten (II) Tumoren. A: HE-Färbung, 40fache Vergrößerung; B: HE-Färbung, 200fache Vergrößerung; C: CEA-Färbung.

Sowohl die Wildtyp- als auch die ribozymtragenden Tumoren bilden carcinoembryonales Antigen (CEA). Bei den HRT-Tumoren zeigt sich eine luminale Markierung in den nur spärlich ausgebildeten Drüsen. Die Ribozymtumoren zeigen eine stärkere, auch zytoplasmatische Expression von CEA.

### *3.5.2 Quantifizierung nekrotischer Areale*

In beiden Gruppen sind multifokale Nekrosezonen nachweisbar. Die Ribozymtumoren haben signifikant mehr nekrotische Anteile als die Parentaltumore ($p<0,001$). Die Zugabe der Makrophagen bewirkt eine unwesentliche ($p=0,115$) Reduktion der nekrotischen Anteile (49% mit Makrophagen gegenüber 66% ohne Makrophagen). Tabelle 5 zeigt den Anteil nekrotischer Areale in den verschiedenen Gruppen.

Tab. 5: Anteil nekrotischer Areale in den Tumoren.

| | Monokulturen | Kokulturen |
|---|---|---|
| HRT | 51% | 28% |
| Ribozym | 81% | 70% |

Der Anteil nekrotischer Areale korreliert mit dem Proliferationsindex (Anteil der MIB-1 positiven Zellkerne) in der entsprechenden Tumorprobe (p=0,011) (Abb.13).

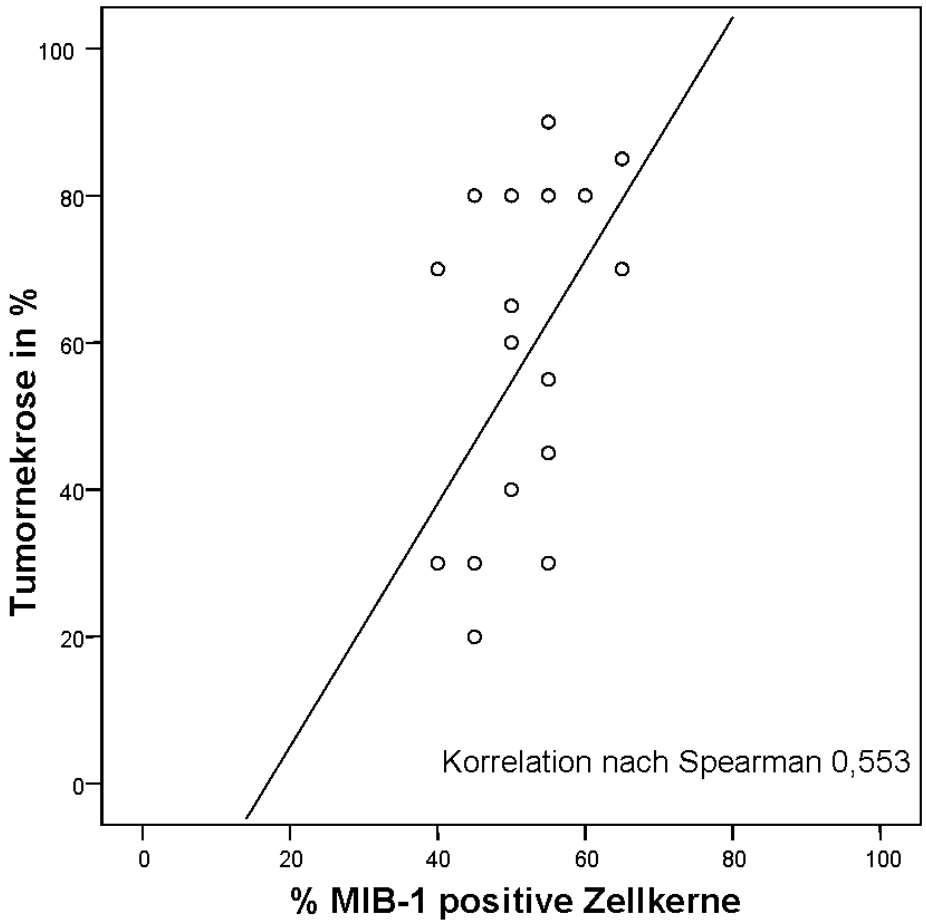


Abb. 13: Korrelation Proliferation – Nekrose.

Die am Ende des Tierversuches gemessenen Tumorgewichte wurden um den Anteil nekrotischer Areale korrigiert, um das vitale Tumorgewebe abzuschätzen. Dabei zeigt sich, dass die transfizierten Tumoren signifikant (p=0,001) weniger vitales Tumorgewebe enthalten (Abb. 14).

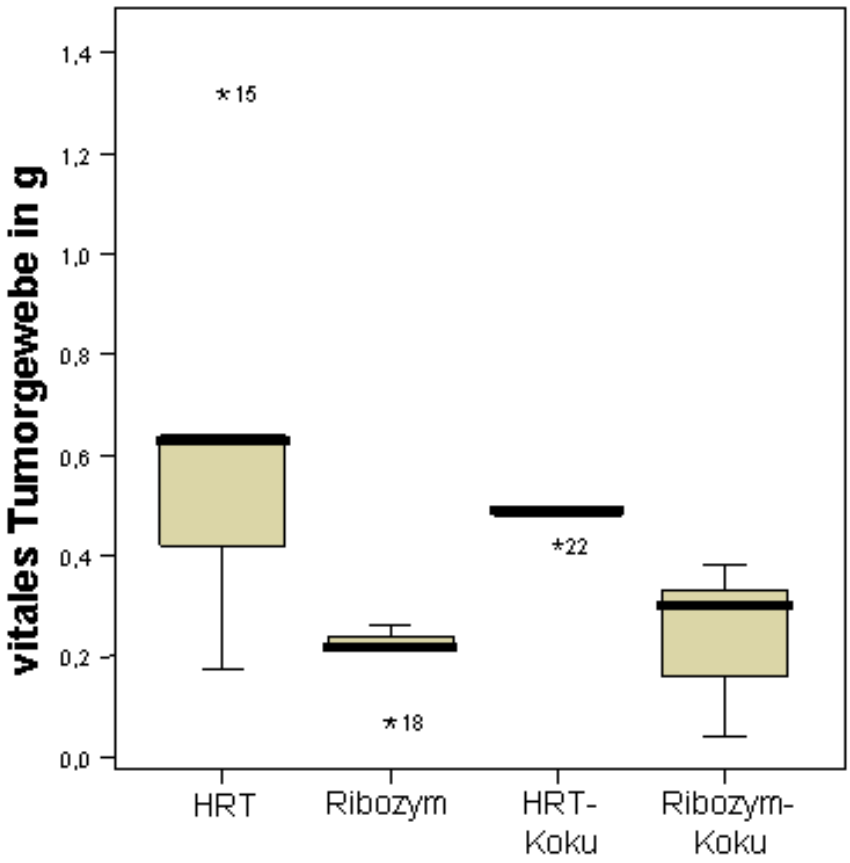


Abb. 14: Relatives Tumorgewicht nach Korrektur um den Nekroseanteil.

Dieser Effekt ist makrophagenunabhängig (p=0,791). Werden die Daten aus dem unter 1.4 beschriebenen Vorversuch in die Auswertung mit einbezogen, zeigt sich eine direkte Korrelation zwischen vitalem Tumorgewebe und der TGFβ1-Expression auf Signifikanzniveau (r=0,314; p=0,056; Abb.15).

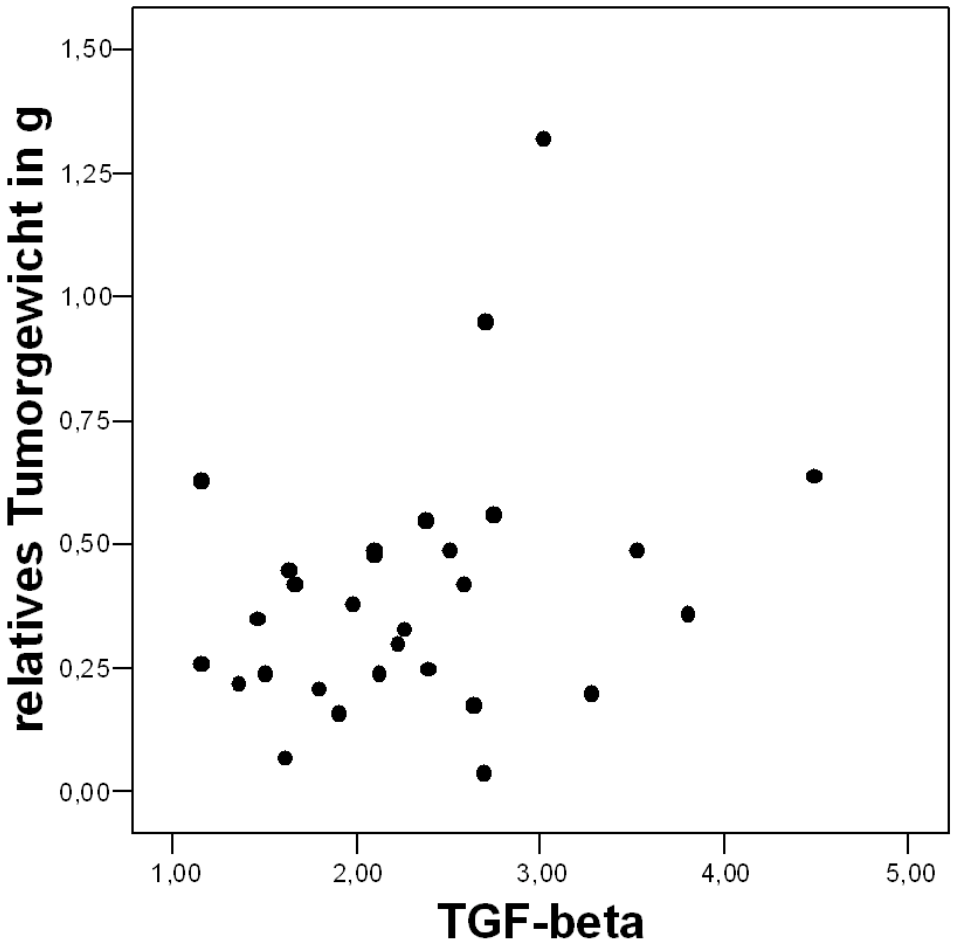


Abb. 15: Korrelation zwischen TGF-beta-Expression und vitalem Tumorgewicht.

### *3.5.3 Proliferationsverhalten*

Zur Quantifizierung des Proliferationsverhaltens der Tumoren wurde die MIB-1-Rate ausgewertet. Die Ribozymtumoren zeigen eine bis zu 1,8-fach erhöhte Mitoserate im Vergleich zu den HRT-Tumoren. Sowohl bei den Ribozym- als auch bei den HRT-Tumoren bewirkt die Zugabe der Makrophagen eine Proliferationshemmung. Im Mittel ergibt sich hierbei eine statistisch signifikante Reduktion um 10% der MIB-1 positiven Zellkerne (p=0,002).

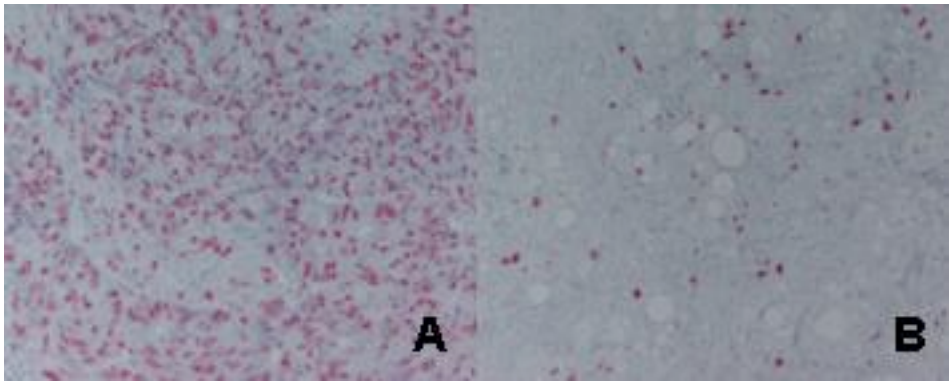


Abb. 16: MIB1 in den HRT (A) – Ribozymtumoren (B).

### *3.5.4 Nachweis von Makrophagen*

Zum Nachweis der Makrophagen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen CD68 verwendet. Im Tierversuch zeigte sich, dass zum Zeitpunkt des Versuchsendes in den Kokulturen nur noch wenige der ursprünglich zugegebenen Makrophagen nachweisbar waren. Dabei finden sich in den transfizierten Tumoren signifikant mehr Makrophagen als in den untransfizierten Tumoren (HRT-Kokultur=0,6 per HPF, Ribozym-Kokultur=1,36 per HPF; p=0,044).

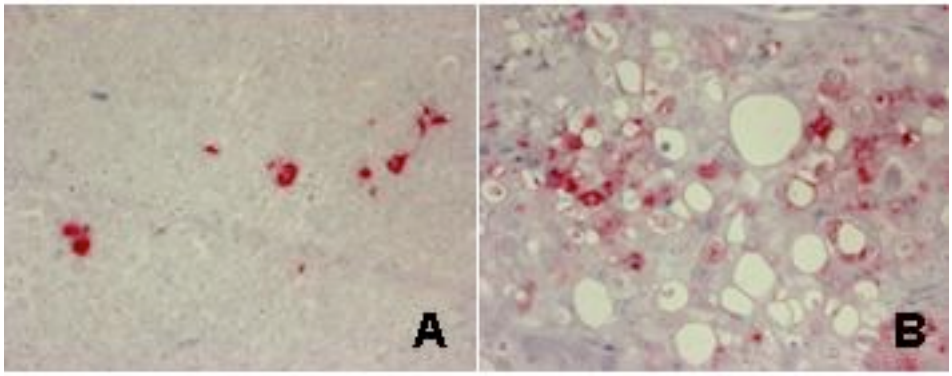


Abb. 17: Makrophagen in den untransfizierten (A) und transfizierten (B) Tumoren.

# 4 Diskussion

TGF-ß1 ist ein multifunktionales Polypeptid, das von verschiedenen Zellen als inaktiver Wachstumsfaktor sezerniert und in der Extrazellularmatrix gespeichert wird. Das Wirkungsspektrum von TGF-ß ist sehr breit und hängt vom Zelltyp und dessen Differenzierungsgrad ab. Auf differenzierte Epithelien hat TGF-ß eine antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung, die dem Erhalt der Gewebshomöostase dient, während transformierte Zellen durch TGF-ß in ihrem Wachstum stimuliert werden. Auf Fibroblasten wirkt TGF-ß proliferationssteigernd und fördert die Produktion von verschiedenen Extrazellularmatrixproteinen. Auf Entzündungszellen wirkt TGF-ß1 im allgemeinen inhibierend. Auch die Angiogenese wird durch TGF-ß reguliert. Deswegen kann man davon ausgehen, dass auch das Tumorwachstum auf vielfältige Weise beeinflußt wird.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TGF-ß1 auf das Wachstum der kolorektalen Tumorzelllinie HRT18 untersucht. Aus Vorversuchen war bekannt, dass diese Zelllinie selbst TGF-ß1 bildet (70 pg/ml/48h).

## 4.1 TGF-ß und Proliferation

TGF-ß ist als Inhibitor der Proliferation normaler Epithelien ein wichtiger Regulator der Gewebshomöostase und schützt so vor unkontrolliertem Zellwachstum. Dies gilt auch für die Frühphase der Tumorentstehung, in der TGF-ß die Proliferation noch hoch differenzierter, aber schon transformierter Epithelzellen meist inhibieren kann [24]. Im Rahmen der Tumorprogression fällt diese Wachstumsinhibition meist weg oder wirkt sogar gegenteilig. Die Mehrzahl der Kolonkarzinome weist Mutationen in den an der TGF-ß-Signalkaskade beteiligten SMAD-Proteinen auf [30,56], was meist zu einem Verlust der Wachstumsinhibition durch TGF-ß führt [28]. Abbildung 18 zeigt die möglichen Alterationen der TGF-ß-Signalkaskade.

Aus der Literatur ist bekannt, dass HRT-18 funktionelles SMAD4 besitzt, das zentralen Signalmolekül der TGF-ß1 vermittelten Proliferationshemmung [33]. Trotzdem läßt sich die Zelllinie durch TGF-ß1 in ihrem Wachstumsverhalten nicht beeinflussen. Dies konnte sowohl mit den Ribozym-Transfektanten *in vitro* [48], als auch in den hier durchgeführten Tierversuchen gezeigt werden. Bemerkenswert ist, dass mit der gleichen Strategie *in-vitro* eine TGF-ß1-Reduktion von 60%, *in-vivo* aber nur um 30% (der mRNA-Expression) gelang. Den Mechanismus dieser TGF-ß1-Resistenz zu identifizieren war nicht Ziel dieser Arbeit und auch in der Literatur finden sich keine diesbezüglichen Daten für HRT-18. Die funktionelle Aktivität des SMAD4-Signalwegs könnte durch andere Mutationen antagonisiert werden (Abb. 18 A-C und E). Der exakte Grund muß in zukünftigen Studien geklärt werden. Dabei könnten Microarrays verwendet werden, um diese Mutationen zu charakterisieren und einen TGF-ß sensiblen Phänotyp zu

identifizieren [14].

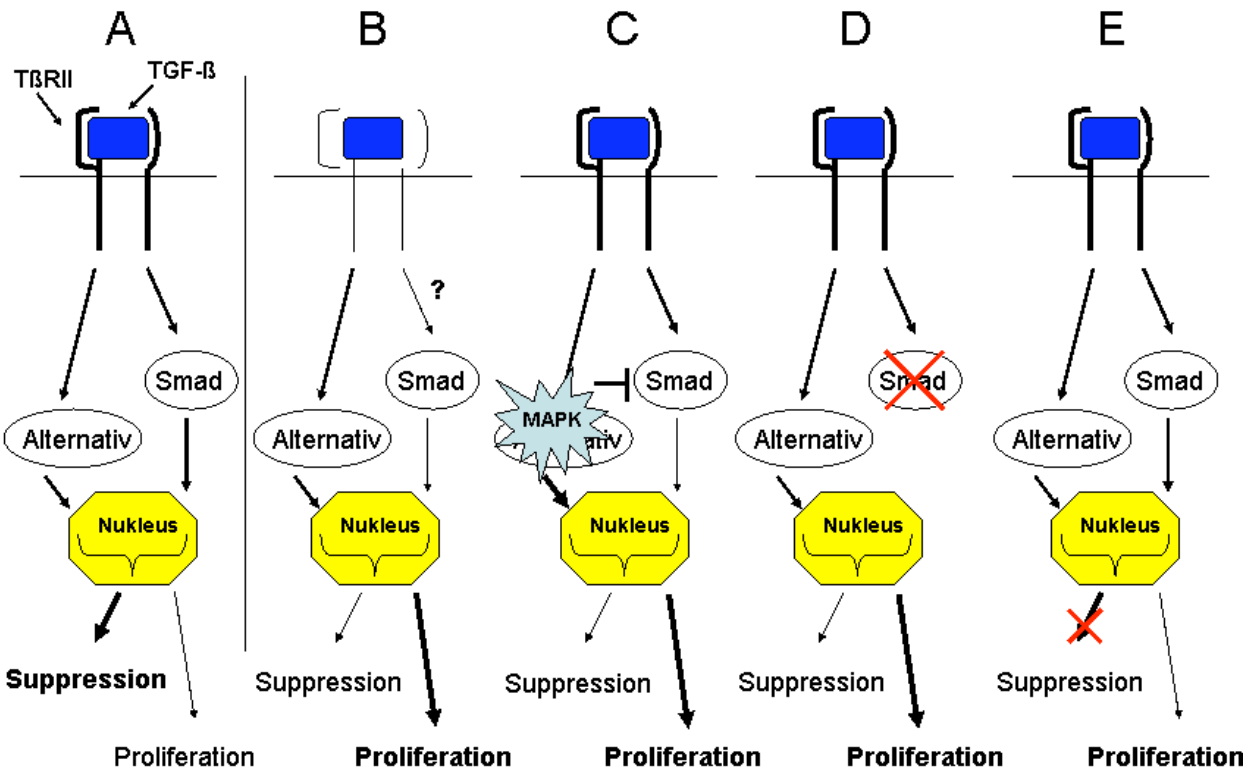


Abb. 18: A) Die physiologische Transduktion des TGF-ß1-Signals bewirkt eine Proliferationsinhibition der Epithelzellen. Mögliche Veränderungen in der Tumorzelle: B) TGF-Rezeptordefekt C) Überaktiver MAPK-Pathway D) Reduzierte Smad-Expression E) Eingeschränkte posttranslationelle Suppressor-funktion. Im Ergebnis führt das TGF-ß1-Signal zu einer Tumorproliferation. Nach Wakefield et. al. (2002).

## 4.2 TGF-ß und Tumorstroma

Obwohl sich nach Transfektion mit dem Ribozym kein Unterschied in der Proliferation feststellen lässt, zeigen sich am Versuchsende signifikante Unterschiede bezüglich des vitalen Tumorgewichts und der Tumormorphologie. 95% der kolorektalen Adenokarzinome zeigen eine starke TGF-ß-Expression in der Immunhistologie [6], meist verbunden mit einer Resistenz gegenüber der proliferationshemmenden Wirkung von TGF-ß [55].

In der Histologie waren die Ribozymtumoren deutlich besser differenziert als die Wildtyptumoren. Dies weist darauf hin, dass TGF-ß1 Einfluß auf die zelluläre Differenzierung hat. Tumorzellen zeigen oft einen

selektiven Verlust der TGF-ß-induzierten SMAD-Signaltransduktion, wohingegen andere Signalwege (RAS-ERK, MAP-Kinasen) durch TGF-ß weiterhin aktivierbar sind. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF-ß, HGF/SF, EGF und IGF verlieren die Tumorzellen oft ihre Zell-Zell-Kontakte, was deren Invasion begünstigt [81]. Die Überexpression von TGF-ß in Kooperation mit einem veränderten RAS- und MAPK-Signalweg führt zu einer EMT der Tumorzelle zum spindelzelligen Typ mit Verlust der epithelialen (E-Cadherin, β-Catenin) und Expression von mesenchymalen Markern [40,62]. Die Aktivierung des RAS/MAPK-Signalwegs antagonisiert die antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung von TGF-ß und fördert die EMT durch Expression der Proteine Snail und Slug. E-Cadherin formt tight-junctions mit benachbarten Zellen und ist über β-Catenin indirekt mit dem Zytoskelett verbunden. Dies sorgt für die Polarisierung einer Epithelzelle. In Tumorzellen wird durch die Induktion von Snail, Slug und Sip1 die Transkription und Expression von E-Cadherin supprimiert [81]. Dieser Phänotypwechsel korreliert mit der Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung [61].

Zusätzlich induziert TGF-ß die Bildung von Myofibroblasten im Stroma. Diese Myofibroblasten produzieren ECM, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Faktoren wie Tenascin-C, FGF, EGF und PRGF-1 wirken synergistisch bei der EMT und bilden damit einen progressionsfördernden Mechanismus [13,20,38].

Die Bedeutung von TGF-ß als EMT-fördernder Faktor ist experimentell belegt. In der murinen Kolonkarzinomlinie CT26 konnte durch Transfektion mit einem dominant-negativen TGF-ß-Rezeptor eine Rückdifferenzierung vom mesenchymalen zum epithelialen Typ mit Inhibition der Invasionsfähigkeit erreicht werden. Dies gelang auch bei humanen Kolonkarzinomzellen, die mit einem neutralisierenden TGF-ß-Antikörper behandelt wurden [61]. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch in den hier durchgeführten Versuchen, obwohl nur die TGF-ß-Produktion der Tumorzellen gehemmt wurde. Somit scheint für die Dedifferenzierung besonders die autokrine TGF-ß-Stimulation wichtig zu sein. Durch die Reduktion von TGF-ß fehlt ein Wachstumsfaktor, der direkt die EMT der Tumorzelle induziert und indirekt die Bildung einer invasionsfördernden Matrix begünstigt.

### *4.2.1 Modulation der Makrophagenaktivität*

Ein wichtiger Mechanismus der TGF-ß-vermittelten Tumorprogression ist die Etablierung einer Immuntoleranz gegenüber dem Tumor [18]. Makrophagen sollten als Teil des Immunsystems eine gegen den Tumor gerichtete Antwort generieren. Dies geschieht hauptsächlich durch die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROI), die nach Aktivierung der Makrophagen sezerniert werden (ein sogenannter respiratorischer Burst) und zelltoxisch wirken. *In vivo* sind Tumoren in der Lage, diese Reaktion zu hemmen [82]. Dabei spielt TGF-ß eine wichtige Rolle, da es die Bildung von ROI´s verhindert. Weiterhin wird durch TGF-ß die Expression von Interleukin-10 induziert, einem hauptsächlich immunsuppressiv

wirkenden Interleukin [45]. Die durchgeführten Kokulturversuche von Tumorzellen und Makrophagen sollten zeigen, ob die Suppression der ROI-Bildung durch die ribozymbedingte TGF-ß1-Reduktion aufgehoben werden kann.

Dies war der Fall. Auch im Tierversuch konnte das Wachstum der ribozymtragenden Tumoren, nicht aber der Wildtyptumoren, durch die Zugabe von Makrophagen reduziert werden. Dies spricht dafür, dass die Makrophagen durch die TGF-ß1-Inhibition eine gesteigerte tumorizide Aktivität entwickeln.

Besonders in den ersten Wochen des Tierversuches war eine Hemmung des Tumorwachstums durch die Makrophagen (sowohl der ribozymtragenden, als auch der Wildtyptumoren) zu beobachten. Dieser Effekt war bei den ribozymtragenden Tumoren signifikant. In den Folgewochen des Versuches entwickelte sich die jeweilige Mono- und Kokultur (Ribozym/Wildtyp) fast parallel, was darauf hinweist, dass nach einer bestimmten Zeit nicht mehr genügend Makrophagen vorhanden waren oder diese durch den Verlust ihrer tumoriziden Eigenschaften das Tumorwachstum nicht mehr kontrollieren konnten. Die erstgenannte Ursache wird von den Ergebnissen der Immunhistologie unterstützt, da hier am Versuchsende nur noch vereinzelt Makrophagen in den Tumoren nachweisbar waren.

Weiterhin ist für die tumor-assoziierten Makrophagen beschrieben, dass sie direkt ECM degradieren (durch die Sekretion von MMP´s) und damit die Tumorprogression fördern können [15]. Insgesamt ist die Rolle der tumor-assoziierten Makrophagen als ambivalent zu sehen, da sie sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Eigenschaften besitzen [63]. Die Überexpression von TGF-ß im Tumor induziert die Transformation einwandernder Makrophagen vom inflammatorischen zum tumor-assoziierten Phänotyp. Durch den Einsatz des Ribozyms ist eine Verbesserung der tumorhemmenden Makrophagenaktivität anzunehmen. Abbildung 19 zeigt die Interaktion von Tumorzellen und Makrophagen.

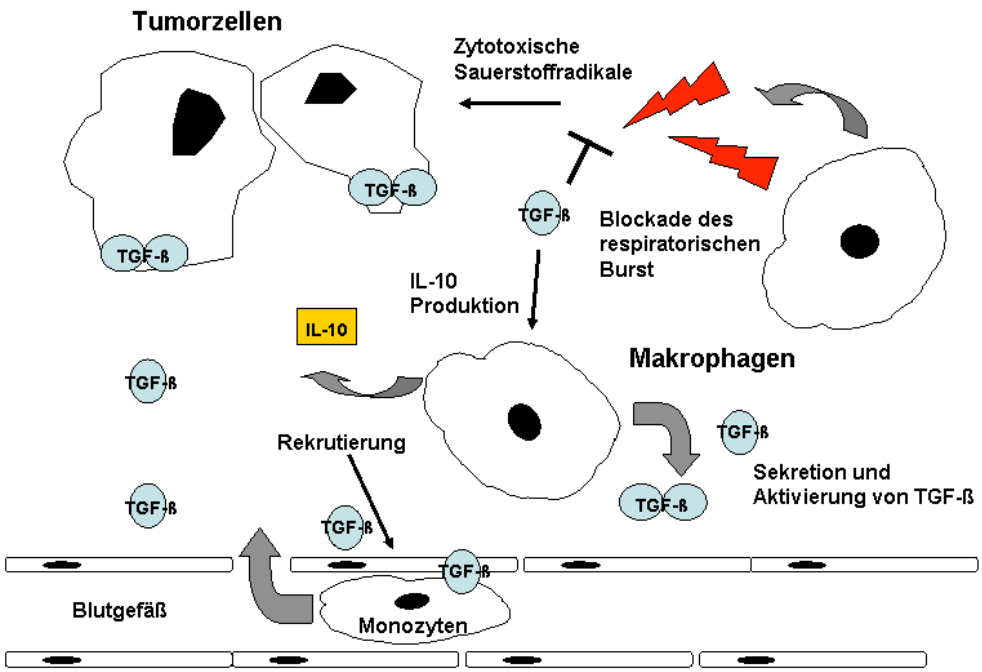


Abb. 19: Interaktion von Tumorzellen und Makrophagen. MMP - Matrixmetalloproteinase, VEGF vascular endothelial growth factor.

### *4.2.2 Einfluss auf die Angiogenese*

Ein weiterer wesentlicher Effekt der reduzierten TGF-ß1-Menge war der größere Anteil nekrotischer Areale in den Xenograft-Tumoren. Da die Zellteilungsaktivität (als Anteil der MIB-1 positiven Zellen) durch das Ribozym nicht signifikant gesteigert war, kann die vermehrte Nekrose nicht allein Ausdruck einer Proliferationssteigerung sein. Ausgedehnte Nekrose fand sich sowohl in den Mono- als auch in den Kokulturen, ein Hinweis darauf, dass dieser Effekt nicht nur durch die Zytotoxität der Makrophagen erklärt werden kann. Die Nekrose ist möglicherweise auf eine veränderte Angiogenese der Tumoren zurückzuführen. Leider konnte dies nicht genauer untersucht werden, da die immunhistochemische Darstellung der Gefäße mit verschiedenen Antikörpern nicht gelang. In zukünftigen Studien sollte geeignetes Material für diese Untersuchung gewonnen werden.

Eine adäquate Vaskularisierung ist entscheidend für das Tumorwachstum. Daher besitzen viele Tumorzellen die Fähigkeit, die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren. In humanen Mammakarzinomen korrelierte eine TGF-ß1-mRNA-Überexpression mit einer vermehrten Mikrovaskularisierung und einer schlechteren Prognose. Hierfür werden direkte und indirekte Effekte von TGF-ß1 verantwortlich gemacht. TGF-ß1 induziert die Expression verschiedener angiogenetischer Faktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und EDB-Fibronektin [42,68]. Diese stimulieren die Proliferation und Migration von Endothelzellen. In humanen Kolonkarzinomproben konnte gezeigt werden [60], dass Endoglin (CD105),

strukturell mit dem TGFβ-Rezeptor II verwandt [80], selektiv auf den Endothelien tumorassoziierter Gefäße überexprimiert wird. Endoglin wird durch TGF-ß1 aktiviert und ermöglicht so die direkte Stimulation von Endothelzellen durch im Stroma vorhandenes, aktiviertes TGF-ß1. Auch die im Stroma vorhandenen MMP´s begünstigen indirekt die Angiogenese. MMP´s können die Matrix und Basalmembranen degradieren. Dies fördert die Migration der für die Neovaskularisierung notwendigen Endothelzellen, ermöglicht aber auch den Übertritt von Tumorzellen in die schon vorhandenen Blut- und Lymphgefäße, was wesentlich zu deren systemischer Verbreitung beiträgt [34].

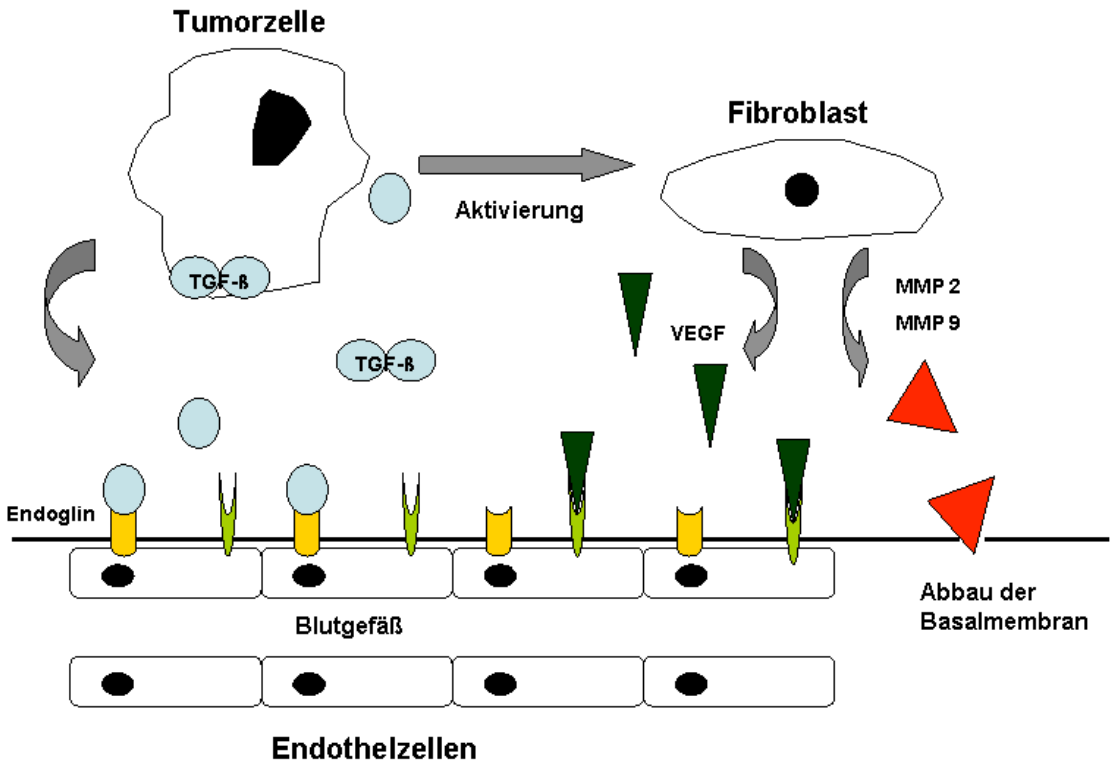


Abb. 20: Tumorzellen induzieren Angiogenese direkt durch TGF-ß1 und indirekt über vascular endothelial growth factor (VEGF).

## 4.3 Zusammenfassende Bewertung

In dieser Arbeit wurde das Verhalten einer kolorektalen Karzinomzelllinie mit reduzierter TGF-ß1-Expression untersucht. Durch das Ribozym gelang eine nachhaltige Reduktion von TGF-ß1 in den im Tiermodell erzeugten Tumoren mit bedeutsamem Einfluss auf das Tumorwachstum. Ein Beleg hierfür ist die durch die TGF-ß1-Suppression erreichte signifikante Reduktion des vitalen Tumorgewebes und die höhere Differenzierung der Tumorzellen. Dies unterstreicht die starke Potenz von TGF-ß1, als stroma-assoziierter Faktor die Tumorprogression zu fördern. Hierfür scheinen insbesondere autokrine Signalwege bedeutsam zu sein. Der Zunahme des nekrotischen Anteils der Tumoren liegt wahrscheinlich eine unzureichende Tumorvaskularisierung zugrunde. Dies führt zu einem verlangsamten Tumorwachstum, da die Zellen nicht ausreichend nutritiv versorgt werden.

Die im *in-vitro* Kokulturversuch gezeigte Steigerung der Makrophagenaktivität (gemessen als Fähigkeit zur ROI-Produktion) unter Einfluß des Ribozyms konnte im Tierversuch bestätigt werden. Vor allem zu Beginn des Tierversuchs zeigt sich eine effektive Kontrolle des Tumorwachstums durch die zugegebenen Makrophagen, die jedoch im Laufe des Versuches verloren ging. Da sich in der Immunhistologie nur noch vereinzelt Makrophagen nachweisen ließen, ist die fehlende Wachstumskontrolle der Tumoren am Versuchsende direkt mit einer Abnahme der Makrophagen verknüpft. Das Ribozym rekonstituiert die tumorizide Aktivität der Makrophagen und ermöglicht eine Wachstumskontrolle.

## 4.4 Limitationen der Arbeit

Die durchgeführten Experimente beleuchten die Möglichkeiten und Grenzen der TGF-ß1-Suppression durch ein Ribozym beim kolorektalen Karzinom. Die Aussagekraft der erhobenen Daten wird dadurch begrenzt, dass nur eine Zelllinie für die Versuche verwendet wurde. Diese war in ihrem Proliferationsverhalten durch variierende TGF-ß1-Spiegel nicht beeinflussbar. So bleibt zu überprüfen, ob sich mit einer Zelllinie, auf die TGF-ß1 inhibierend wirkt, durch TGF-ß1-Suppression ähnlich positive Effekte erzielen lassen. Aufschlussreich wäre die Testung des Ribozyms in einem Tiermodell, in dem Tumoren im Kolon/Rektum wachsen oder sogar direkt entstehen, ohne dass Tumorzellen injiziert werden müssen. Damit könnten auch Daten zum Einfluss auf das Metastasierungsmuster gewonnen werden. Da zur Zeit noch keine Methode für die *in-vitro* Applikation des Ribozyms verfügbar ist, müssten dafür die schon transfizierten Tumorzellen verwendet werden.

Die Kokulturversuche zeigten, dass TGF-ß1 ein wichtiger Mediator der Tumorzell-Makrophagen-Interaktion ist. Durch die Variation der Makrophagenzahl kann untersucht werden, ob der tumorhemmende Effekt direkt makrophagenabhängig ist und wieviele Makrophagen für die Wachstumskontrolle notwendig sind. Hierbei ist auch der Phänotyp der Makrophagen wichtig. Tumorassoziierte Makrophagen zeigen meist nur eine geringe oder keine tumorizide Aktvität. Ein Kokulturversuch mit diesem Makrophagentyp würde zeigen, ob sich durch die TGF-ß1-Suppression die Entwicklung inflammatorischer Makrophagen induzieren lässt. Makrophagen sind eine Schlüsselzelle für die tumorizide Immunantwort, da sie neben der direkten zytotoxischen Wirkung als antigenpräsentierende Zellen auch das adaptive Immunsystem regulieren. In dem gewählten Mausmodell konnte der Einfluss auf Zellen des adaptiven Immunsystems nicht betrachtet werden, da diese in SCID-Mäusen fehlen. Auch die Aktivität lymphatischer und dendritischer Zellen im Tumorstroma wird durch TGF-ß1 moduliert [69]. Insbesondere tumorspezifische CD8+ T-Zellen sind wichtig für die Wachstumskontrolle von Kolonkarzinomen [65] und können durch TGF-ß1 gehemmt werden [29]. In weiteren Versuchen sollte die Betrachtung aller im Tumorstroma vorhandenen Immunzellen angestrebt werden, um die *in-vivo* Situation möglichst genau nachzubilden.

## 4.5 Ausblick

Die Entwicklung sogenannter „biologicals“, maßgeschneiderte Substanzen, die möglichst nebenwirkungsarm spezifisch in den Tumorzellstoffwechsel eingreifen, ist das Paradigma der modernen Tumortherapie. In der Therapie des kolorektalen Karzinoms werden solche neuen Medikamente schon erfolgreich klinisch angewendet. Diese inhibieren die Angiogenese (Bevacizumab) und die Proliferation (Cetuximab) und ergänzen die etablierten Chemotherapieverfahren bei der Behandlung metastasierter Kolonkarzinome.

Die hier gezeigten Ergebnisse liefern Evidenz dafür, dass auch TGF-ß1 ein Ansatzpunkt für die medikamentöse Therapie des Kolonkarzinoms sein kann. Eine TGF-ß1-Inhibition ist besonders vielversprechend, da mehrere die Tumorprogression fördernde Vorgänge gleichzeitig beeinflußt werden können. Neben der antiangiogenetischen Wirkung ist besonders die Reversibilität der tumorinduzierten Immunsuppression ein interessanter Ansatzpunkt, da dadurch möglicherweise eine effektive, auf den Tumor gerichtete Immunantwort erreicht werden kann. Ideal ist eine selektive TGF-ß1-Inhibition im Karzinomgewebe, ohne dabei seine protektive Rolle bei der Homöostase des gesunden Gewebes zu verändern [46,75]. Entsprechende Strategien wie der adenovirale Transfer oder die antikörpervermittelte Applikation inhibierender RNA sind in der experimentellen Erprobung [77,92].

Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom leben heute doppelt so lange wie vor 10 Jahren. Obwohl die Erkrankung immer noch nicht heilbar ist, hat die Grundlagenforschung verschiedene Ziele für neue Therapieansätze identifiziert. TGF-ß1 ist ein vielversprechendes Protein, das durch seine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression ein Kandidat für eine Wirkstoffentwicklung ist. Dabei sollte es das Ziel sein, nicht nur das Überleben zu verbessern, sondern die Therapien auch verträglicher zu machen und damit die Lebensqualität von Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom zu steigern.

# 5 Literaturverzeichnis


1. Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M, Moses HL: Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1. Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 3239-3243

2. Ananth S, Knebelmann B, Gruning W, Dhanabal M, Walz G, Stillman IE, Sukhatme VP: Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. Cancer Res 59 (1999) 2210-2216

3. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. Int J Cancer 72 (1997) 1-22

4. Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT: Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. J Clin Invest 92 (1993) 2569-2576

5. Arteaga CL, Koli KM, Dugger TC, Clarke R: Reversal of tamoxifen resistance of human breast carcinomas in vivo by neutralizing antibodies to transforming growth factor-beta. J Natl Cancer Inst 91 (1999) 46-53

6. Avery A, Paraskeva C, Hall P, Flanders KC, Sporn M, Moorghen M: TGF-beta expression in the human colon: differential immunostaining along crypt epithelium. Br J Cancer 68 (1993) 137-139

7. Balkwill F, Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357 (2001) 539-545

8. Bandyopadhyay A, Zhu Y, Cibull ML, Bao L, Chen C, Sun L: A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. Cancer Res 59 (1999) 5041-5046

9. Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T: Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. Hepatology 21 (1995) 760-766

10. Bierie B, Moses HL: Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat Rev Cancer 6 (2006) 506-520

11. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE: The role of tumour-associated macrophages in tumour

progression: implications for new anticancer therapies. J Pathol 196 (2002) 254-265

12. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF: Role of transforming growth factor beta in human disease. N Engl J Med 342 (2000) 1350-1358

13. Bosman FT, de Bruine A, Flohil C, van der Wurff A, ten Kate J, Dinjens WW: Epithelial-stromal interactions in colon cancer. Int J Dev Biol 37 (1993) 203-211

14. Boyer J, Allen WL, McLean EG, Wilson PM, McCulla A, Moore S, Longley DB, Caldas C, Johnston PG: Pharmacogenomic identification of novel determinants of response to chemotherapy in colon cancer. Cancer Res 66 (2006) 2765-2777

15. Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, Tsai MF, Chen CH, Yang PC: Tumor-Associated Macrophages: The Double-Edged Sword in Cancer Progression. J Clin Oncol (2004)

16. Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, Akhurst RJ: TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. Cell 86 (1996) 531-542

17. Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, Wang XF: The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. Mol Cell Biol 17 (1997) 2030-2037

18. de Visser KE, Kast WM: Effects of TGF-beta on the immune system: implications for cancer immunotherapy. Leukemia 13 (1999) 1188-1199

19. De Wever O, Mareel M: Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol 200 (2003) 429-447

20. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M: Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. Faseb J 18 (2004) 1016-1018

21. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A: TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet 29 (2001) 117-129

22. Donovan J, Slingerland J: Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. Breast Cancer Res 2 (2000) 116-124

23. Dukes C: The classification of cancer of the rectum. J Pathol 35 (1932) 323-332

24. Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschman T: Transforming growth factor beta1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. Cancer Res 59 (1999) 3379-3386

25. Ewen ME, Oliver CJ, Sluss HK, Miller SJ, Peeper DS: p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. Genes Dev 9 (1995) 204-217

26. Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, Sobol RE: Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996) 2909-2914

27. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D: GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Press (2004)

28. Gold LI: The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. Crit Rev Oncog 10 (1999) 303-360

29. Gorelik L, Flavell RA: Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. Nat Med 7 (2001) 1118-1122

30. Grady WM: Genomic instability and colon cancer. Cancer Metastasis Rev 23 (2004) 11-27

31. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S: Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. Cancer Res 59 (1999) 320-324

32. Greene F, Balch C, Fleming I: AJCC cancer staging handbook. Springer, New York, 2002

33. Grijelmo C, Rodrigue C, Svrcek M, Bruyneel E, Hendrix A, de Wever O, Gespach C: Proinvasive activity of BMP-7 through SMAD4/src-independent and ERK/Rac/JNK-dependent signaling pathways in colon cancer cells. Cell Signal 19 (2007) 1722-1732

34. Hagedorn HG, Bachmeier BE, Nerlich AG: Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). Int J Oncol 18 (2001) 669-681

35. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 100 (2000) 57-70

36. Hauptmann S, Siegert A, Berger S, Denkert C, Kobel M, Ott S, Siri A, Borsi L: Regulation of cell growth and the expression of extracellular matrix proteins in colorectal adenocarcinoma: a fibroblast-tumor cell coculture model to study tumor-host interactions in vitro. Eur J Cell Biol 82 (2003) 1-8

37. Hauptmann S, Zwadlo-Klarwasser G, Jansen M, Klosterhalfen B, Kirkpatrick CJ: Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. Am J Pathol 143 (1993) 1406-1415

38. Hayward SW, Wang Y, Cao M, Hom YK, Zhang B, Grossfeld GD, Sudilovsky D, Cunha GR: Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. Cancer Res 61 (2001) 8135-8142

39. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M: Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. Nature 397 (1999) 530-534

40. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S: Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. J Cell Biol 156 (2002) 299-313

41. Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer 6 (2006) 392-401

42. Khan ZA, Chan BM, Uniyal S, Barbin YP, Farhangkhoee H, Chen S, Chakrabarti S: EDB fibronectin and angiogenesis -- a novel mechanistic pathway. Angiogenesis 8 (2005) 183-196

43. Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE: Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. Br J Cancer 77 (1998) 1492-1494

44. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J: A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. Genes Dev 13 (1999) 804-816

45. Kucharzik T, Lugering N, Winde G, Domschke W, Stoll R: Colon carcinoma cell lines stimulate monocytes and lamina propria mononuclear cells to produce IL-10. Clin Exp Immunol 110 (1997) 296-302

46. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S: Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. Proc Natl Acad Sci U S A 90 (1993) 770-774

47. Kushiyama Y, Fukuda R, Suetsugu H, Kazumori H, Ishihara S, Adachi K, Kinoshita Y: Site-dependent production of transforming growth factor beta1 in colonic mucosa: its possible role in tumorigenesis of the colon. J Lab Clin Med 136 (2000) 201-208

48. Lach S: Modulation des Tumorzellverhaltens der Kolonkarzinomzellinie HRT-18 durch ein spezifisches anti-TGFß1 Ribozym. Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2005, 63 S.

49. Lee KY, Bae SC: TGF-beta-dependent cell growth arrest and apoptosis. J Biochem Mol Biol 35 (2002) 47-53

50. Letterio JJ, Roberts AB: Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu Rev Immunol 16 (1998) 137-161

51. Lewis CE, Pollard JW: Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer Res 66 (2006) 605-612

52. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP: Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. Science 284 (1999) 1534-1537

53. London NJ, Farmery SM, Will EJ, Davison AM, Lodge JP: Risk of neoplasia in renal transplant patients. Lancet 346 (1995) 403-406

54. Lutz M, Knaus P: Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. Cell Signal 14 (2002) 977-988

55. Manning AM, Williams AC, Game SM, Paraskeva C: Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor beta (TGF-beta): conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF-beta. Oncogene 6 (1991) 1471-1476

56. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al.: Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 268 (1995) 1336-1338

57. Marzo AL, Fitzpatrick DR, Robinson BW, Scott B: Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both in vitro and in vivo. Cancer Res 57 (1997) 3200-3207

58. Massague J: TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 67 (1998) 753-791

59. Meyerhardt JA, Mayer RJ: Systemic therapy for colorectal cancer. N Engl J Med 352 (2005) 476-487

60. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O: Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. Virchows Arch (2005) 1-8

61. Oft M, Heider KH, Beug H: TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. Curr Biol 8 (1998) 1243-1252

62. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E: TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. Genes Dev 10 (1996) 2462-2477

63. Ohno S, Suzuki N, Ohno Y, Inagawa H, Soma G, Inoue M: Tumor-associated macrophages: foe or accomplice of tumors? Anticancer Res 23 (2003) 4395-4409

64. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR: Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res 59 (1999) 5002-5011

65. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J: Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med 353 (2005) 2654-2666

66. Park JA, Wang E, Kurt RA, Schluter SF, Hersh EM, Akporiaye ET: Expression of an antisense transforming growth factor-beta1 transgene reduces tumorigenicity of EMT6 mammary tumor cells. Cancer Gene Ther 4 (1997) 42-50

67. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martinez A, Madrid-Marina V: [Transforming growth factor beta-1: structure, function, and regulation mechanisms in cancer]. Salud Publica Mex 43 (2001) 340-351

68. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. J Biol Chem 269 (1994) 6271-6274

69. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM: Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. Annu Rev Immunol 25 (2007) 267-296

70. Reichardt P, Schlag PM: Maligne Tumoren des Gastrointestinaltraktes. In: Dietel M, Dudenhausen J,Suttorp N (Hrsg): Harrisons Innere Medizin. ABW Wissenschaftsverlag, Leiben, 2003, S. 639-648

71. Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N: An elevated serum level of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. Anticancer Res 20 (2000) 4489-4493

72. Schubert S, Kurreck J: Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications. Curr Drug Targets 5 (2004) 667-681

73. Schuster N, Krieglstein K: Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. Cell Tissue Res 307 (2002) 1-14

74. Seon BK, Matsuno F, Haruta Y, Kondo M, Barcos M: Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. Clin Cancer Res 3 (1997) 1031-1044

75. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al.: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature 359 (1992) 693-699

76. Siegert A, Denkert C, Leclere A, Hauptmann S: Suppression of the reactive oxygen intermediates production of human macrophages by colorectal adenocarcinoma cell lines. Immunology 98 (1999) 551-556

77. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J: Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. Nat Biotechnol 23 (2005) 709-717

78. Stevens A, Lowe J: Pathologie. Ullstein, Wiesbaden, 1997

79. Takanami I, Imamura T, Hashizume T, Kikuchi K, Yamamoto Y, Kodaira S: Transforming growth factor beta 1 as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma. J Clin Pathol 47 (1994) 1098-1100

80. ten Dijke P, Heldin CH: TGFß Receptors. In: Oppenheim JJ,Feldmann M (Hrsg): Cytokine Reference. Academic Press, London, 2000, S. 1871-1882

81. Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2 (2002) 442-454

82. Tsunawaki S, Sporn M, Nathan C: Comparison of transforming growth factor-beta and a macrophage- deactivating polypeptide from tumor cells. Differences in antigenicity and mechanism of action. J Immunol 142 (1989) 3462-3468

83. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, Imai Y, Shimomukai H, Nomura Y, Matsuda Y, Matsuzawa Y: High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. Gastroenterology 110 (1996) 375-382

84. Ueki N, Nakazato M, Ohkawa T, Ikeda T, Amuro Y, Hada T, Higashino K: Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. Biochim Biophys Acta 1137 (1992) 189-196

85. Weiss SJ, Slivka A: Monocyte and granulocyte-mediated tumor cell destruction. A role for the hydrogen peroxide-myeloperoxidase-chloride system. J Clin Invest 69 (1982) 255-262

86. Welch DR, Fabra A, Nakajima M: Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. Proc Natl Acad Sci U S A 87 (1990) 7678-7682

87. Wikstrom P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A: Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. Prostate 37 (1998) 19-29

88. Wojtowicz-Praga S, Verma UN, Wakefield L, Esteban JM, Hartmann D, Mazumder A: Modulation of B16 melanoma growth and metastasis by anti-transforming growth factor beta antibody and interleukin-2. J Immunother Emphasis Tumor Immunol 19 (1996) 169-175

89. Won J, Kim H, Park EJ, Hong Y, Kim SJ, Yun Y: Tumorigenicity of mouse thymoma is suppressed by soluble type II transforming growth factor beta receptor therapy. Cancer Res 59 (1999) 1273-1277

90. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, Segall JE, Pollard JW, Condeelis J: Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. Cancer Res 67 (2007) 2649-2656

91. Yamada N, Kato M, Yamashita H, Nister M, Miyazono K, Heldin CH, Funa K: Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. Int J Cancer 62 (1995) 386-392

92. Yamanaka R, Tanaka R, Yoshida S, Saitoh T, Fujita K, Naganuma H: Suppression of TGF-beta1 in human gliomas by retroviral gene transfection enhances susceptibility to LAK cells. J Neurooncol 43 (1999) 27-34

93. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA: TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. J Clin Invest 103 (1999) 197-206

94. Yu Q, Stamenkovic I: Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically

**activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. Genes Dev 14 (2000) 163-176**

# 6 Thesen

1. Das Wachstum von Tumorzellen sowie deren Invasivität wird entscheidend von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus ihrer Umgebung (Stroma) beeinflusst. Einer der wichtigsten Mediatoren im Stroma ist Transforming Growth Factor-β (TGF-ß).
2. Physiologisch hemmt TGF-ß die Proliferation von Epithelien. Im Gegensatz dazu kann TGF-ß das Wachstum von Karzinomzellen fördern und besitzt immunsuppressive Eigenschaften. TGF-ß1 ist somit eine Ursache für den „immunescape“ von Tumorzellen.
3. Ausgangspunkt für diese Arbeit war ein Klon der Tumorzelllinie HRT-18, der stabil ein anti-TGF-ß1-Ribozym exprimiert, was zu einer signifikanten Reduktion der TGF-ß-Produktion dieser Zellen führte. In dieser Studie wurde untersucht, ob die Suppression von TGF-ß a) zu einer Proliferationssteigerung der Tumorzellen führt und b) wie sich dies auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen nach heterotoper Applikation in SCID-Mäusen auswirkt.
4. Ein Zellkulturversuch von Tumorzellen in Kokultur mit humanen Makrophagen untersuchte die Bedeutung von TGF-ß als Mediator der tumorvermittelten Immunsuppression.
5. Im Kokulturversuch inhibierten die Wildtypzellen die Zytotoxizität der Makrophagen. Dieser Effekt wurde mit transfizierten Zellen nicht beobachtet. TGF-ß ist somit ein Mediator der tumorzellvermittelten Suppression der Zytotoxizität von Makrophagen.
6. Die hier verwendete ribozymbasierte Strategie führt zu einer langfristigen TGF-ß-Reduktion und nicht zu einer gesteigerten Proliferation der transfizierten Zellen. Diese wuchsen deutlich langsamer als die Wildtyptumoren und bildeten eine signifikant geringere vitale Tumormasse durch deutlich erhöhten Nekroseanteil aus. Diese Tumoren sind histologisch gekennzeichnet durch eine deutlich bessere Differenzierung im Vergleich zu den Wildtyptumoren.
7. Die gezielte Reduktion der intratumoralen TGF-ß-Konzentration ist ein vielversprechender neuer Therapieansatz, der in der Zukunft möglicherweise die etablierten Therapien ergänzen kann.

## Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel, die Literatur sowie die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sind vollständig angegeben.

Weiterhin erkläre ich an Eides statt, dass ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Berlin, den 23. November 2007 _____

Stephan Fuhrmann

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name: | Stephan Fuhrmann |
| Geburtsdatum: | 05.11.1979 |
| Geburtsort: | Berlin-Mitte |

| | |
|---|---|
| 1986-1988 | Grundschule, Berlin |
| 1988-1991 | Ernst-Wildangel-Oberschule, Berlin |
| 1991-1999 | Abitur, Max-Planck-Gymnasium, Berlin |
| 1999-2000 | Zivildienst, DRK-Kliniken Köpenick, Berlin |
| Seit 2000 | Studium der Humanmedizin and der Charité Universitätsmedizin Berlin |
| 8/2005 | 2. Staatsexamen |
| 10/2005-9/2006 | Praktisches Jahr in Berlin |
| 10/2006 | 3. Staatsexamen |
| 10/2006-2/2007 | Wissenschaftlicher Assistent am Institut für medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin |
| Seit 3/2007 | Research Fellow für Immunologie an der Brighton and Sussex Medical School, Brighton, England |

Berlin, den 23. November 2007

Stephan Fuhrmann

## Publikationen

“Ribozyme to TGF-β1 mRNA inhibits immunosuppressive effects of human colorectal adenocarcinoma cells HRT-18 *in vitro* and *in vivo*”

Antje Siegert, Wolfgang Daniel Schmitt, Sandra Stephanie Lach, Stephan Fuhrmann, Anke Kondla, Per Sonne Holm, and Steffen Hauptmann

Manuskript in Vorbereitung

## Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben verschiedene Personen beigetragen, deren Erwähnung an dieser Stelle mir sehr wichtig ist.

Mein besonderer Dank gilt:

meinem Doktorvater Prof. Dr. Steffen Hauptmann, der mir ermöglichte dieses Thema unter seiner Anleitung bearbeiten zu können und dessen kritische und fundierten Anmerkungen mir beim Erstellen dieser Arbeit sehr geholfen haben,

Der gesamten Arbeitsgruppe aus der Pathologie, und hier ganz besonders Dr. Antje Siegert, die mir beim praktischen Teil der Arbeit zur Seite stand, und Dr. Wolfgang Schmitt, der ein immer präsenter und hilfsbereiter Ansprechpartner war,

meiner Frau, weil ich sie liebe und für das Korrekturlesen der Endversion dieser Arbeit,

meinen Eltern für alles was sie für mich getan haben,

meinem Bruder für seine sehr eigenwillige, aber auch fruchtbare Motivation.

Erwähnen möchte ich an dieser Stelle auch Ines, Stefan, Leif und Laura. Als ich angefing diese Arbeit zu schreiben kannten wir uns noch nicht. Es macht mich besonders Stolz, Euch an dieser Stelle nennen zu können.