

Aus der Frauenklinik der  
Medizinischen Einrichtungen der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor Prof. Dr. med. Bender

**Der Einfluß von Interferonen  
auf das Wachstum,  
die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes  
und ausgewählte Differenzierungsmarker  
einer neu etablierten Vulvakarzinomzelllinie  
in vitro**

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich - Heine - Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Christiane Seißer**

**2003**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich – Heine - Universität  
Düsseldorf

gez.: Univ.- Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. - M. Raab  
Dekan

Referentin: Prof. Dr. Koldovsky  
Korreferent: Priv. – Doz. Küppers

## **Vorwort**

Für das Verständnis der multifaktoriellen Zusammenhänge bei Fragen nach der Tumorentwicklung sind in vitro Studien an Tumorzelllinien ein unentbehrliches Instrument. An der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf wurde kürzlich eine neue Vulvakarzinomzelllinie etabliert. In der vorliegenden Arbeit werden neben den Stammzellen V 1 und V2 die Klone E 6 und C 7 II untersucht. Das Vulvakarzinom macht etwa 5% aller weiblichen Genitalkarzinome aus. Dazu kommen seine Präkanzerosen, die vulvären intraepithelialen Neoplasien (VIN). Neben den herkömmlichen Therapieansätzen der VIN und des Vulvakarzinoms (Exision / Vulvektomie / Radiatio), erscheint bei dem wachsenden Wissen um die immunologischen Zusammenhänge, auch die Anwendung von körpereigenen Substanzen vielversprechend. Für die Zytokinbehandlung mit Interferonen bestehen bereits anerkannte onkologische Indikationen in der Hämatologie. In der Therapie solider Tumoren hat sich die Anwendung von Interferonen bisher nicht im gleichen Maße etabliert. Das Wissen um die Interferonwirkungen auf Tumorzellen ist daher zu vertiefen.

Am Beispiel der neu etablierten Vulvakarzinomzelllinie werden unterschiedliche Interferoneffekte untersucht. Hierbei ist insbesondere von Interesse, inwiefern Interferone zur Tumorzellmodifikation im Sinne einer Redifferenzierung beitragen können.

Zunächst wird das Wachstumsverhalten unserer Zelllinie unter der Zugabe von Interferon -  $\alpha$  beschrieben. Des Weiteren wird die Expressierung der Differenzierungsmarker Zytokeratin 7, 18, 19 untersucht. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen Panzytokeratin getestet. Ferner wird auch die Expressierung des Epidermal Growth Faktors und des Proteins 53 nach

Zusatz von Interferon -  $\alpha$  beobachtet. In einem weiteren Verfahren wird der Einfluß von Interferon  $\alpha$  und Interferon  $\gamma$  auf die Exprimierung der Genprodukte des Haupthistokompatibilitätskomplexes untersucht.

Ziel dieser Untersuchung ist es präklinische Daten zu sammeln, die dazu beitragen können, die Therapiemöglichkeiten der VIN und des Vulvakarzinoms zu erweitern. Als eine dieser neueren therapeutischen Optionen wäre zum Beispiel eine individuelle Behandlung mit Interferon denkbar.

## **Inhaltsverzeichnis**

### *1. Einleitung*

#### 1.1 Die Zellkultur

Die Geschichte der Zellkulturtechnik.....	3
Begriffsdefinitionen.....	4
Kultivierung der Vulvakarzinomzelllinie.....	5

#### 1.2. Tumorimmunologische Grundlagen

Immunreaktion auf Tumoren.....	6
Tumor escape Mechanismen.....	6

#### 1.3. Zytokine

Interferone.....	10
Typ I – Interferone.....	10
Typ II – Interferone.....	11
IFN - antitumorale Aktivität.....	11

#### 1.4. Die in der Arbeit verwendeten Differenzierungsmarker

Zytokeratine.....	13
Epidermal Growth Factor Rezeptor.....	14
Protein - 53.....	14

<i>2. Material und Methoden</i>	
2.1. Material: Tumorzellen, Reagenzien, Antikörper, Geräte.....	15
2.2. Methoden :	
Testansatz	
-zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens.....	18
-zur Bestimmung der HLA – Expression.....	19
-zur Bestimmung der Differenzierungsmarker.....	21
<i>3. Ergebnisse</i>	
3.1. Resultate der Untersuchung des Wachstumverhaltens.....	24
3.2. Resultate der Untersuchung auf HLA – Expression.....	27
3.3 Resultate der Untersuchung der Differenzierungsmarker.....	31
<i>4. Diskussion.....</i>	37
<i>5. Zusammenfassung.....</i>	46
<i>6. Anhang</i>	
Literaturverzeichnis.....	47
Lebenslauf.....	53
Danksagung.....	54

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Zellkultur

#### Geschichte der Zellkulturtechnik

Erste Entwicklungen in der Gewebekulturtechnik gehen auf Experimente von Roux ( 44 ) im Jahre 1885 zurück, dem es gelang die Medullar - Scheibe eines Hühnerembryos für einige Tage in warmer Salzlösung zu erhalten. 1903 untersuchte Jolly ( 29 ) Salamander Zellen, die er in einem „hängenden Tropfen“ über einen Monat kultivieren konnte.

Dennoch war es zu dieser Zeit schwierig reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Die damaligen Kulturmedien waren noch unzulänglich. Auch konnte zunächst nicht geklärt werden, ob sich in den beobachteten Geweben lediglich der Zelltod verlangsamt. Das Experiment von Ross Harrison 1907 ( 25 ) bewies, dass es tatsächlich zu einem Fortleben gesunder Zellen gekommen war: er hatte dazu Gewebesteilchen aus dem Mark von Froschembryonen in Froschlymphe explantiert. Die Nervenzellen überlebten nicht nur einige Wochen, es sprossen auch Axone aus .

Ein weiteres Problem der damaligen Gewebekultivierung war die Kontamination durch Bakterien. Mit dem Wissen um die Prinzipien der Asepsis und nicht zuletzt auch mit der Entwicklung der Antibiotika läßt sich heute eine Kontamination vermeiden. Alex Carrel gelang es jedoch schon vor der Ära der Antibiotika eine Zelllinie allein unter Beachtung der Asepsis ganze 34 Jahre zu kultivieren ( 15 ).

Von Beginn an war es auch ein Ziel, die einzelnen für das Weiterleben der Zellen notwendigen Komponenten der Kulturmedien ausfindig zu machen. Wiederum war es Carrel, der den wachstumsfördernden Effekt von Embryonalextrakten auf bestimmte Zellen entdeckte. Anstelle von Lymphem erfolgte wenig später der Einsatz von Plasma durch Burrows ( 11 ). Zunehmend gelang es, zunächst durch eine mechanische Behandlung, isolierte Zellen zu gewinnen, anstatt Gewebeexplantate zu kultivieren.

Insbesondere Dulbecco ( 20 ) ist zu erwähnen, der 1954 mit Hilfe proteolytischer Enzyme Einzelzellen aus Gewebeverbänden isolierte. Damit erfolgte der Übergang von der Gewebekultur zur Zellkultur.

### **Begriffsdefinitionen**

Eine *Zellkultur* unterscheidet sich von einer Gewebekultur durch das Vorliegen von Einzelzellen bei Beginn der Kultivierung. Zellkulturen lassen sich in *Primärkulturen* und *Zelllinien* einteilen. Dabei handelt es sich bei der Primärkultur um Zellen, die unmittelbar aus einem Organismus entnommen und *in vitro* kultiviert wurden. Aus dieser Primärkultur können wiederum Subkulturen ( *Passagen* ) angelegt werden.

Definitionsgemäß wird die erste Subkultivierung aus einer Primärkultur als *Zelllinie* bezeichnet. Eine sogenannte etablierte Zelllinie läßt sich dann *in vitro* auf Dauer subkultivieren. Der Terminus *Zellstamm* bezieht sich auf eine Zellpopulation die, von einer Primärkultur oder Zelllinie abstammend, ganz spezifische Merkmale aufweist. Die Charakteristika einer Zellpopulation, wie z.B. das Wachstum und die Differenzierung, stehen in einem engen Zusammenhang mit den Bedingungen ihrer Kultivierung. So gilt allgemein, dass Zellen im Verlauf einer längeren Kultivierung entdifferenzieren können. Um die Ergebnisse unterschiedlicher *in vitro* Studien zu beurteilen, ist daher eine präzise und einheitliche Nomenklatur geboten. Zu diesem Zweck hat das Komitee für Nomenklatur der Gewebekultur- Terminologie eine verbindliche Definition erarbeitet.

## **Kultivierung der Vulvakarzinomzelllinie**

Die neu etablierte Vulvakarzinomzelllinie stammt von dem Tumorexplantat einer 73-jährigen Patientin der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf. (histopathologische Diagnose: gut differenziertes, verhornendes Plattenepithelkarzinom)

Die Kultivierung der Vulvakarzinomzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz in Gewebekulturflaschen unter Zugabe der Medien RPMI und DMEM. Die beim regelmäßigen Mediumwechsel anfallenden Überstände wurden ebenfalls kultiviert. Der serumhaltige Zusatz

( *fetales Kälberserum* ) im Medium wurde schrittweise durch das vollsynthetische Medium Basalmedium Supplement ( BMS ) ersetzt, da Serumbestandteile oft Inhibitoren enthalten, die einen Effekt auf das Zellwachstum ausüben können. Aufgrund dieses Nachteils wird stets die serumfreie Kultivierung angestrebt.

Aus einer Einzelzellsuspension der Stammzellen V 1 und V 2 wurden verschiedene Klone etabliert. Dieses erfolgte nach dem Verfahren der Reihenverdünnung auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit der Absicht einzeln wachsende Zellen innerhalb eines Wells zu erhalten. Die davon jeweils ausgehenden Zelllinien wurden nach der Lokalisation der ursprünglichen Einzelzelle auf der Mikrotiterplatte benannt. In der vorliegenden Arbeit wurden neben den Stammzellen V 1 und V 2 die Klone E 6 und C 7 II untersucht.

Die Beibehaltung der malignen Eigenschaften der Vulvakarzinomzelllinie - auch in vitro Langzeitkultur - konnte im Tierversuch demonstriert werden.

Dazu erfolgte die Implantation einzelner Klone unterhalb der Nierenkapsel der Maus. Es wuchsen hier Tumoren heran, die histologisch einem gut differenzierten verhornenden Plattenepithelkarzinom entsprachen ( 47 ).

## 1.2 Tumorimmunologische Grundlagen

### Immunreaktion auf Tumoren

Bösartige Tumoren sind Neubildungen, die durch einen unterschiedlich ausgeprägtem Verlust ihrer ursprünglichen Differenzierung zugunsten ihres Expansionsverhaltens charakterisiert sind. Die maligne transformierte Zelle verliert die Fähigkeit der Apoptose, also des programmierten Zelltodes und ist damit nicht mehr den Gesetzen der Wachstumskontrolle unterworfen. Das Immunsystem verfügt über Abwehrmechanismen, die eine Tumorzelle identifizieren und ein Tumorwachstum verhindern oder einschränken können. Burnet und Thomas ( 10 ) postulierten in den 70er Jahren die Theorie von der *Immunsurveillance* nach der nur die transformierten Zellen, die der ständigen zellulären und humoralen Überwachung des Immunsystems entgangen sind, zu Malignomen führen. Besonders zelluläre, zytotoxische Reaktionen sind dafür entscheidend, können aber nicht allein verantwortlich sein, da bekanntlich die Malignominzidenz bei Menschen mit zellulären Immundefekten lediglich in Bezug auf Lymphome erhöht ist. Viele Reaktionen auf neoplastische Zellen sind inzwischen bekannt. Bisher kann aber kein allgemeingültiger Mechanismus beschrieben werden.

### Tumor - escape - Mechanismen

Obwohl das Immunsystem über zelluläre und humorale Abwehrmethoden gegen Krebszellen verfügt, ist nur zu deutlich, dass eine Aktivierung oft nicht stattfindet. Tumorzellen verfügen über Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, der Immunabwehr zu entgehen ( *Tumor - escape* ). Die wichtigsten Gründe für ein Versagen der Tumorüberwachung sollen kurz umrissen werden:

### *Bedeutung der MHC Exprimierung für die Immunogenität der Tumorzellen*

Einige Tumoren verfügen über gar keine immunogenen Peptide, andere exprimieren normale Membrankomponenten in lediglich inadäquater Dichte. Tumorantigene auf transformierten Zellen umfassen die Exprimierung von tumorspezifischen Oberflächenantigenen ( TSSA ), tumorassoziierten Antigenen ( TAA ), embryonalen und individual- spezifischen Antigenen. Dennoch provozieren diese Oberflächendeterminanten häufig keine Immunantwort:

Wie gezeigt werden konnte, werden Veränderungen in der Exprimierung des MHC – Komplexes ( main histocompatibility complex ) an Tumorzellen nicht selten beobachtet ( 40 ). Eine verminderte oder fehlende Expression von MHC -Klasse – I - Molekülen umgeht die Effektormechanismen der Klasse - I restringierten zytotoxischen T-Zellen ( CD8+ ). Die Immunogenität einer Tumorzelle ist nicht allein von der Art ihres spezifischen Antigens abhängig, sondern auch von der Anwesenheit von HLA - Molekülen auf ihrer Oberfläche. Eine mangelhafte Präsentation der Tumorantigene durch Fehlen der antigenpräsentierenden Oberflächenmoleküle ( MHC ) führt also dazu, dass diese für zytotoxische T- Lymphozyten praktisch unsichtbar sind.

MHC - Klasse - II - Moleküle werden auf den wenigsten menschlichen Krebszellen gefunden, so dass eine Aktivierung tumorspezifischer T - Helferzellen ( CD4+ ) ebenfalls ausbleibt.

Zu dem Selektionsvorteil nicht immunogener Tumorzellen, kommt die Tatsache der genetischen Instabilität einer transformierten Zelle. Selbst wenn eine Immunantwort ausgelöst wird, können Zellklone mit neuen antigenen Eigenschaften entstehen, die wiederum der Immunabwehr entgehen.

### *Blockierung von Aktivierungsmechanismen durch den Tumor*

Aktiv vom Tumor sezernierte Zytokine supprimieren die zelluläre Abwehr. Der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  ( TGF- $\beta$  ), der in Zellkulturen entdeckt wurde, ist ein Beispiel.

### *Genetisch bedingte und erworbene Immundefekte*

Angeborene und erworbene Defekte der zellulären Immunität prädisponieren zu Malignomen. Die Ursachen hierfür sind Infektionen ( HIV ), iatrogene Induktion ( Immunsuppressiva, Radiatio ) und die sehr seltenen primären Defekte ( Wiskott-Aldrich Syndrom, Ataxia Teleangiectatica ).

### 1.3. Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die als Mediatoren der zellvermittelten Immunität sowie bei unspezifischen Entzündungsreaktionen wirken.

Sie werden von Leukozyten und verschiedenen anderen Körperzellen gebildet. Unterschiedliche Zelltypen bilden häufig das gleiche Zytokin. Ebenfalls wirkt oft das gleiche Zytokin auf verschiedene Körperzellen. Die Sekretion erfolgt als Reaktion auf einen entzündlichen oder antigenen Stimulus.

Die Wirkung ist in der Regel nicht systemisch sondern lokal begrenzt (autokrin und parakrin) was sie von den Hormonen unterscheidet.

Wie diese binden aber auch Zytokine hochspezifisch und mit einer hohen Affinität an Rezeptoren. Daraus ergibt sich, dass bereits minimale Zytokinkonzentrationen eine biologische Aktivität besitzen. Die Bildung des Zytokin-Rezeptorkomplexes bedeutet für den Zellkern das Signal zur Transkription neuer Gene.

Zytokine beeinflussen die Wirkung und die Synthese anderer Zytokine. Dieses geschieht oft im Sinne einer positiven Rückkopplung. Einige Zytokine wirken synergistisch. In diesem Zusammenhang hat sich der Begriff *Zytokinnetzwerk* etabliert. Es soll hier nicht mehr als eine vereinfachte Übersicht zu diesem Zytokinnetzwerk gegeben werden. Aufgrund ihrer wichtigsten Funktionen lassen sich die Zytokine in vier Gruppen unterteilen:

I. Vermittler der natürlichen Immunität: IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$ , Tumor Necrosis Faktor (TNF), Interleukine (IL-1, IL-2), chemotaxisvermittelnde Zytokine

II. Regulatoren des Wachstums und der Differenzierung von B- und T-Zellen: IL-2, IL-4, Transforming Growth Factor -  $\beta$

III. durch T -Lymphozyten gebildete Aktivatoren bei Entzündungsreaktionen:  
IFN  $\gamma$ , Lymphotoxin, IL-10, IL-5, IL-12

IV. Zytokine der Hämatopoese: verschiedene Colony Stimulating Factors  
(CSF)

### **Interferone (IFN)**

Die 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckten INF sind typische Vertreter der Substanzklasse der Zytokine. Stärkstes Signal zur Synthese von IFN ist eine virale Infektion. Ebenso induziert ein Antigenkontakt die Bildung von IFN. Die IFN - Wirkung ist speziesspezifisch, jedoch virusunspezifisch.

Die biologische IFN- Aktivität wird in einem standardisierten Testsystem definiert. Demnach entspricht eine internationale Einheit ( i.E.) der IFN -Menge, die in einem bestimmten Zellkulturrasen die Lyse durch einen Testvirus zu 50% verhindert. Als Vergleich gilt eine WHO- Standardkurve. Ihrer Antigenität entsprechend werden derzeit drei verschiedene INF unterschieden.

#### *Typ I IFN:*

Das vorwiegend von Leukozyten gebildete IFN  $\alpha$  und das von Fibroblasten sezernierte IFN  $\beta$  werden aufgrund ihrer Säurestabilität als Typ I IFN bezeichnet. Von IFN  $\alpha$  sind bislang ca. 20 Subtypen bekannt, die sich geringfügig in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Beide Typ I IFN binden an einen identischen Rezeptor.

*Typ II IFN:*

IFN  $\gamma$  wird von Lymphozyten synthetisiert, ist säurelabil und besitzt einen eigenen Rezeptor. Zur Zeit ist ein Subtyp bekannt.

Das Wirkungsspektrum der IFN ist vielfältig und umfaßt im Wesentlichen antivirale, antitumorale und immunmodulierende Aktivitäten. Für therapeutische Zwecke im Rahmen der Onkologie stehen dabei die antitumoralen und immunmodulatorischen Eigenschaften im Vordergrund.

### **IFN - antitumorale Aktivitäten**

#### *antiproliferativer Effekt*

Im Vordergrund der antitumoralen Wirkungen von IFN  $\alpha$  steht der dosisabhängige, antiproliferative Effekt der durch eine Verlangsamung sämtlicher Phasen des Zellzyklus gekennzeichnet ist. Dieser Effekt ist in vitro bisher mehrfach an normalen und malignen Zellen, demonstriert worden.

#### *Induktion von antigenpräsentierenden Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen*

Nach in vitro Inkubation von Tumorzellen mit IFN  $\alpha$  läßt sich eine vermehrte MHC - Klasse - I - Antigenexprimierung feststellen. IFN  $\gamma$  induziert zusätzlich die MHC - Klasse - II - Exprimierung ( 22 ). Beide Phänomene können zu einer Verstärkung der Immunogenität von Tumorzellen beitragen:

Tumorspezifische Membranantigene, die zusammen mit MHC - Molekülen präsentiert werden, können als Signal zur Aktivierung zellulärer Abwehrmechanismen dienen.

### *Induktion zur Differenzierung maligner Zellen*

Einige in vitro Beobachtungen deuten darauf hin, dass IFN einen noch weitergehenden Effekt auf die Oberflächenantigenexpression hat, der auf eine Rolle als Induktor der Zelldifferenzierung hinweist ( 16, 28 ). Eine Veränderung der Zelldifferenzierung im Sinne einer Reversion des malignen Phänotypus kann mit einem Verlust der Malignität gleichgesetzt werden.

#### **1.4. Die in der Arbeit verwendeten Differenzierungsmarker**

Differenzierungsmarker sind zelluläre Komponenten, die für ein bestimmtes, ausdifferenziertes Gewebe charakteristisch sind. Ihre qualitative und quantitative Analyse ermöglicht eine Gewebstypisierung sowie Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad eines Gewebes. Die in der Arbeit untersuchten Differenzierungsmarker sollen in kurzer Form beschrieben werden:

##### **Zytokeratine**

Die Intermediärfilamente - Faserstrukturen des Zytoskeletts - haben einen wichtigen Stellenwert als Differenzierungsmarker. Sie werden zellspezifisch und differenzierungsspezifisch exprimiert. Es sind fünf Intermediärfilament - Typen bekannt, wobei die Zytokeratine charakteristisch für Epithelzellen sind. Die Polypeptidfamilie der Zytokeratine ist, im Gegensatz zu anderen Intermediärfilamenten, sehr heterogen. Es lassen sich mindestens zwanzig verschiedene Peptide abgrenzen ( ZK 1-20 ).

Entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften werden saure von basischen Zytokeratinen unterschieden. Sie werden in charakteristischen Mustern exprimiert : ein saures Zytokeratin ist stets mit einem basischen assoziiert. Die Exprimierung der einzelnen Paare ist zusätzlich kennzeichnend für den jeweiligen Epitheltyp ( 41 ) . So werden die ZK 1-6 und 7 -19 typischerweise in Plattenepithelien angetroffen.

Ihre konstante Exprimierung, auch in maligne transformierten Zellen, erlauben ihre Verwendung zur Klassifikation und Differenzierung von Malignomen. Die antigenen Determinanten lassen sich mit monoklonalen Antikörpern definieren und immunhistochemisch darstellen.

### **Epidermal Growth Faktor – Rezeptor ( EGF - R )**

Der EGF-R ist ein Membranrezeptorenprodukt, das auf Epithelzellen vorkommt. Sein Ligand ist der Epidermale Growth Faktor ( EGF ). EGF löst über Tyrosin-Kinase-Aktivität ein Signal zur Proliferation aus. Dieser Vorgang spielt eine physiologische Rolle bei Embryogenese und Zellregeneration. Unkontrollierte Stimulation führt zur autonomen Zellproliferation. Der EGF-R wird immunhistochemisch nachgewiesen.

### **p 53**

Das p53 - Tumorsuppressorgen kodiert ein Protein von 53 kDa, welches die Expression zahlreicher, den Zellzyklus bestimmender Gene reguliert. Nach DNA - Schäden wirkt es hemmend auf ein Fortschreiten des Zellzyklus ein. So wird den gleichzeitig einsetzenden zelleigenen Reperaturvorgängen Zeit eingeräumt. Diese Funktion wurde von Lane als „Wächter des Genoms“ beschrieben ( 35 ). Die Mutation dieses Proteins führt zu einem Verlust dieser Funktion. Da Mechanismen der DNA Reperatur betroffen sind, kann es zu einer Ansammlung von Zellen mit DNA Schäden kommen. Nachgewiesen wird das p53 immunhistochemisch oder mit gelelektrophoretischen Techniken. Seine Rolle als Differenzierungsmarker und seine prognostische Wertigkeit werden zur Zeit diskutiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### Tumorzellen

Die Stammzellen V1 und V2 sowie die beiden Klone E6 und C7II wurden in Monolayer Kulturflaschen ( GREINER ® ) im Brutschrank bei 37°C unter Zusatz von 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei minus 80°C eingefroren.

#### Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur rasch aufgetaut. Vor dem Lösen des letzten Eisklumpchens wurden die Zellen vorsichtig in 4° C kaltes Medium überführt. Ein zu rasches Einbringen kann die Zellmembran beschädigen. Das Auswaschen des Gefrierschutzes erfolgte durch die 5 minütige Zentrifugation bei 800 U / min. Nach dem Dekantieren wurde nochmals mit 37° C warmen Medium gewaschen.

#### Reagenzien

##### *Kulturmedien*

DMEM und RPMI, BIOCHROM

jeweils mit Zusätzen:

- Basalmedium Supplement, BMS	10 ml /100ml
- L – Glutamin 200mM	1 ml / 100ml
- Penicillin / Streptomycin 10000 iE / 10000µg/ml	1 ml / 100ml
- Na - Pyruvat 100mM	1 ml / 100ml
- Insulin	8 IE / 100ml
- Östradiol	100 µl/100ml
- Transferrin	2,5mg/100ml
- Hydrokortison	180µl /100ml

*Trypsin* EDTA, BOEHRINGER, 0,05%  
*Hanks* (mit Zusätzen: BSA 0.1%, Na - Acid (0.05%))

*PBS*

*Interferon  $\alpha$*  Roferon  $\text{\textcircled{R}}$ , ROCHE, rekombinantes IFN  $\alpha$ -2

*Interferon  $\gamma$*  Interferon  $\gamma$  - 100  $\text{\textcircled{R}}$ , BIOFERON,

*Schaf -Normalserum* DAKO, Cd X050320

*DAB - Puffertabletten* Diaminobenzidin MERCK (1Tbl /10ml Aqua dest.)

### **Antikörper**

*Monoklonal Antibody* IMMUNOTECH - SA, France,

*Anti- $\beta$ 2 -Mikroglobulin* Isotype:IgG 2a Kappa (Mouse)

*Monoklonal Antibody* IMMUNOTECH - SA, France ,

*anti - HLA class II* Isotype: IgG 2b Kappa (Mouse)

*Sheep F'ab fragment* Anti - Mouse Ig, FITC Conjugate , Firma NEI

*EGF-R (Mab 425)* polyclon. rabbit IgG 1 Kappa ( AB-4 )  
(ONCOGENE SCIENCE)

*p 53 ( mut.)* DIANOVA, Pab 240 mouse IgG 1 (Ab-3)

DAKO, Mab mouse IgG 1 Kappa:

*anti - Cytokeratin 1* Clone LP 34

*anti - Cytokeratin 7* Clone OVTL 12130

*anti - Cytokeratin 18* Clone CY 90

*anti - Cytokeratin 19* Mab mouse IgG 1 Kappa (DAKOPATTS)  
Clone B 17

- VECTASTAIN* ®, • Primärantikörper: Mouse, anti - human IgG  
Firma *CAMON* • Horse - Normalserum  
*ABC KIT (Mouse IgG)* • Zweitantikörper: biotinylierter anti- mouse IgG  
•ABC Komplex : Avidin DH + biotin. horse -  
radish Peroxidase

### **Geräte**

Durchflußzytometer ORTHO / Cytoronabsolute, *Johnson* mit Software  
Version 2.1, Zellkulturarbeitsplatz nach DIN 2, Absaugvorrichtung,  
Zentrifuge, Mixomat

## 2.2. Methoden

### Testansatz zur Bestimmung des Wachstumverhaltens

Die Wirkung von IFN  $\alpha$  auf das Wachstum von V1, C7 II und E6 sollte im folgenden Experiment untersucht werden: Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde unter einer konstanten Konzentration von 100 ng IFN- $\alpha$  / ml Medium über einen Zeitraum von acht Tagen beobachtet. Die Zellen wurden in eine Monolayerplatte wie in Abbildung 1 dargestellt eingesetzt. Dabei erfolgte die Einsaat der Zellzahl pro Well unter Berücksichtigung der vor auszusehenden Zellproliferation. Die äußeren Bedingungen wurden gleichbleibend bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Verglichen wurde mit einer gleichzeitig geführten, unbehandelten Kontrollgruppe. Alle 24 Stunden wurden die entsprechenden Zellen (wie unten beschrieben) aus dem entsprechenden Well der Monolayerplatte trypsiniert und die Zellzahl in einem Dreifachansatz durchflußzytometrisch bestimmt. Der Mittelwert der Zellzahl aus diesem Testansatz wurde gegen den Zeitverlauf (Tag 1-8) graphisch aufgetragen.

Zellen/ $\mu$ l:	V1 /IFN	V 1	E6/IFN	E6	C7 /IFN	C7	Tag
							1
500							2
500							3
500							4
500							5
250							6
250							7
250							8

Abb.1

## **Testansatz zur Bestimmung der HLA - Expression**

Zur Untersuchung der Expression von HLA Klasse I und II - Molekülen wurden die Stammzelle V1 sowie die Klone E6 und C7II mit Interferon- $\alpha$  und Interferon -  $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert.

### *Inkubierung mit Interferon*

In einem doppelten Testansatz wurden in eine 96-Loch Mikrotiterplatte jeweils 50 000 Zellen / Well eingesetzt. Es folgte die Zugabe von IFN  $\alpha$  - und IFN  $\gamma$  - Lösungen in den Konzentrationen 100 ng / ml, 50 ng / ml und 10 ng / ml im Kulturmedium. Zur Negativkontrolle wurde das nachfolgende Well ausschließlich mit Kulturmedium behandelt. Über 48 Stunden wurden die Zellen bei konstanten Bedingungen im Brutschrank bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### *Trypsinieren der Zellen aus der Mikroplatte*

Nach 48 Stunden wurden die Zellen aus der Mikroplatte herausgelöst:

- Platte schräg halten und Absaugen des Kulturmediums / IFN -Lösung
- Zutropfen von 100  $\mu$ l Trypsin - EDTA und sofort wieder absaugen
- erneute Beschichtung mit 50  $\mu$ l Trypsin – EDTA
- bei 37°C im Brutschrank ca. 20 min einwirken lassen bis die Zellen sich abrunden und vom Plattenboden ablösen .

### *HLA - Testung*

Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen in die entsprechenden Teströhrchen überführt. Diese wurden zuvor über Nacht mit 2 ml HANK's Lösung (+ Zusätze ) bei 4°C vorbeschichtet. Die Zellen jeweils eines Wells wurden wie unten beschrieben auf drei verschiedene

Teströhrchen ( Nr.1 - 3 ) verteilt. Zur Inaktivierung des Trypsins und zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde jedem Teströhrchen 0,05 ml Schaf Normalserum ( SNS 1:10 ) zugesetzt.

Ein Anwachsen der Zellen an der Wand des Teströhrchens wurde durch Aufschütteln verhindert. Nach einer Einwirkzeit des SNS von 15 min wurden die Zellen einmal mit HANK's Puffer gewaschen.

Im folgenden Schritt erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 x 10 min bei 4° C. Zwischendurch wurden die Testgefäße einmal aufgeschüttelt. Die Primärantikörper wurden wie folgt verteilt:

Teströhrchen: Nr.1 : HLA-Klasse I Antikörper

Nr.2 : HLA-Klasse II Antikörper

Nr.3 : Negativ - Kontrolle ( Mausserum / bzw. HANK's)

Der Sekundärantikörper ( das F`ab Fragment des Schaf-Antimaus -AK) wurde nach zweimaligem Waschen für 2 x 15 min bei 4°C aufgetragen. Nach wiederum zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 0,7 ml HANK's - Formalin 0,02% fixiert. Bis zur durchflußzytometrischen Analyse wurden sie bei 4°C aufbewahrt.

Die Messung der Zellzahl und Fluoreszenzdichte erfolgte im Fluorescence Activated Cell Sorter *CYTOTRON / ABSOLUT* mit einer Meßzeit von 120 Sekunden je Probe.

## **Testansatz zur Bestimmung der Differenzierungsmarker**

Die Exprimierung des Panzytokeratins ( 1 ) der Firma DAKO und der Zytokeratine 7,18, und 19, sowie vom EGF-Rezeptor und von p53 unter Interferon  $\alpha$  Einfluß wurde über einen Zeitraum von 1 – 8 respektive 10 Tagen beobachtet. Dazu wurden die Zellen V1, V2, C7II und E6 zunächst in einer 24- Loch Mikroplatte unter Zugabe von 100ng IFN $\alpha$  / ml im Kulturmedium angezüchtet. Die Zellzahl pro Well richtete sich dabei nach den in den Wachstumskurven ermittelten günstigsten Mengen. Als Kontrolle diente die gleiche Reihe von Zellen, jedoch nicht mit Interferon  $\alpha$  behandelt. 24 Stunden vor dem immunhistochemischen Test wurden die Zellen trypsiniert und auf Multitestobjektträger überführt, die zuvor sowohl mit Alkohol als auch mit destillierten Wasser gesäubert wurden. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit IFN  $\alpha$  inkubiert und dann für den Test fixiert.

Dabei wurden die Zellen wahrscheinlich nicht lange genug angetrocknet, so dass viele vom Objektträger abschwammen und der Test für manche Tage wiederholt werden mußte. Hier modifizierten wir die Vorgehensweise, indem wir sofort auf Multitestobjektträgern, die in sterilen Petrischalen gehalten wurden, inkubierten. Diese wurden dazu nach dem Reinigen kurz in Medium vorinkubiert. Das Medium enthielt, wie oben beschrieben schon 100 ng Interferon  $\alpha$  / ml. Die Kontrollzellen wurden wiederum nur mit Medium behandelt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Zu den gegebenen Zeiten wurden die entsprechenden Objektträger aus den Petrischalen entnommen und die Zellen wie angegeben angetrocknet und fixiert. Bei dieser Methode erfolgte kaum ein Abschwemmen der Zellen.

### *Fixierung*

Nach der Entnahme des Objektträgers aus der Petrischale erfolgte die Beschriftung und das sofortige Abspülen der Medium - / IFN- Rückstände mit Hanks – Lösung. Zur Erhaltung der Antigenität der Membranbestandteile wurde mit eiskaltem Methanol / Aceton ( 1:1 ) für 5 min fixiert und anschließend luftgetrocknet. Bis zur immunhistochemischen Analyse wurden die Präparate bei -20°C aufbewahrt.

### **Immunhistochemie**

Die Präparate wurden nach der Avidin - Biotin - Methode bearbeitet. Als Dedektionssystem diente das Vectastain ®. ABC - Kit der Firma CAMON

Alle Arbeitsschritte fanden in einer feuchten Kammer statt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden.

Die Primärantikörper wurden mit PBS ( Hanks) wie folgt verdünnt:

ZK 1 1:100	ZK 19 1:20	p-53 mut. 1: 50
ZK 7 1: 50	EGF-R 1:50	ZK 18 1:400

Bei der Negativkontrolle erfolgte die Zugabe von Mausserum an Stelle des Primärantikörpers. Das Waschen zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde mit PBS - Puffer, jeweils 3 x 5 min durchgeführt.

Nach dem Auftauen wurden die Präparate mit dem Pappens Stift eingekreist und mit Pferdeserum für 30 min bei Raumtemperatur ( RT ) vorinkubiert.

Der Primärantikörper ( Mouse, anti-human ) wurde für 60 min bei RT aufgetragen – anschließend erfolgte das Waschen.

Die Hemmung der endogener Peroxydasen erfolgte mit einem Methanol / H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> Gemisch ( 80ml : 0,12ml ) für 30 min bei RT.

Als Zweit - Antikörper diente ein biotinisierendes anti mouse IgG, das 30 min bei RT einwirkte - danach erfolgte ein erneutes Waschen.

Im Anschluß wurde der Avidin - Biotin - Komplex aufgetragen mit einer Inkubationszeit von 30 min bei RT und nochmaligem Waschen.

Die Reaktion mit dem kurz zuvor angesetzten DAB -Reagenz ( 10ml : 5µl H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> ) erfolgte unter Lichtausschluß. Nach ca. 3 min wurde die Reaktion zur Verhinderung einer Überfärbung und zur Abschätzung der Einwirkdauer unter dem Mikroskop kontrolliert.

Abschließend wurden die Objektträger in Leitungswasser überführt, 15 min gewässert und luftgetrocknet. Nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Präparate eingedeckt.

#### *Analyse:*

Die Auswertung der Präparate erfolgte mikroskopisch. Alle Präparate wurden stets vom gleichen Untersucher mikroskopiert und beurteilt. Protokolliert wurden die Intensität der Anfärbung und der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen. Die erhaltenen Daten gingen in einen Immunreaktiven Score ( IRS ) ein. Bewertet wurde dazu der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen, sowie die Intensität der Anfärbung ( Reaktionsstärke mit Faktor 1- 4 ). Der prozentuale Anteil der Zellen mit einer positiven Reaktion wurde mit dem Faktor der Färbeintensität multipliziert. Tage an denen es zu Zellverlusten durch ein Abschwemmen kam, wurden nicht mit einem Score bewertet. Die semiquantitative Auswertung nach dem IRS gilt als hinreichend genau

( 18 ).

#### Bewertung der Reaktionsstärke:

+ / -	schwach positive Reaktion	Faktor 1
+	positiv	Faktor 2
++	mäßig positiv	Faktor 3
+++	stark positiv	Faktor 4

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Resultate der Untersuchung des Wachstumsverhaltens

Wachstumsverhalten der Zellen ohne Zugabe von Interferon

Erwartungsgemäß sinkt die Zellzahl in allen drei untersuchten Zelllinien nach 24 Stunden, also kurz nach der Einsaat in die Monolayerplatte, zunächst ab. Die Wachstumskurve zeigt dann einen langsamen Anstieg.

Die höchste Proliferationsrate zeigt der Klon E 6 ( s.Abb. 2). Ab dem 5. Tag setzt sich hier der Kurvenverlauf deutlicher gegenüber den bisher ähnlich verlaufenden Wachstumskurven von V 1 und C 7 II ab. Es kommt beim Klon E 6 hier zu keiner Plateaubildung, sondern zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zellzahl.

Wachstumsverhalten unter Interferon  $\alpha$

In allen getesteten Zelllinien konnte nach Zusatz von 100 ng /ml IFN  $\alpha$  eine Wachstumshemmung beobachtet werden. Diese Hemmung war in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt.

In den ersten 48 Stunden verläuft die Proliferationsrate der mit IFN  $\alpha$  inkubierten Zellen und der negativen Kontrollgruppe noch ähnlich. Ab dem dritten Tag wird der Unterschied im Kurvenverlauf zwischen den beiden Gruppen deutlich .

Am stärksten wird die Zelllinie V1 durch IFN  $\alpha$  Zugabe im Wachstum gehemmt ( s.Abb.4 ). Allerdings zeigte auch die unbehandelte Kontrollgruppe die niedrigste Proliferationsrate.

Beim Klon C7 II beobachtet man unter IFN -  $\alpha$  ebenfalls noch eine Wachstumshemmung ( s.Abb. 3 ).

Diese ist jedoch deutlich schwächer und entspricht eher dem Wachstumsverhalten der unbehandelten Zelllinien.

Beim Klon E6 zeigt der Wachstumskurvenverlauf ab dem 4. Behandlungstag am deutlichsten den Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen.

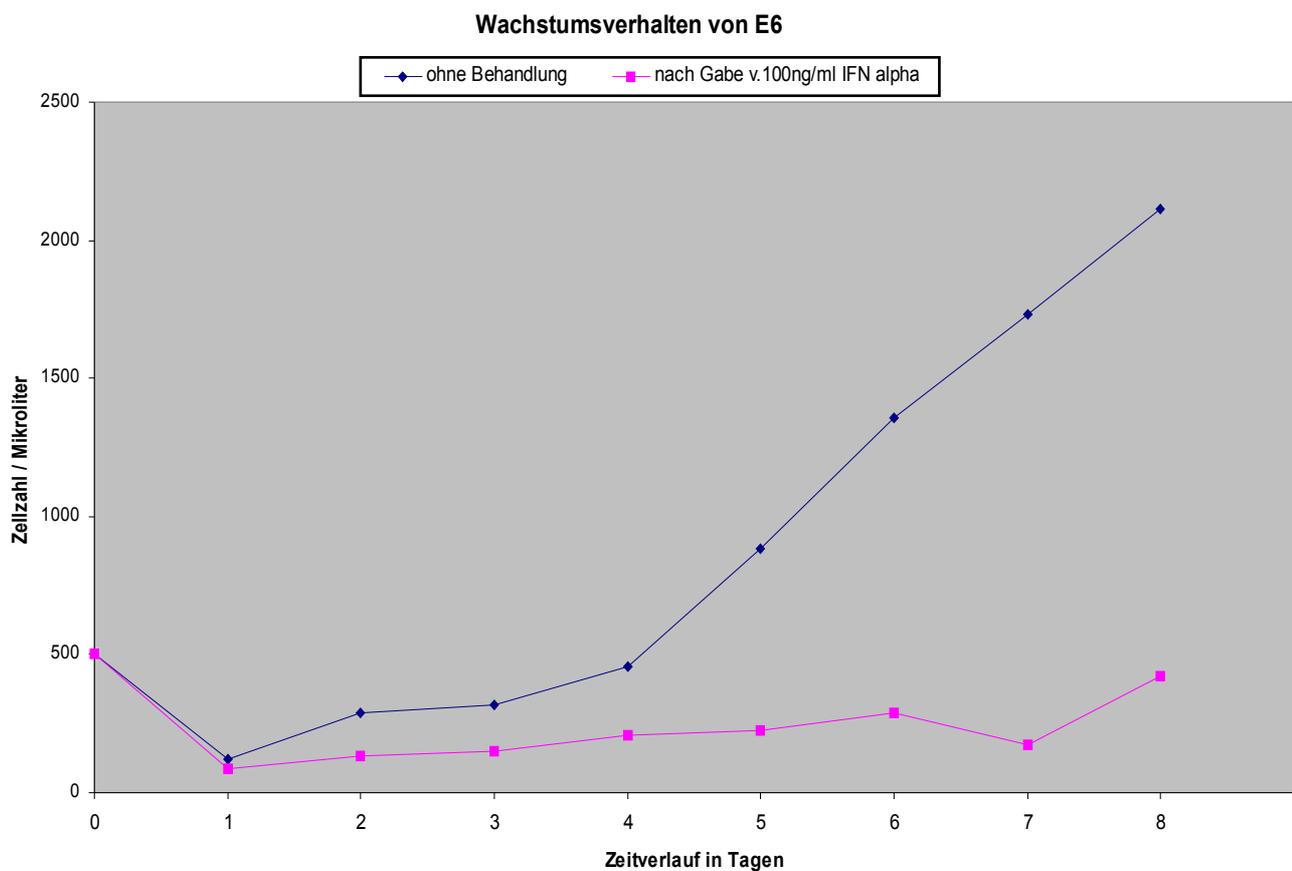


Abb.: 2

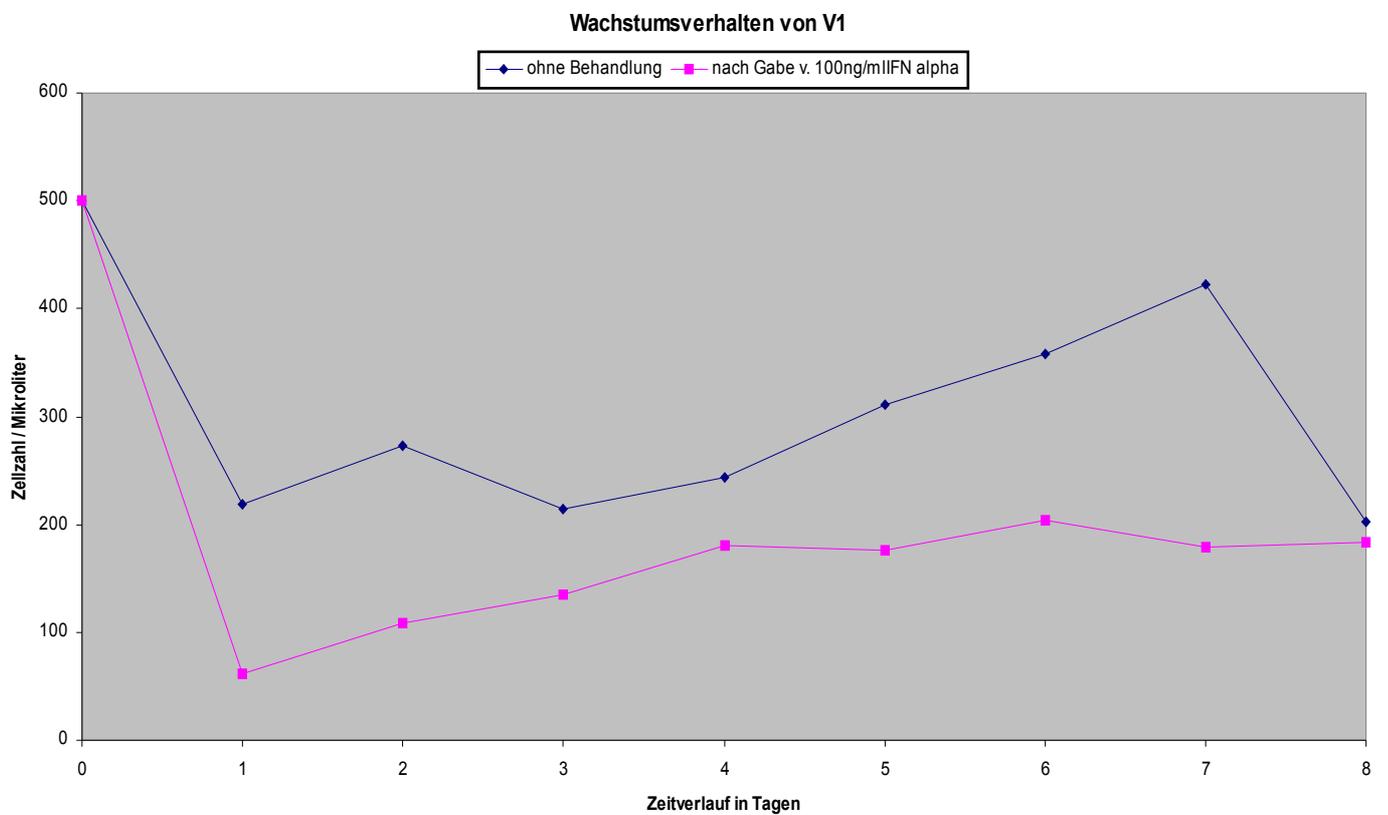
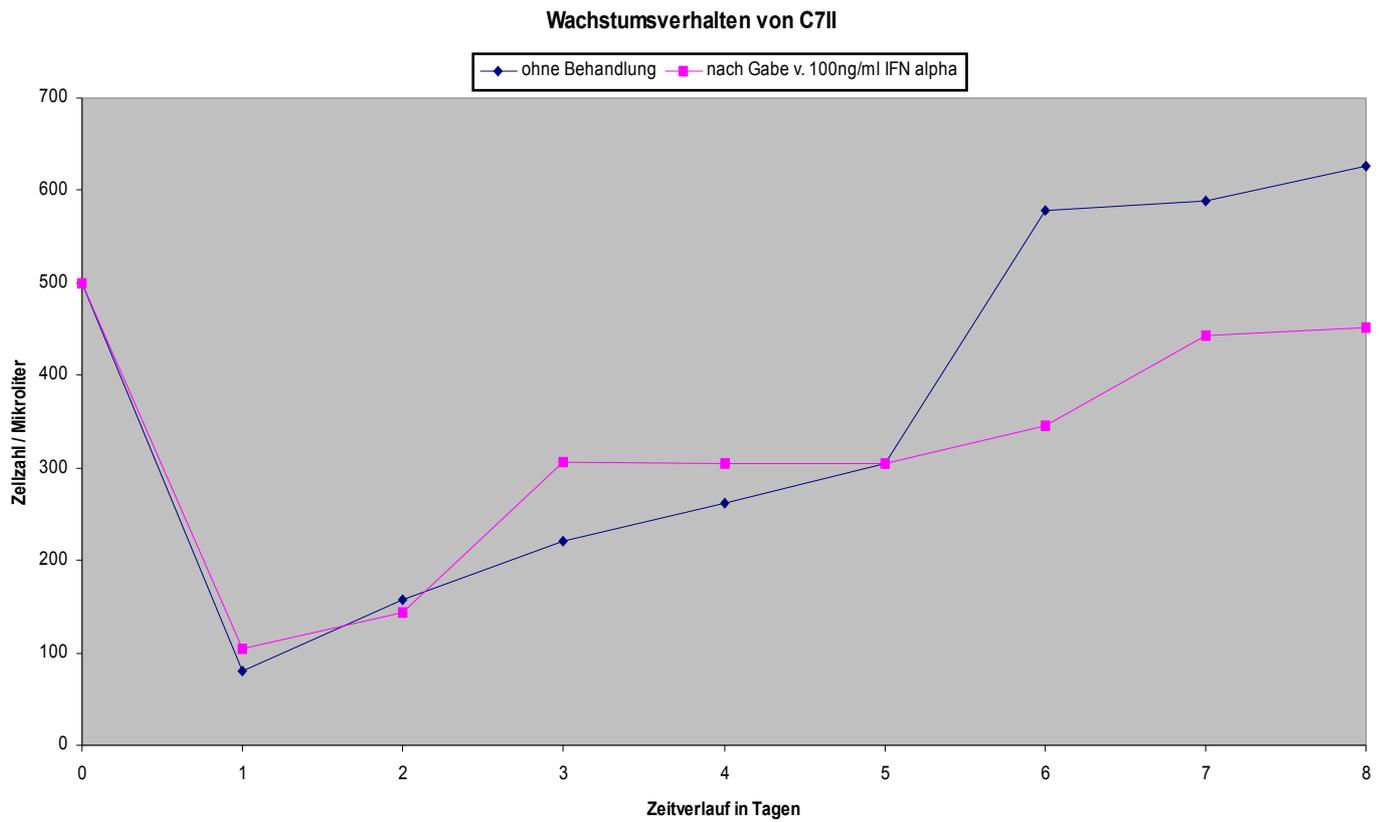


Abb. 3 + Abb.4

### **3.2 Resultate der Untersuchung auf HLA - Expression**

Der Klon E6 zeigte nach der 24 stündigen Inkubation mit 100 ng IFN  $\gamma$  pro  $\mu$ l eine statistisch signifikante Vermehrung der HLA II Expression gegenüber der Kontrollgruppe mit den unbehandelten Zellen. ( nach Man Whitney – Test,  $p = 0,03$  ).

Eine höhere HLA II Expression ließ sich im gleichen Klon auch nach einer 24 stündigen Inkubation mit 50 ng IFN  $\gamma$  /  $\mu$ l feststellen, war aber nicht signifikant (  $p > 0,06$  ).

Im Gegensatz dazu wurde weder in der Stammzelle V1 noch im Klon C7 II nach Inkubation mit Interferon eine statistisch signifikante Änderung der HLA I oder HLA II Expression beobachtet.

In den Abbildungen 5 bis 8 ist in den Diagrammen auf den folgenden Seiten die Antigenmenge in Form der Fluoreszenzdichte dargestellt.

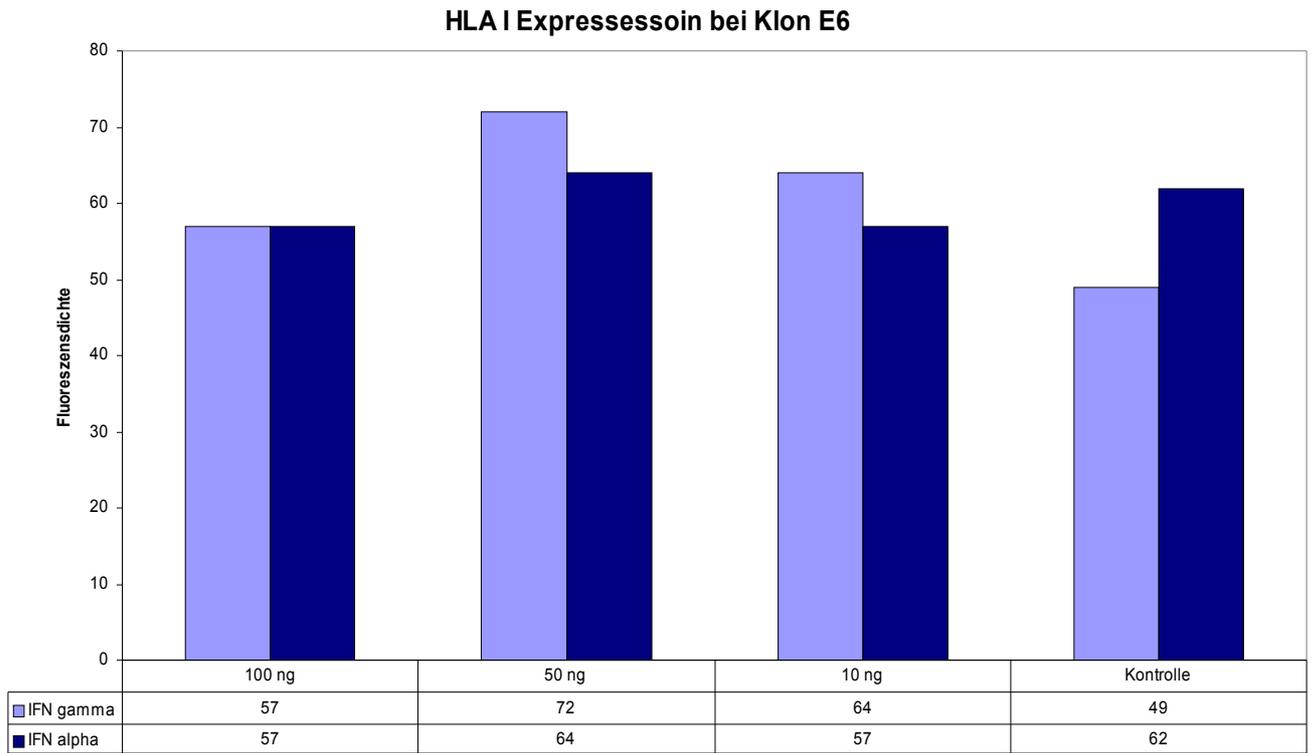


Abb. 5

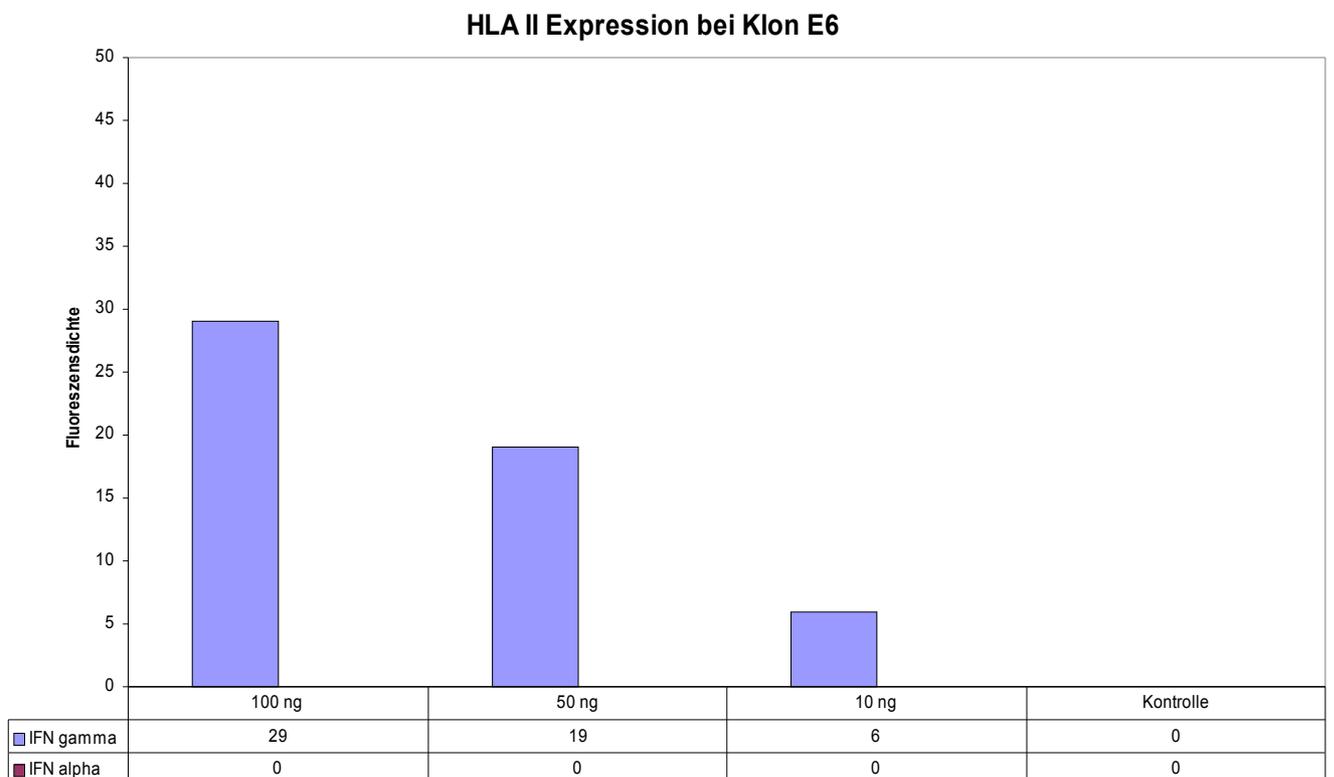


Abb.6

### HLA I Expression bei der Stammzelle V1

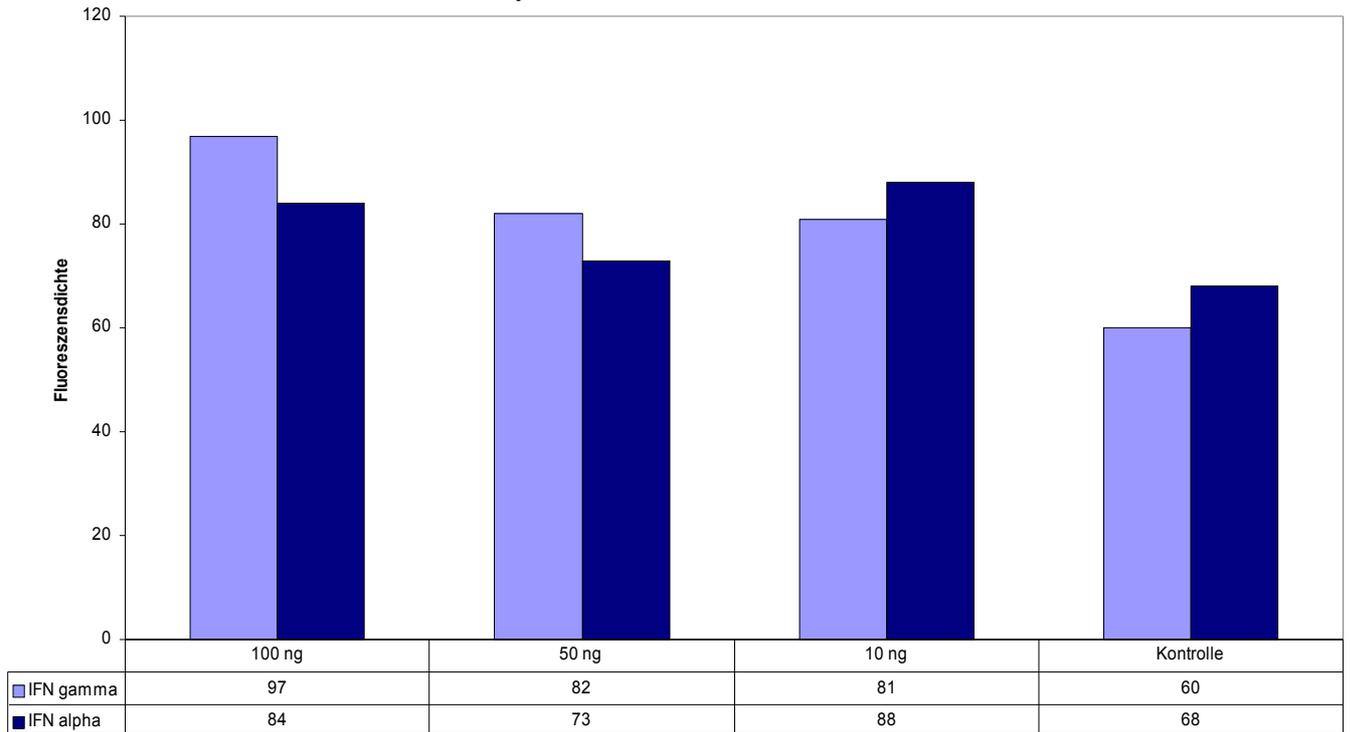


Abb. 7

### HLA II Expression bei der Stammzelle V1

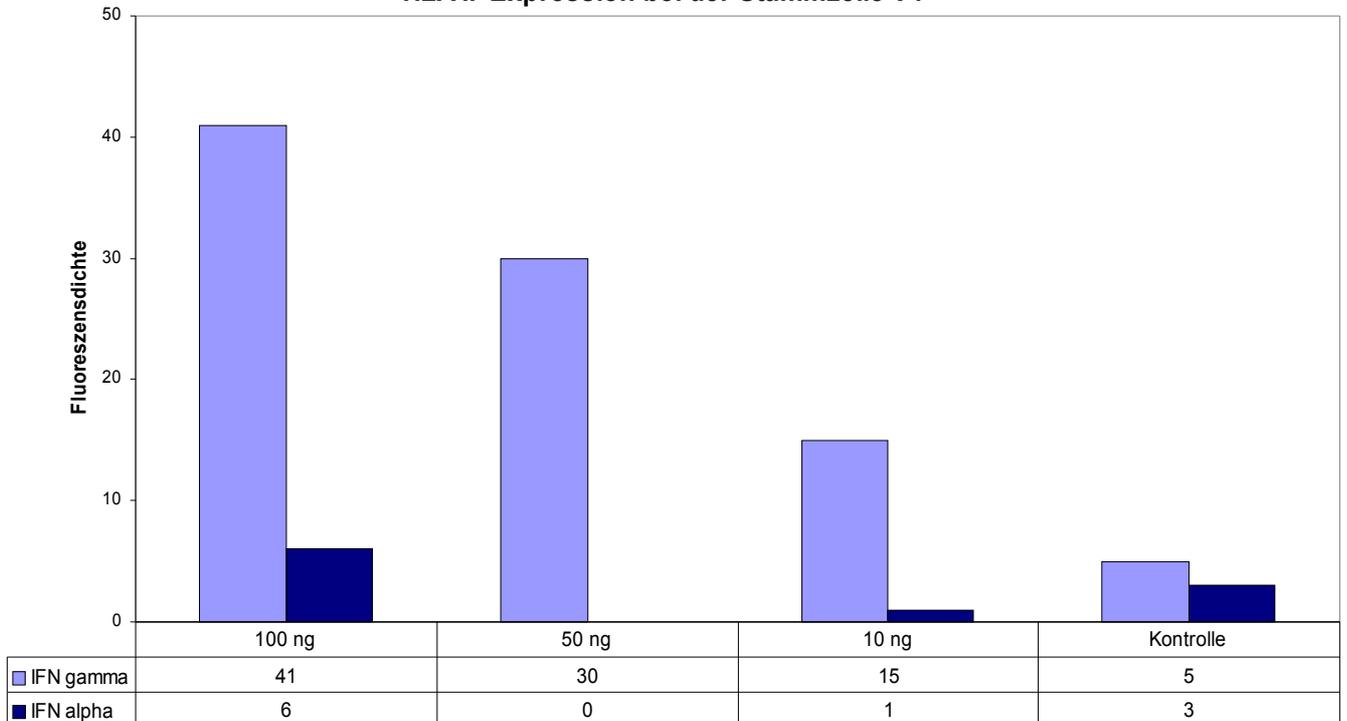
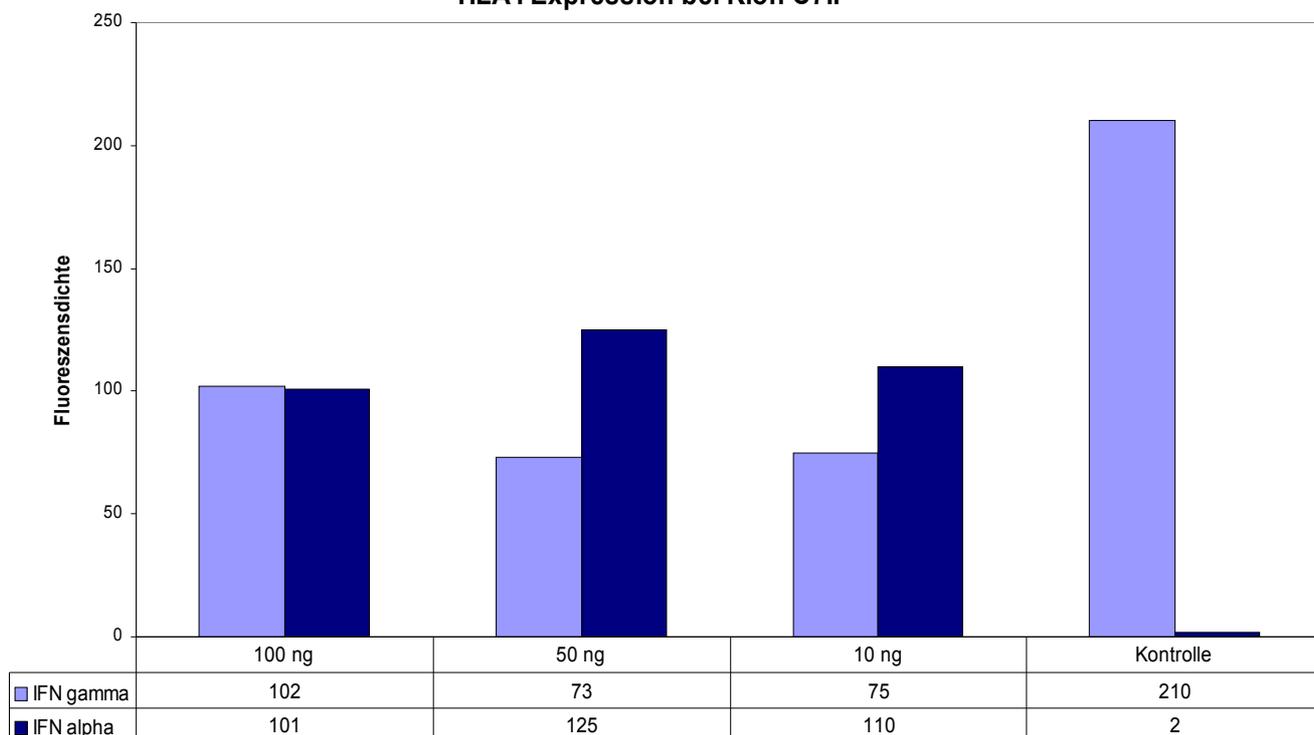


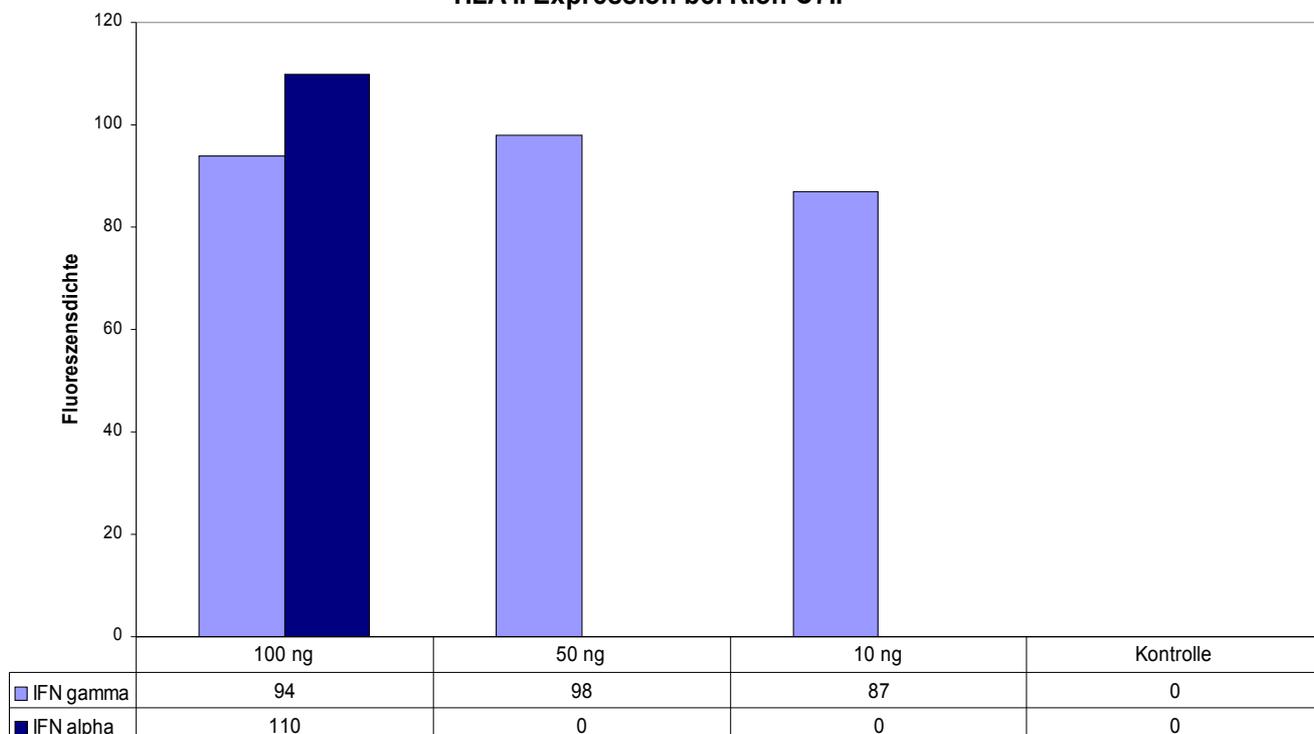
Abb. 8

**HLA I Expression bei Klon C7II**



**Abb. 9**

**HLA II Expression bei Klon C7II**



**Abb.10**

### 3.3. Resultate der Untersuchung der Differenzierungsmarker

Bei diesem Test soll kein statistischer Vergleich von möglichen Unterschieden zwischen der Expression der Differenzierungsmarker mit und ohne IFN  $\alpha$  Behandlung erfolgen.

Vielmehr geht es um einen Versuch der feststellen soll, ob die Zugabe von IFN  $\alpha$  diverse Marker unterschiedlich exprimieren lässt. Insbesondere ist dabei von Interesse, ob es den zuvor erstellten Wachstumskurven folgend, auch zu einem unterschiedlichen kinetischen Prinzip in der Expressierung der Differenzierungsmarker kommt.

Eine statistische Auswertung ist zudem nicht sinnvoll, da es sich um einen einzigen Test handelt. Wie in Material und Methoden beschrieben, benutzten wir zusätzlich ein modifiziertes Testverfahren. In den folgenden Tabellen werden daher die Scores aus beiden Verfahren unterschiedlich angegeben. Die Werte der 2. Methode werden in den hellgrau unterlegten Tabellenfeldern kursiv markiert.

#### EGF - R nach Zugabe von 100ng/ml IFN $\alpha$ (Tabelle 1)

IRS:	V 1		V 2		E 6		C7 II	
Tag:	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K
1	0	0	15	15	0	20	0	0
2	10	40	220	200	0	150	0	0
3	10	60	240	120	270	180	0	180
4			60	140				
5	140	0	120	20	300	240	210	160
6	0	30	80	0	300	0	200	240
7	0	20	0	0	210	400	270	140
8	0	0	100	5	0	0	0	60
9	240	60	0	20	200	15	0	0
10	145	140	40	5	70	80	160	90
<b>ges.</b>	<b>645</b>	<b>350</b>	<b>875</b>	<b>525</b>	<b>1350</b>	<b>1085</b>	<b>840</b>	<b>870</b>

In allen Zelllinien wird der EGF - R exprimiert. Allerdings gibt es Unterschiede im Zeitverlauf. V 2 und E6 scheinen diesen Faktor am Beginn der Wachstumsphase

auszudrücken, während V 1 diesen erst in späteren Phasen exprimiert. C7 II benötigt einige Zeit und drückt das EGF-R erst ca. am 5. Tag aus. IFN  $\alpha$  scheint eine schwache Erhöhung der Expression bei den Zellen V2 und E6 zu bewirken (Tabelle 1).

**p 53 mut. nach Zugabe von 100ng/ml IFN $\alpha$**  (Tabelle 2)

IRS:	V 1		V 2		E 6		C7 II	
Tag:	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K
1	0	0	15	0	0	0	0	0
2	10	0	60	2	0	0	0	0
3	0	0	20	0	60	200	0	0
5	10	0	10	0	180	140	30	0
6	0	0	0	0	300	0	100	100
7	0	0	0	0	20	120	180	40
8	0	0	0	10	0	5	0	60
9	0	0	5	0	80	0	0	0
10	0	0	0	0	20	0	5	0
<b>ges.</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>105</b>	<b>12</b>	<b>660</b>	<b>465</b>	<b>315</b>	<b>200</b>

Die Expressierung, d.h. die Intensität der Anfärbung für das Protein 53 war insgesamt schwach. Es ist jedoch auffallend, dass die Zugabe von IFN  $\alpha$  bei V2, C7II und E6 den Score erhöht. Das geschieht bei V2 in der Anfangszeit des Wachstums, bei C7II ähnlich dem EGFR etwa ab dem 5. Tag und bei E6 gleichmäßig über alle 10 Tage (Tabelle 2).

### Die Zytokeratine

Die Antikörper Zytokeratin 1 der Firma DAKO wurde anfangs von dieser Firma als spezifisch für das Zytokeratin 1 dargestellt und erst im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass es sich um einen Antikörper gegen Panzytokeratin handelt. Alle Zellen zeigten eine Expression aller untersuchten Zytokeratine.

**Panzytokeratin (1) nach Zugabe von 100ng/ml IFN $\alpha$**  (Tabelle 3)

IRS:	V 1		V 2		E 6		C7 II	
Tag:	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K
1	0	0	0	20	0	0	0	0
2	5	5	240	180	0	0	0	0
3	20	90	15	80	210	0	0	15
5	270	0	30	6	270	240	300	320
6	0	30	0	0	400	80	300	320
7	4	320	0	0	400	160	300	180
8	0	80	50	40	5	80	0	0
9	20	180	0	0	Test beendet			
10	14	30	5	5				
<b>ges.</b>	<b>459</b>	<b>735</b>	<b>340</b>	<b>331</b>	<b>1285</b>	<b>560</b>	<b>900</b>	<b>835</b>

Die hier nachgewiesenen Zytokeratine werden in allen Zelllinien ausgedrückt. Der Score verändert sich in Höhe im Laufe der Untersuchungszeit. Nur bei E6 wird eine Zunahme des Scores unter Interferongabe deutlich. Bei den anderen Zelllinien ergeben sich keine Erhöhungen dieses Markers unter IFN  $\alpha$  (Tabelle 3).

**ZK 7 nach Zugabe von 100ng/ml IFN $\alpha$**  (Tabelle 4)

IRS:	V 1		V 2		E 6		C7 II	
Tag:	IFN $\alpha$	K						
1	0	0	0	20	0	0	0	0
2	5	0	20	6	30	40	0	0
3	0	90	3	0	100	0	20	80
5	10	0	4	200	180	320	300	60
6	0	0	0	0	240	0	100	240
7	0	80	5	0	400	120	240	60
8	3	0	0	180	0	0	0	0
9	20	30	0	0	95	15	0	0
<b>ges.</b>	<b>38</b>	<b>200</b>	<b>32</b>	<b>406</b>	<b>935</b>	<b>495</b>	<b>660</b>	<b>440</b>

ZK 7 ist sicher das Zytokeratin, das am wenigsten exprimiert wird. In der Kinetik des Wachstums zeigen sich jedoch einige Unterschiede bei beiden Klonen, die

ein leichte Zunahme des Scores durch Interferon  $\alpha$  darstellen. Bei den Stammzellen dagegen folgt eine Abnahme der Expressierung des Antigens unter Interferonzugabe. ( Tabelle 4 )

**ZK 18 nach Zugabe von 100ng IFN $\alpha$  (Tabelle 5)**

IRS:	V 1		V 2		E 6		C7 II	
Tag:	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K
1	0	0	100	100	0	20	0	0
2	5	0	90	15	140	80	0	0
3	200	60	30	30	240	240	60	210
5	300	90	160	15	80	240	160	40
6	0	0	100	0	240	40	200	240
7	20	180	0	0	400	240	240	80
8	100	0	0	10	0	0	100	0
9	220	40	Test beendet		200	43	Test beendet	
10	180	220			120	270		
<b>ges.</b>	<b>1025</b>	<b>590</b>	<b>330</b>	<b>175</b>	<b>1420</b>	<b>1173</b>	<b>760</b>	<b>570</b>

Die Expressierung von ZK 18 kann an dem Klon E6 am interessantesten dargestellt werden. Der Einfluß von Interferon ist – wenn überhaupt – sehr gering. Bei den Stammzellen V1 und V2 zeigt sich eine starke Expressierung des Antigens unter Interferon zum Beginn der Wachstumszeit. C7II drückt ZK 18 unter Interferoneinfluß etwas stärker zwischen dem 5. und 8. Tag aus ( Tabelle 5 ).

**ZK 19 nach Zugabe von 100ng /ml IFN $\alpha$  ( Tabelle 6 )**

IRS:	V 1		V 2		E 6		C7 II	
Tag:	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K	IFN $\alpha$	K
1	0	0	20	40	0	0	0	0
2	140	60	90	240	60	40	0	0
3	200	100	220	240	300	280	50	20
5	200	90	120	160	240	320	200	80
6	0	30	100	0	240	0	200	180
7	140	30	20	0	400	360	300	80
8	260	190	5	40	80	0	Test beendet	
9	220	175	60	40	120	190		
10	130	240	80	10	30	30		
<b>ges.</b>	<b>1290</b>	<b>915</b>	<b>715</b>	<b>770</b>	<b>1230</b>	<b>1220</b>	<b>750</b>	<b>360</b>

ZK19 scheint zu Beginn des Beobachtungszeitraums bei den V1 Zellen durch Interferon aktiviert zu werden, um später etwas gleichmäßiger dargestellt zu sein. Bei C7II ist eine Aktivierung durch Interferon während der mittleren Wachstumsphase vorhanden ( Tabelle 6 ).

Sämtliche Negativkontrollen mit Mausserum oder Hanks-Puffer zeigten keine Anfärbung. Allgemein kam es bei keiner Zelllinie zu einer Änderung der Differenzierungsmarker innerhalb der ersten 24 Stunden.

## Beurteilung der Gesamtaktivität

Ein übliches Verfahren bei der Bewertung von Daten, die man aus Zellkulturen erhält, ist nicht nur die Feinbeurteilung sondern auch eine allgemeinere Betrachtung der Gesamtaktivität.

Schaut man sich die vorliegenden Scores stark vereinfacht nach dem Kriterium einer Änderung bzw. Beibehaltung des Expressionsmusters der Differenzierungsmarker unter IFN  $\infty$  Behandlung an, so ergibt sich ein Gesamtbild welches die Tabelle 7 ausdrückt.

### Gesamtaktivität (Tabelle 7)

	EGFR	P 53	ZK 1	ZK 7	ZK 18	ZK 19
V1	↑	—	↓	—	↑	↑
V2	↑	↑	—	↓	↑	—
E6	↑	↑	↑	↑	↑	—
C7II	—	↑	—	↑	↑	—

Erhöhte Expression : ↑, Verminderte Expression : ↓, Keine Änderung : —

Es fällt auf, dass der Klon E6 unter einer Behandlung mit IFN  $\infty$  mit einer erhöhten Expression nahezu aller Differenzierungsmarker reagiert. Bezieht man die Wachstumskurve von E6 in diese Betrachtung ein wird auch deutlich, dass E6 von allen untersuchten Zellen die niedrigste Wachstumsrate aufweist. Dennoch ist der Klon E6, obwohl er nur niedrige Zellzahlen erkennen lässt, die aktivste Zelle im Ausdruck der Differenzierungsmarker unter IFN  $\infty$  Inkubation.

#### **4. Diskussion**

Seit Beginn der Verwendung von in vitro Zellkulturen ist bekannt, dass diese im Labor ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen und dass der Zellzyklus über Zeiten von 8-24 Stunden verlaufen kann. Dementsprechend zeigen auch unsere Zellen und ihre Klone ein sich nicht entsprechendes Verhalten, wenn sie über 8 Tage beobachtet werden.

Pauker u. Mitarb. beobachteten 1962, dass das Interferon einen wachstumshemmenden Effekt auf virusinfizierte Zellen ausübt. Ihre Beobachtungen waren einer der Gründe dafür, dass die antitumorale Aktivität des Interferons intensiv erforscht wurde.

In unserer experimentellen Studie untersuchten wir bei den Vulvakarzinomzellen vor, während und nach der Behandlung mit IFN die Regulation des Zellwachstums, immunhistochemische Veränderungen und die möglicherweise Interferon – induzierte Expression des Major Histocompatibilitätskomplex Klasse I und II.

#### **Wachstumsverhalten**

Das Wachstumsverhalten der unbehandelten Stammzelle V1 sowie der beiden Klone C7II und E6 zeigt nach einem kurzfristigen Einbruch des Zellwachstums ab dem zweiten Tag einen stetigen Anstieg. Lediglich in V1 ist am achten und somit letzten Testtag ein nochmaliger Abfall der Zellzahl in der unbehandelten Gruppe zu beobachten ( in Abb. 4 ). Ob es nach Tag acht noch zu einem Wiederanstieg der Wachstumskurve kommen würde kann nicht belegt werden. Als Ursache für diesen Wachstumseinbruch ist eine Änderung der Kulturbedingungen innerhalb der unbehandelten Gruppe in V1 anzunehmen, wenn mit allen restlichen Zellkulturen verglichen wird.

Eine konstante Zunahme der Zellzahl, ohne dass ein Plateau erreicht

wird, spiegelt die kontinuierliche Teilungsaktivität unserer Zelllinie wieder. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Untersuchungen die Carpenter an der Vulvazelllinie UCI -VULV-1 durchführte ( 14 ). Zu beachten ist auch die höhere Wachstumsrate der Klone C7II und E6, die aus den Kulturüberständen gewonnen wurden. Sie weist auf eine höhere proliferative Aktivität der nicht sessilen Zelllinien hin.

Ähnlich wie es Rubin und Chany von anderen Zelllinien berichteten ( 45, 12 ), zeigte sich als ein Ergebnis der Behandlung mit Interferon alpha eine Wachstumshemmung sowie eine Veränderung der Zellmorphologie. Die von Pauker zuerst beobachtete antiproliferative Wirkung der IFN ist inzwischen aus der Literatur bestens bekannt und wird auch in unserer Vulvakarzinomzelllinie nachgewiesen. Die Wachstumshemmung durch IFN fällt dennoch in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich deutlich aus. Sie wird am anschaulichsten durch das Wachstumsverhalten von E6 belegt ( in Abb.2 ).

Auffällig ist das Wachstumsverhalten von C7II ( in Abb. 3 ). Die mit IFN behandelten Zellen dieses Klones zeigen zwar eine Wachstumshemmung im Vergleich zu ihrer unbehandelten Kontrollgruppe, besonders am Ende der Beobachtungszeit ist die Anzahl der Zellen dabei jedoch so hoch wie bei den unbehandelten Zelllinien.

Der unterschiedliche Grad der Wachstumshemmung in den verschiedenen Zelllinien nach IFN Behandlung zeigt die heterogene Zusammensetzung des Tumormaterials.

Da eine antiproliferative Wirkung bei unserer Vulvakarzinomzelllinie bereits durch die alleinige Interferontherapie verursacht wird, sind auch Kombinationstherapien denkbar. Die Behandlung in Kombination mit Retinoiden wäre eine solche zusätzliche therapeutische Option. Einen

antiproliferativen Effekt zeigt eine Interferonbehandlung bei in vitro Kulturen von Zervixkarzinomzellen, der sich in der Kombination mit Retinoiden nochmals verstärkt ( 52 ). Die Kombination von Interferonen mit weiteren Zytokinen ergibt ähnliche Ergebnisse.

Plattenepithelkarzinome bei Kopf – Halstumoren zeigen im Tierversuch ein besseres Ansprechen nach kombinierter Behandlung mit IFN  $\alpha$  und IL2 als nach Gabe der Einzelsubstanzen ( 37 ). Weitere synergistische antitumorale Effekte werden an Mammakarzinomzelllinien nach einer Kombinationsbehandlung mit IFN  $\alpha$  oder  $\beta$  und mit Tamoxifen unabhängig vom Rezeptorstatus gezeigt ( 39 ). Neben der direkten antiproliferativen Wirkung demonstrieren Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen auch ein besseres Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen. Wiederum unter der Kombinationsbehandlung von Interferon mit Retinoiden kann eine erhöhte Sensitivität auf eine nachfolgende Strahlentherapie bei Kopf – Hals Tumoren beobachtet werden ( 8 ). Erneut zeigt sich dabei die Überlegenheit der Kombinationstherapie in Vergleich zur alleinigen Therapie mit Interferon.

Bei der Patientin, von der unsere Vulvakarzinomzelllinie stammt, würde vielleicht, sollte eine definitive Radiatio indiziert sein, der Einsatz einer Kombinationstherapie mit Interferonen und Retinoiden eine erhöhte Radiosensitivität und somit letztlich ein besseres Therapieergebnis bringen.

### **HLA Expression**

Für die immunologische Erkennung von Änderungen auf Zellen durch CD4+ T-Zellen ist es notwendig, dass die entsprechenden Peptide ( in unserem Fall Tumorantigene ) durch MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden. Bisher wurde allgemein größeres Interesse für MHC Klasse I präsentierte Tumorantigene gezeigt, da zytotoxische T-Zellen ( CD8+ )

direkt über MHC Klasse I die Tumorzellen lysieren können( 9, 50 ). Neuere Befunde aus Tierexperimenten und einigen klinischen Studien zeigen jedoch, daß auch CD4+ Zellen eine bedeutende Rolle in der Wechselbeziehung Tumorzelle und Wirt spielen (42, 30 ).

Allerdings sind MHC Klasse II restringierte Tumorzellantigene nicht sehr bekannt, obwohl ihre Bedeutung für die Aktivierung von CD4+ Zellen unbedingt anerkannt ist. Das liegt hauptsächlich an technischen Schwierigkeiten ( 23, 18 ).

Außerdem exprimieren die meisten Tumorzellen MHC Klasse I - Moleküle und nur wenige MHC Klasse II. An Zervixkarzinompräparaten machten Küppers et al ( 33 ) gegensätzliche Beobachtungen. Am Gefrierschnitt konnte immunhistochemisch eine Exprimierung von MHC – Klasse II Molekülen in heterogener Verteilung belegt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Studien über das Zervixkarzinom, die in der Mehrzahl der Patientinnen MHC Klasse II Antigene nachwiesen ( 24, 19 ).

Zu untersuchen ob MHC Klasse II auch in unserer Vulvakarzinomzelllinie isoliert werden kann, ist aus diesen Gründen besonders interessant.

Alle von uns untersuchten Zelllinien zeigten vor Interferongabe Produkte der MCH Klasse I. Die MHC Klasse II Produkte waren vor der Behandlung nicht nachweisbar, was im Widerspruch zu den o.g. Untersuchungen Küppers über das Zervixkarzinom steht, aber vom unterschiedlichen Aufbau der beiden Organe ( Vulva = Haut) zu verstehen ist.

Nach der Behandlung war weder unter IFN  $\alpha$  noch unter IFN  $\gamma$  ein signifikanter Anstieg der MHC Klasse I Produkte in der Vulvakarzinomzelllinie zu beobachten. Ähnliche Beobachtungen wurden von Abril und Mitarb. an einer Magenkarzinomzelllinie gemacht ( 1 ). Die Autoren nahmen als Ursache für die fehlende Reaktion auf die

Stimulation durch IFN einen Defekt auf der Ebene der spezifischen HLA I – m RNA an.

Wir konnten jedoch in unsere Zelllinie eine Erhöhung der MHC Klasse II Exprimierung nach Behandlung mit IFN  $\gamma$  sehen. Diese war im Klon E6 nach Zugabe von 100 ng/ ml signifikant und ließ nach Zusatz von 50 ng/ ml noch einen Trend erkennen.

Die zunächst fehlende Exprimierung von MHC Klasse II Molekülen der unbehandelten Zellen, die dann durch die Zugabe von IFN  $\gamma$  stimuliert werden kann, wurde auch bei Untersuchungen an HPV 16 positiven Zervixkarzinomzellen beobachtet. Bei den in vitro durchgeführten Untersuchungen konnte ebenfalls durch die Behandlung mit IFN  $\gamma$  eine Exprimierung der MHC Klasse II Genprodukte aktiviert werden ( 17 ).

In verschiedenen Zellkulturen von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) wurde ebenfalls ein Anstieg der MHC II Exprimierung durch IFN  $\gamma$  belegt. Wie auch in unserer Vulvakarzinomzelllinie wurden in allen 31 untersuchten NSCLC Zelllinien MHC Klasse I Produkte exprimiert. MHC Klasse II Moleküle wurden lediglich in 7 NSCLC Zelllinien nachgewiesen. Die Stimulation mit IFN  $\gamma$  führte zu einer vermehrten MHC Klasse I und Klasse II Exprimierung. Eindeutig fiel jedoch die Induktion der MHC Klasse II Produkte durch IFN  $\gamma$  deutlicher aus ( 51 ).

Unsere Vulvakarzinomzelllinie reagiert auf eine IFN  $\gamma$  Behandlung mit der Expression von anfangs nicht nachweisbaren MHC Klasse II Molekülen. Sie verhält sich somit wie verschiedene in der Literatur beschriebene Zelllinien anderer Tumorentitäten. Über ähnliche Untersuchungen an anderen Vulvakarzinomzelllinien kann zum Zeitpunkt dieser Erörterung keine Literatur gefunden werden.

Tumorzellen, die MHC Klasse II Moleküle exprimieren können von CD4+ Zellen erkannt werden und somit Ziele einer Immunantwort

werden. An Zervixkarzinomen konnte diese MHC Klasse II restringierte T-Zellpräsenz auch in vivo nachgewiesen werden ( 27 ). Mit der Anwesenheit von immunologisch erkennbaren Antigenen auf der Tumorzelloberfläche wäre als therapeutische Konsequenz nun z.B. eine Autovaccinierung im Sinne einer aktiv spezifischen Immuntherapie denkbar.

### **Differenzierungsmarker**

Die Zugabe von Interferon verändert das Wachstumsverhalten und die HLA Expression unserer Zelllinie. Es soll im Folgenden bewertet werden, ob Interferon auch die Differenzierungsmarker der Vulvakarzinomzelllinie verändert.

### **EGFR**

Es ist bekannt, dass die Bindung des Epidermal Growth Faktors an den EGF Rezeptor verschiedene Zellveränderungen auslösen kann, etwa eine Beeinflussung der Mitoseraten und der Zellmorphologie ( 13 ). Eine Überexpression des EGFR wird in zahlreichen soliden Tumoren beobachtet und korreliert häufig mit einer schlechten Prognose ( 36 ) oder mit einem schlechteren Ansprechen auf eine nachfolgende Therapie ( 4 ). Als Überexpression ist hier allerdings nicht das mit einem Score von 1 bewertete einfach positive Anfärberesultat der Immunhistochemie zu sehen. Am Beispiel des Her-2-neu, einem Oncogen, das ebenfalls der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren zugeordnet wird, kann dieses demonstriert werden. Definitionsgemäß ist der Nachweis der Überexpression des Her 2 neu an einen Score von 3 + im kommerziell erhältlichen „DAKO Hercep Test“ gebunden.

In beiden Stammzellen V1 und V2 konnte nach Zugabe von IFN  $\alpha$  eine Zunahme der EGFR Expression beobachtet werden. Wiederum zeigten

die beiden Überstandsklone ein abweichendes Verhalten. Hier ergab sich nach IFN Zugabe keine Änderung der EGFR Expression, wenngleich der EGFR in den beiden Klonen insgesamt stärker exprimiert wurde. Dieses Ergebnis hebt erneut die Verschiedenheit der Stammzellen im Vergleich zu den Klonen hervor.

Eine Modulation des EGFR durch Zytokine könnte ein sinnvoller Therapieansatz sein. IFN kann die Expression des EGFR reduzieren, wie in vitro an einigen Zelllinien des Nierenkarzinoms ( 26 ) und des Harnblasenkarzinoms ( 3 ) gezeigt werden konnte. Es kann vermutet werden, dass der Rückgang der EGFR Expression mit einer Redifferenzierung der Tumorzelle einher geht.

In unseren Stammzelllinien wurde dagegen an den späteren Testtagen ein gegensätzlicher Effekt beobachtet. Es war gleichermaßen ein Anstieg der prozentuellen Anzahl angefärbter Zellen und der Anfärbeintensität zu sehen.

Eine Erklärung hierfür könnte in der Anregung des Zellmetabolismus durch Interferone liegen. Ähnliche in vitro Beobachtungen machten auch Bernstein und Mitarb. ( 7 ). Dieses würde auch die vermehrte Expressierung des EGFR erst an den späteren Testtagen erklären.

Bezieht man die Wachstumskurven dieser Zelllinien auf die vermehrte EGFR Expressierung, fällt auf, dass es trotzdem zu keinem Anstieg der Zellzahlen kommt. Das Wachstum steht also nicht in einer Korrelation zur EGFR Expressierung.

### p53

Verlust oder Mutationen des p53 werden bei verschiedenen menschlichen Tumoren gefunden. Die Mehrzahl dieser Mutationen bewirken eine veränderte Halbwertszeit dieses Proteins, was zu einer immunhistochemisch nachweisbaren Akkumulation führt.

In sämtlichen getesteten Zelllinien waren die Anfärbungen für p53 nur schwach. Zahlreiche Arbeiten werten Tumoren dann als p53 -positiv,

wenn mehr als 10% der immunhistochemisch bearbeiteten Tumorzellen eine Anfärbung zeigt ( 6 ). Die Zugabe von Interferon  $\alpha$  bewirkt in der Stammzelle V2 sowie im Klon E6 eine Erhöhung des Scores. Diese ist wiederum darauf zurückzuführen, dass eine größere Anzahl von Zellen eine intensivere Anfärbung anzeigt. Somit erhöht sich durch die Interferonbehandlung nicht nur die Anzahl der p53-positiven Zellen sondern auch die p53 Expression der einzelnen Zelle.

Die Bedeutsamkeit einer p53 Überexpression als negativer Prognosefaktor ist für die verschiedenen Tumorentitäten ungeklärt und bedarf weiterer, prospektiver Untersuchungen. Für an einem invasiven Vulvakarzinom erkrankte Patientinnen konnte eine Beziehung zwischen einer p 53 Überexpression und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit belegt werden ( 32, 46 ). Die Metaanalyse von Thames ( 48 ) vergleicht 301 Studien, in denen die Expression des p53 bei verschiedenen Tumorentitäten untersucht worden war. Es wurde das Ansprechen auf Chemotherapien und / oder Strahlentherapie bewertet. Ungeachtet der geringeren Sicherheit, die eine Analyse von retrospektiv erhobenen Daten in sich birgt, konnte ein nahezu signifikanter negativer Effekt auf die Behandlungsergebnisse bei Tumoren mit einer p53 Überexpression gesehen werden. Die nachgewiesene Überexpression von p53 in V2 und E6 nach einer IFN Behandlung würde auf eine schlechtere Prognose dieser Patientin deuten.

### Zytokeratine

Das Zytokeratinmuster liefert nicht nur Hinweise auf die Histogenese von Karzinomen, sondern lässt auch Rückschlüsse auf die Tumordifferenzierung zu.

Üblicherweise exprimiert normales Vulvagewebe die Zytokeratine 1, 5, 10, 11 und 14 ( 21, 34 ). Untersucht wurde in dieser Arbeit die Exprimierung des Panzytokeratins sowie der Zytokeratine 7, 18 und 19.

Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen standen für die Zytokeratine 1

und 10 keine käuflichen monoklonalen Antikörper zur Verfügung. Statt dessen verwendeten wir in dieser Arbeit eine Panzytokeratin Antikörpermischung (DAKO), die neben anderen Zytokeratinstrukturen auch das Zytokeratin 1 nachweist. Die Zytokeratine 7 und 18 charakterisieren das einfache Epithel. Der anti-Zytokeratin 18- Antikörper (Sigma ) reagiert nicht mit verhornenden Zellen. Reaktionen mit z.B. Epidermis- oder Vaginalschleimhautzellen fallen daher negativ aus.

Normales Vulvagewebe exprimiert kein ZK 18. In unseren Zelllinien, und besonders deutlich im Klon E6, konnte das Zytokeratin 18 dennoch dargestellt werden. Diese Zytokeratinexpression könnte durch eine Neuinduktion der Expression des ZK 18 oder auch durch die Selektion eines Zelltypes während der Karzinogenese oder der Zellkultur erklärt werden.

Das Panzytokeratin wird erwartungsgemäß in allen Zelllinien nachgewiesen. Bei E6 kann eine Zunahme des Expressionsgrades unter Interferongabe beobachtet werden, die allerdings nicht signifikant ist.

Die übrigen Zelllinien zeigen nach einer Interferonbehandlung keine eindeutige Veränderung in der Zytokeratinexpression.

Zusammenfassend kann die Expression der Zytokeratinmuster in den verschiedenen Zelllinien als sehr inhomogen bezeichnet werden. Das Ausmaß, in dem die einzelnen Zytokeratine im Zeitverlauf exprimiert werden, ist ebenfalls uneinheitlich. Sämtliche Veränderungen der Expressionsintensität sind lediglich passager. Das gilt sowohl für die unbehandelte Kontrollgruppe als auch die mit Interferon inkubierten Zellen. Diese vorübergehenden Änderungen der Zytokeratin-exprimierung könnten eventuell im Zusammenhang mit den Veränderungen im Zellzyklus stehen. Das typische Expressionsprofil, das normale Vulvazellen kennzeichnet, wird nicht beibehalten. Dieses läßt auf ein heterogenes Tumorzellmaterial mit dedifferenzierten Minorzelltypen schließen.

## 5. Zusammenfassung

### **Der Einfluß von Interferonen auf das Wachstum, die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplexes und ausgewählte Differenzierungsmarker einer neu etablierten Vulvakarzinomzelllinie in vitro**

Christiane Seißer

Die Fragestellung dieser Arbeit war, zu untersuchen inwiefern sich mit Interferon behandelte Tumorzellen verändern. Insbesondere interessierte die Frage, ob diese Zellen einer Modifikation im Sinne einer Redifferenzierung zugeführt werden können. Hierzu wurden am Beispiel einer neu etablierten Vulvakarzinomzelllinie verschiedene Interferoneffekte untersucht. Getestet wurden zwei Vulvakarzinomstammzelllinien und zwei ihrer Klone, die mit Interferon  $\alpha$  und / oder Interferon  $\gamma$  behandelt wurden. Die Zelllinien zeigten ein häufig voneinander abweichendes Verhalten, was die Heterogenität des Tumorzellmaterials ausdrückt.

Ein proliferationshemmender Einfluß von Interferon  $\alpha$  wurde in allen Zelllinien demonstriert. In der Kombination mit Retinoiden konnten mehrere Arbeiten anhand anderer Tumorzelllinien eine Überlegenheit gegenüber der Monotherapie mit Interferonen belegen. Dieses sollte ein Anlaß zu weiteren Untersuchungen an der Vulvakarzinomzelllinie sein.

Die Stimulierbarkeit von MHC Klasse II Genprodukten ( Main Histocompatibility Complex ) durch Interferon  $\gamma$  zeigte sich an einem Klon der Überstandszelllinien.

Die Expression verschiedener Differenzierungsmarker, wie der EGF-R (Epidermal – Growth - Faktor-Rezeptor ) , das p53 (Protein 53), das Panzytokeratin und die Zytokeratine 7, 18 und 19 wurden nach Zugabe von Interferon  $\alpha$  im Zeitverlauf von 1 bis 8, respektive 10 Tagen beobachtet. Die immunhistochemische Auswertung zeigte passagere Bewegungen insbesondere im Expressionmuster der Zytokeratine. Ein statistisch signifikanter Einfluß durch eine Behandlung mit Interferon  $\alpha$  ließ sich nicht nachweisen.

Die Zellen unserer neu etablierten Vulvakarzinomzelllinie veränderten sich unter einer Interferonbehandlung. Diese modifizierten Tumorzellen haben somit im Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten und ihre MHC-Expressionsmuster eine zumindest partielle Redifferenzierung erfahren.

## Literaturverzeichnis

- 1 Abril E, Mendez-RE, Garcia A, Serrano A, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F: Characterization of a gastric tumor cell line defective in inducibility by both alpha and gamma- interferon. Tissue Antigens. 1996 May;47(5):391-8
- 2 Abul, K, Abbas ( 1996 ): Immunologie Verlag. H. Huber / Bern
- 3 Alexandroff AB, Jackson AM, Christolm GD, James K: Cytokine modulation of epidermal growth receptor expression in bladder cancer cells is not a major contributor to the antitumor activity of cytokines. Eur J Cancer 1995 Nov;31A (12):2059-66
- 4 Barker FG 2<sup>nd</sup>, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK, Wara WM, Berger MS, Chen P, Israel MA, Aldape KD: EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001 Oct 1;51(2):410-8
- 5 Beck T ( 1995 ): Klinischer Stellenwert immunhistochemischer Prognosefaktoren: Problematik der Methodik, aus: Aktuelle Aspekte der Tumor immunologie 86 , Koldovsky U ( Hsg.) Zuckerschwerdt Verlag
- 6 Becker A, Stadler P, Krause U, Kuhnt T, Hansgen G, Dettmer P, Feldmann HJ, Rath FW, Molls M, Dunst J: No association between p53 overexpression and polarographically measured tumor oxygenation in patient with head and neck cancer. Strahlenther Onkol 2000 Oct;176(10): 475-80
- 7 Bernstein W, Zou ZQ, Black RJ, Pirollo KF, Chang EH: Association of interferon-gamma induced growth inhibition and modulation of epidermal growth factor receptor gene expression in squamous cell carcinoma cell lines. J Biol Regul Homeost Agents 1988 Oct-Dec;2(4): 186-92
- 8 Bläse M, Zaruba MM, Santo-Hoeltje L, Bamberg M, Hoffmann W, Rodemann HP: 13-cis retinoid acid in combination with interferon- alpha enhances radiation sensitivity of human squamous cells of the oral cavity. Strahlenther. Onkol. 1999 Nov;175(11):563-8

- 9 Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A: Tumor antigens recognized by T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12::337-65
  
- 10 Burnet FM: The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research* 1970 13 : 1 - 27
  
- 11 Burrows, MT: The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body. *J. Amer. med. Ass.* 191055, 2057
  
- 12 Cany C, Cerutti I: Antitumor Therapy based on the use of an immune modulator, arginine butyrate and interferon. *Med Oncol Tumor Parmacother* 1984;1(2)101-7
  
- 13 Carpenter G: The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor. *Mol Cell Endocrinol* 1983 Jul;31(19): 1-19
  
- 14 Carpenter PM, Gamboa-Vujicic G, Mascarello JT, Wilczynski SP, Bhaumik M, Doroin G, Manetta A: UCI-VULV-1, a vulvar squamous carcinoma cell line. *Gynecol. Oncol.* 1995; 57:191
  
- 15 Carrel A: The permanent life of tissue outside the organism. *J. exp. Med.* 1912 15,516
  
- 16 Clemens M J Tilleray VJ, JamesR, Gewert DR: Relationship of cellular oncogene expression inhibition of groth and induction of differentiation of Daudi cells by interferons or TPA. *J. Cell. Biochem* 1988Dec;38(4)251-9
  
- 17 Coleman N, Stanley MA: Analysis of HLA- DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. *Int J Cancer* 1994 Feb1;56(3): 314-9
  
- 18 Cresswell P: Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 1996 Feb 23; 84(4):505-7 Review

- 19 Cromme FV, Meijers CJ, Snijders PJ, Uyterlinde A, Kenemans P, Helmerhorst T, Stern PL, van der Brule AJ, Walboomers JM: Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant cervical lesions. *Br J Cancer* 1993 Jun; 67(6): 1372-80
  
- 20 Dubelcco R, Vogt M: (1954) *J.Exp Med* 99 17-82
  
- 21 Franke WW, Schiller DL, Moll R, Winter S, Schmid E, Engelbrecht I, Denk H, Krepler R, Platzer B: Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Mol. Biol.* 1981 Dec25;153(4):9333
  
- 22 Gastl G, Ebert T, Finstad CL, Sheinfeld J, Gomahr A, Autlitzky W, Bander NH: Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J. Urol.*1996 Jan;155(1)361-7
  
- 23 Germain RN: MHC – dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T Lymphocyt activation. *Cell* 1994 Jan28;76(2): 287-99
  
- 24 Glew SS, Duggan - Keen M, CabreraT, Stern PL: HLA classII antigen expression in human papilloma virus – associated cervical cancer. *Cancer Res.* 1992 Jul15; 52(14):4009-16
  
- 25 HarrisonR G: Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. exp. Biol.(N.Y.)* 1912, 4,140
  
- 26 Heise H, Depenbrock H, Rastetter JW, Hanauske AR: Characterisation and mutual ligand – induced modulation of epidermal growth factor and interferon – alpha receptors on renal carcinoma cells in vitro. *Anticancer Drugs* 1995 Oct;6 (5): 686-92
  
- 27 Höhn H, Pilch H, Günzel S, Neukirch C, Hilmes C, Kaufmann A, Seliger B, Maeurer MJ : CD4+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cervical Cancer Recognize HLA-DR- Restricted Peptides Provided by Human Papillomavirus-E7. *The Journal of Immunology*, 1999,163(10):5715-22

- 28 Imai K A, NG k, Glassy M C, Ferrone S ( 1981 ): Differential effect of interferon on the expression of tumorassociated antigens and histocompatibility antigens on human melanoma cells: relationship to susceptibility to immune lysis mediated by monoclonal antibodies J. Immunol. 127: 505-508
- 29 Jolly J: Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. C. R. Soc. Biol. (paris) 190355, 1266
- 30 Kalams SA, Walker BD: The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. J. Exp. Med. 1998 Dec 21;188(29):2199-204
- 31 Ki Hong W, Lotan R : Retinoids in Oncology. Marcel Decker Inc. 1993
- 32 Kohlberger P, Breitenacker G, Gitsch G, Sliutz G, Kolbl H, Tschachler E, Reinthaller A, Kainz C: Overexpression of p53 as prognostic factor in vulvar carcinoma. Gynak Geburtshilfliche Rundsch 1996;36(1): 40-41
- 33 Küppers V MD, Koldovsky U PhD, Somville Th MD, Bender HG: Products of the Major Histocompatibility Complex and CD4/CD8 Cell Infiltration in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma. Journal of lower genital tract disease Vol II Numb. 1 1998 1-6
- 34 Küppers V, Koldovsky U, Somville T, Bender HG: Muster verschiedener Zytokeratine der normalen Vulva, der vulvären intraepithelialen Neoplasia (VIN) und des Vulvakarzinoms. Pathologie ,4 1998. 19:279-285
- 35 Lane D ( 1992 ) : P 53, guardian of the genome. Nature 358 : 15 - 16
- 36 Leng J, Lang J, Shen K, Guo L: Overexpression of p53, EGFR, c-erb B2 and c-erb-B3 in endometrioid carcinoma of the ovary. Chin Med Sci J 1997 Jun;12(2): 67-70
- 37 Li D, Zeiders JW, Liu s, Guo M, Bishop JS, O'Malley BW,Jr: Combination nonviral cytokine gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope 2001May;111(5):815-20

- 38 Lindl T, Bauer J: Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akad. Vlg. Hdg. 4.Aufl. 2000
- 39 Lindner DJ, Borden EC: Synergistic antitumor effects of a combination of interferon and tamoxifen on estrogen receptor-positive and receptor-negative human tumor cell lines in vivo and in vitro. *J.-Interferon-Cytokine-Res.*1997 Nov;17(11):681-93
- 40 Lopez - Nevot MA, Esteban F, Ferron A, Gutierrez j, Oliva MR, Romero C, Huelin C, Ruiz - Cabello F, Garrido F, ( 1989 ) HLA class I gene expression on human primary tumors and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas *Brit. J Cancer* 1989 59 : 221
- 41 Moll R: Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem* 1998, 31; 205-62
- 42 Pardoll DM, Topalian SL: The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998Oct; 10(5):588-94
- 43 Roitt I: *Essential Immunology.* Blachwell Science 10<sup>th</sup> Ed. 6/2001
- 44 Roux, W: Beiträge zur Entwicklung des Embryo. *Z. Biol.* 1885, 21, 411
- 45 Rubin BY, Gupta SL: Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 Oct;77 (10):5928-32
- 46 Salmaso R, Zen T, Zanol M Perin D, Marchiori S, Marchetti M: Prognosis value of protein p53 and ki-67 in vulvar cell carcinoma. *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 2000;(5):479-83

- 47 Scheuring S: Gewinnung, Subkultivierung und Charakterisierung einer Vulvakarzinomzelllinie – Träger eines bisher seltenen humanen Papillomavirus, 1996 Dissertation Dipl.-Biol. Scheuring Sybille
- 48 Thames HD, Petersen C, Petersen S, Nieder C, Baumann M: Immunohistochemically detected p53 mutations in epithelial tumors and results of treatment with chemotherapy and radiotherapy. A treatment-specific overview of clinical data. *Strahlenther Onkol* 2002 Aug;178(8): 411-21
- 49 Thomas A: *The Cytokine Handbook*. Academic Press, San Diego; 3<sup>rd</sup> Ed. 4/1998
- 50 Wang RF: Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development. *J. Mol. Med.* 1999 Sep; 77(9):640-55
- 51 Wroblewski JM, Bixby DL, Borowski C, Yannelli JR: Characterisation of human non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell lines for expression of MHC, costimulatory molecules and tumor-associated antigens. *Lung Cancer* 2001 Aug-Sep;33(2-3):181-94
- 52 Yokahama M, Nakao Y, Iwasaka T, Sugimori H: Retinoid acid and interferon-alpha effects on cell growth and differentiation in cervical carcinoma cell lines. *Obstet Gynecol.* 2001 Aug;98(2)332-40

## Lebenslauf

Christiane Seißer  
**Haus Düssel 8**  
42489 Wülfrath- Düssel

### **Persönliche Daten**

geboren 05.05.1962  
in Brilon

### **Ausbildungsdaten**

Schulbildung	1968 – 1979	Grund- und Realschule in Ennepetal
Berufsausbildung	1980 – 1983	Ausbildung zur Kinderkrankenschwester
Berufstätigkeit	1983 – 1987	als Kinderkrankenschwester
Erneute Schulbildung	1987 – 1989	Bergisches Kolleg, Wuppertal Nachträglicher Erwerb des Abiturs
Studium	1990 – 1995	Medizinstudium an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
	1995 – 1996	Praktisches Jahr (PJ): Bethesda Krankenhaus, Wuppertal Lehrkrankenhaus der Ruhr – Universität, Bochum

### **Ärztliche Tätigkeit**

Ärztin im Praktikum	01.02.1997- 31.07.1999	Herzzentrum Kaiser Wilhelm Krankenhaus, Duisburg, Kardiovaskularchirurgie Chefarzt Prof. Dr. A. Krian
		Medizinische Einrichtungen der HHU Düsseldorf , Klinik für Endokrinologie / Diabetologie, Chefarzt Prof. Dr. W.Scherbaum
Ärztin in der Weiterbildung zur Fachärztin für Strahlentherapie	03.01.1999 31.10.2002	Klinik für Strahlentherapie/Onkologie Pius Hospital, Oldenburg Leitender Arzt Dr. med. A. Temmesfeld
	01.11.2002- 06.12.2002	Klinik für Strahlentherapie/Onkologie Klinikum Barmen, Wuppertal Leitender Arzt Prof.Dr.med.B.Schilcher
	seit 01.01.2003	Bethesda Krankenhaus Wuppertal Diagnostische Radiologie Chefarzt Dr. R. von Wickede

## **Danksagung**

Dem Team des onkologisch / immunologischen Labors der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf danke ich für die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung des Experimentellen Teils der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Koldovsky, die mich mit ihrem unermüdlichen Einsatz während der Erstellung dieser Dissertation begleitet hat. Wissenschaftlich und insbesondere menschlich hätte ich mir keine bessere Betreuung wünschen können.