
**Charakterisierung von GDF-15
als
Immunmodulator im Ovarialkarzinom**



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Yvonne Dombrowski

aus

Hamburg

Würzburg 2010

Eingereicht am _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dandekar

1. Gutachter: PD Dr. Wischhusen

2. Gutachter: Prof. Dr. Benz

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung gemäß § 4, Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999:

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat, und ich bisher keine akademischen Grade, außer dem Titel Diplom-Biologin, erworben oder zu erwerben versucht habe.

München, April 2010

Yvonne Dombrowski

Für Romy D.

INHALTSVERZEICHNIS

0	ZUSAMMENFASSUNG	11
0.1	Zusammenfassung.....	11
0.2	Summary.....	14
1	EINLEITUNG	16
1.1	Das Ovarialkarzinom.....	16
1.1.1	Hintergrund und Diagnose.....	16
1.1.2	Histologie und klinisches Erscheinungsbild.....	18
1.1.3	Genexpression und molekulare Ursachen.....	19
1.1.4	Tumormarker im Ovarialkarzinom.....	20
1.1.5	Therapie von Ovarialkarzinomen.....	21
1.1.6	Experimentelle Therapiekonzepte für das Ovarialkarzinom.....	22
1.1.7	Die zelluläre Zusammensetzung des Ovarialkarzinoms.....	25
1.2	Die Wechselseitige Beziehung von Tumor und Immunsystem.....	27
1.2.1	Das Immunsystem als Tumorinitiator.....	27
1.2.2	Die Selektion von „ <i>tumor escape</i> “-Varianten durch das Immunsystem.....	27
1.2.3	„ <i>Tumor immune escape</i> “-Mechanismen und Tumortoleranz.....	28
1.2.4	Die zytotoxischen Effektoren des Immunsystems.....	30
1.2.4.1	Zytotoxische T-Lymphozyten.....	30
1.2.4.2	Natürliche Killer-Zellen.....	31
1.3	GDF-15, ein atypisches Mitglied der TGF-β-Superfamilie.....	36
1.3.1	Die TGF- β -Superfamilie.....	36
1.3.2	TGF- β	37
1.3.3	Die Rolle von TGF- β -Familienmitgliedern im Ovarialkarzinom.....	40
1.3.3.1	TGF- β im Ovarialkarzinom.....	40
1.3.3.2	Weitere TGF- β -Familienmitglieder im Ovarialkarzinom.....	43
1.3.4	GDF-15, ein divergentes Mitglied der TGF- β -Superfamilie.....	44
1.3.4.1	Allgemeines.....	44
1.3.4.2	Expression von GDF-15.....	45
1.3.4.3	Funktionen von GDF-15.....	46
1.3.4.4	GDF-15 in Tumoren.....	47
1.4	Zielsetzung.....	49
2	MATERIAL UND METHODEN	51
2.1	Material.....	51
2.1.1	Antikörper.....	51
2.1.2	Bakterien.....	53
2.1.3	Chemikalien, Lösungen und Reagenzien.....	53
2.1.4	Enzyme.....	55

2.1.5	Geräte.....	55
2.1.6	Größenstandards.....	56
2.1.7	Kits.....	57
2.1.8	Medien und Medienzusätze.....	57
2.1.9	Puffer und Lösungen.....	58
2.1.10	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide, siRNA und Plasmide.....	59
2.1.11	Wachstumsfaktoren, Liganden und lösliche Faktoren.....	61
2.1.12	Verbrauchsmaterial.....	61
2.1.13	Zelllinien.....	62
2.2	Methoden.....	64
2.2.1	Methoden für das Arbeiten mit Tumor- und Immunzellen.....	64
2.2.1.1	Auftauen von Zellen.....	64
2.2.1.2	Kultivierung und Subkultivierung von Tumorzellen.....	64
2.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen.....	64
2.2.1.4	Isolierung von Tumorzellen aus frischem Aszites.....	65
2.2.1.5	Isolierung von peripheren humanen Lymphozyten aus Vollblut.....	65
2.2.1.6	Isolierung von NK- bzw. CD8 ⁺ -T-Zellen aus Vollblut mittels „ <i>magnetic activated cell sorting</i> “ (MACS)-Technologie.....	66
2.2.1.7	Herstellung von polyklonalen NK-Zell-Kulturen.....	66
2.2.1.8	Herstellung von Zellkulturüberständen.....	67
2.2.1.9	Transfektion von OvCA-Zelllinien mit Plasmiden.....	67
2.2.1.10	Transfektion von OvCA-Zelllinien mit siRNA.....	67
2.2.2	Durchflusszytometrische Analyse von Immunzellen.....	68
2.2.2.1	Oberflächenmarkeranalyse von Immunzellen.....	68
2.2.2.2	Nachweis intrazellulärer Antigene in Immunzellen.....	68
2.2.2.3	Nachweis von CD107a.....	69
2.2.3	Funktionale Bioassays.....	69
2.2.3.1	Behandlung von Immunzellen mit rekombinanten Zytokinen für funktionale Assays.....	69
2.2.3.2	CCL-64-Bioassay.....	70
2.2.3.3	Reportergen-Assay mit TGF- β -sensitiven Reporterplasmiden.....	70
2.2.3.4	Assays zur Bestimmung von zytotoxischen und proliferativen Eigenschaften von GDF-15.....	70
2.2.3.4.1	Bestimmung der Zytotoxizität mittels Kristallviolett-Assay.....	70
2.2.3.4.2	Bestimmung der Proliferation mittels BrdU-Assay.....	71
2.2.3.4.3	Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-Assay.....	71
2.2.3.4.4	Lyseassay mit SKOV-3-fluc OvCA-Targetzellen.....	71
2.2.3.4.5	Lyseassay mit CFSE-gefärbten OvCA-Zellen und PKH26-gefärbten Effektoren.....	72
2.2.3.4.6	Apoptoseinduktion in Immunzellen.....	72
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	73
2.2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Protein aus Zellkulturüberständen.....	73

2.2.4.2	Herstellung von Zelllysaten aus Tumorzellen und -gewebe.....	73
2.2.4.3	Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford.....	73
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	73
2.2.4.5	Western Blot.....	74
2.2.4.6	GDF-15-ELISA.....	75
2.2.4.7	„Human Phospho-Immuneceptor Array“.....	75
2.2.5	Methoden zur Analyse und Manipulation der Genexpression.....	77
2.2.5.1	Isolierung von RNA aus Tumor- und Immunzellen.....	77
2.2.5.2	DNA-Restriktion und RNA-Fällung.....	77
2.2.5.3	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	77
2.2.5.4	RNA-Gelelektrophorese.....	77
2.2.5.5	Synthese von cDNA aus RNA.....	78
2.2.5.6	„Polymerase Chain Reaction“ (PCR).....	78
2.2.5.7	DNA-Gelelektrophorese.....	79
2.2.5.8	Semi-quantitative Real Time PCR.....	79
2.2.5.9	Analyse der Genexpression von GDF-15 behandelten NK-Zellen.....	80
2.2.5.10	Analyse der Genexpression im „Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray“.....	80
2.2.6	Methoden für das Arbeiten mit Bakterien.....	81
2.2.6.1	Transformation von kompetenten Bakterien.....	81
2.2.6.2	Endotoxinfreie Plasmidpräparation.....	81
2.2.6.3	DNA-Restriktion.....	82
2.2.7	Statistische Auswertung.....	82
3	ERGEBNISSE	83
3.1	Expression von GDF-15 im Ovarialkarzinom.....	83
3.1.1	Genexpression von GDF-15 und TGF- β im Ovarialkarzinom.....	83
3.1.2	<i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Proteinexpression von GDF-15 im Ovarialkarzinom.....	87
3.1.3	Zusammenfassung: GDF-15-Expression im Ovarialkarzinom.....	93
3.2	Autokrine Funktion von GDF-15 im Ovarialkarzinom - Funktionalitätsstudien in OvCA-Zellen -.....	94
3.2.1	Herstellung von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA- Zelllinien.....	94
3.2.1.1	GDF-15-Überexpression in der OvCA-Zelllinie OVCAR-3.....	94
3.2.1.2	GDF-15-„knock-down“ in der OvCA-Zelllinie OaW-42.....	96
3.2.2	Untersuchung des Phänotyps von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15- defizienten OvCA-Zelllinien.....	97
3.2.2.1	Proliferation.....	97
3.2.2.2	Viabilität.....	99
3.2.2.3	Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit.....	100
3.2.2.4	Expression von Oberflächenmarkern.....	102

3.2.2.4.1	Expression von MHC-I-Molekülen.....	102
3.2.2.4.2	Expression von NKG2D-Liganden.....	105
3.2.2.4.3	Expression von DNAM-1-Liganden.....	108
3.2.3	Zusammenfassung: Autokrine Funktion von GDF-15 im Ovarialkarzinom.....	110
3.3	Parakrine Wirkung von GDF-15 im Ovarialkarzinom	
	- Funktionalitätsstudien in Immunzellen -	111
3.3.1	Immuneffektorzellen im Aszites.....	111
3.3.2	Modulation der NK-Zell-Lyseaktivität durch GDF-15.....	112
3.3.2.1	Lyseaktivität von NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss.....	113
3.3.2.2	Lyse von GDF-15-defizienten und GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen.....	115
3.3.2.3	Lyse unter NK-Zellrezeptorblockade.....	117
3.3.3	GDF-15-abhängige NK-Zellrezeptormodulation.....	118
3.3.3.1	Aktivierende Rezeptoren.....	118
3.3.3.1.1	NKG2D.....	119
3.3.3.1.2	„Natural cytotoxicity receptors“.....	121
3.3.3.1.3	DNAM-1.....	122
3.3.3.1.4	CD16.....	123
3.3.3.1.5	NKG2C	124
3.3.3.2	Inhibierende Rezeptoren.....	125
3.3.3.2.1	NKG2A.....	125
3.3.3.2.2	„Killer cell immunoglobulin-like receptors“.....	126
3.3.3.2.3	CD305.....	128
3.3.3.2.4	NKG2A- und NKG2C-assoziiierter Rezeptor CD94.....	129
3.3.4	Einfluss von GDF-15 auf die Lysefunktionalität von NK-Zellen.....	130
3.3.4.1	Aktivierungsstatus von NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss.....	130
3.3.4.2	Expression und Freisetzung lytischer Granula unter GDF-15-Einfluss.....	131
3.3.4.2.1	Expression des lytischen Granulainhalts.....	131
3.3.4.2.2	Expression von CD107a.....	133
3.3.5	Einfluss von GDF-15 auf die Apoptose in Immunzellen.....	135
3.3.5.1	GDF-15-vermittelte Apoptose.....	135
3.3.5.2	Einfluss von GDF-15 auf induzierte Apoptose.....	136
3.3.5.3	Einfluss von GDF-15 auf fratrizide Apoptose.....	138
3.3.5.4	Regulation von Apoptoserezeptoren durch GDF-15.....	139
3.3.6	Zusammenfassung: Parakrine Wirkung von GDF-15 im Ovarialkarzinom.....	141
3.4	GDF-15-abhängige Signaltransduktion und Genregulation.....	142
3.4.1	GDF-15-abhängige Signaltransduktionsmechanismen.....	142
3.4.1.1	Wirkung von GDF-15 auf TGF- β -sensitive CCL-64 Zellen.....	142
3.4.1.2	Aktivierung von TGF- β -sensitiven Reportergen durch GDF-15.....	143
3.4.1.3	GDF-15-abhängige Signaltransduktion in OvCA-Zellen.....	146
3.4.2	GDF15-abhängige Signaltransduktion und Rezeptoraktivierung in Immunzellen.....	148
3.4.2.1	GDF-15-abhängige Signaltransduktion in Immunzellen.....	148

3.4.2.1.1	Signaltransduktion über SMAD.....	148
3.4.2.1.2	Signaltransduktion über AKT, p38/MAPK und JAK-STAT.....	151
3.4.2.2	GDF-15- und TGF- β 1-abhängige Rezeptoraktivierung in Immunzellen.....	154
3.4.3	GDF-15- und TGF- β 1-abhängige Genregulation in Immunzellen.....	157
3.4.3.1	Induzierte Genexpression.....	158
3.4.3.1.1	TGF- β 1-induzierte Genexpression in NK- und CD8 ⁺ -T-Zellen.....	158
3.4.3.1.2	GDF-15-induzierte Genexpression in NK-Zellen nach 6 und 24 h Inkubation.....	162
3.4.3.2	Inhibition der Genexpression.....	163
3.4.3.2.1	TGF- β 1-abhängige Inhibition der Genexpression in NK- und CD8 ⁺ -T-Zellen.....	163
3.4.3.2.2	GDF-15-abhängige Inhibition der Genexpression in NK-Zellen nach 6 und 24 h Inkubation.....	167
3.4.3.3	„Pathway Analyse“ der TGF- β 1- und GDF-15-regulierten Gene.....	171
3.4.4	Zusammenfassung: Signaltransduktion und Genregulation.....	177
4	DISKUSSION	178
<hr/>		
4.1	Expression von GDF-15 im Ovarialkarzinom.....	178
4.2	Funktionen von GDF-15 im Ovarialkarzinom.....	181
4.2.1	Autokrine Funktion von GDF-15 in OvCA-Zellen.....	181
4.2.1.1	Wachstum.....	181
4.2.1.2	Viabilität.....	183
4.2.1.3	Oberflächenmarker.....	183
4.2.2	Parakrine Funktion von GDF-15 auf das Immunsystem von Tumorpatientinnen.....	186
4.2.2.1	Modulation der NK-Zell-Lyseaktivität durch GDF-15.....	187
4.2.2.2	GDF-15-abhängige Rezeptormodulation.....	188
4.2.2.3	Lysefunktionalität unter GDF-15-Einfluss.....	193
4.2.2.4	GDF-15 und Immunzellapoptose.....	194
4.3	GDF-15-abhängige Signaltransduktion und Genexpression.....	195
4.3.1	Signaltransduktion in Ovarialkarzinomzellen.....	196
4.3.2	Signaltransduktion in Immunzellen.....	197
4.3.3	GDF-15- und TGF- β -abhängige Genregulation in Immunzellen.....	204
4.3.3.1	TGF- β -abhängige Genregulation in NK- und CD8 ⁺ -T-Zellen.....	204
4.3.3.2	GDF-15-abhängige Genregulation in NK-Zellen.....	207
4.4	Funktionale Analogie von GDF-15 und TGF-β.....	210
4.5	Zusammenfassung: Immuninhibitorische Wirkung von GDF-15.....	211
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick:	
	Mögliche Tumorimmuntherapie gegen GDF-15.....	212
5	ANHANG	214
<hr/>		
5.1	Abkürzungen.....	214
5.2	Quellenverzeichnis.....	218

5.2.1	Literatur.....	218
5.2.2	Sonstige Quellen.....	256
5.3	Plasmidkarten.....	257
5.3.1	pCDNA3.1-GDF-15.....	257
5.3.2	pIRESeGFP-GDF-15.....	258
5.3.3	pSUPERpuro-GDF-15.....	258
5.3.4	pCDNA3.1-fluc.....	259
5.4	„Pathway Analyse“.....	260
5.4.1	NK-Zellen nach 24 h TGF- β 1-Behandlung.....	260
5.4.2	CD8 ⁺ -T-Zellen nach 24 h TGF- β 1-Behandlung.....	261
5.4.3	NK-Zellen nach 6 h GDF-15-Behandlung.....	262
5.4.4	NK-Zellen nach 24 h GDF-15-Behandlung.....	262
5.5	Veröffentlichungen.....	265
5.5.1	Publikationen.....	265
5.5.2	Präsentationen.....	266
5.6	Danksagung.....	267

0.1 Zusammenfassung

Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind an wichtigen physiologischen Prozessen wie der Zellhomöostase, der Wachstumsregulation und der Zelldifferenzierung beteiligt (Massague, 2000; Siegel and Massague, 2003). Zudem ist TGF- β selbst in vielen Tumoren überexprimiert und nimmt eine essentielle Rolle beim „*tumor immune escape*“ ein (Moutsopoulos et al., 2008). GDF-15 ist ein atypisches Mitglied der TGF- β -Superfamilie. Unter physiologischen Bedingungen kommt es nur in der Plazenta in größeren Mengen vor, während es in zahlreichen Tumoren überexprimiert gefunden wurde (Bauskin et al., 2006; Brown et al., 2003; Chenau et al., 2009; Schober et al., 2001; Welsh et al., 2003). Die genaue Funktion von GDF-15 ist bislang weder im physiologischen Kontext noch im Tumorkontext genau geklärt. Aufgrund der häufigen und hohen Expression in Tumoren scheint GDF-15 eine wesentliche Funktion im Tumorprogress auszuüben.

Das Ovarialkarzinom (OvCA) nimmt, obwohl zehnmal seltener als der Brustkrebs, die Stellung als tödlichste gynäkologische Erkrankung ein. Da der Tumor meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird, sind bis heute die Heilungschancen des OvCA schlecht. Häufig kommt es zum Rezidiv nach zunächst erfolgreicher Chemotherapie und mit 30% ist die 5-Jahres-Überlebenschance gering. Für die chemoresistenten Fälle gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt keine effektive Therapie. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, neue innovative Therapiestrategien zu entwickeln, um die Heilungschancen für diesen aggressiven Tumor zu verbessern. Günstige immunologische Parameter korrelieren mit der Überlebensdauer von OvCA-Patientinnen (Curiel et al., 2004), was die Immuntherapie beim OvCA in den Fokus der experimentellen klinischen Therapie rückt. Doch um neue immuntherapeutische Strategien entwickeln zu können, müssen zunächst immunologisch relevante Angriffspunkte identifiziert werden.

Das in vielen Tumoren exprimierte GDF-15 ist mit TGF- β , einem der stärksten immunsuppressiven Faktoren, nah verwandt, was die Vermutung nahe legt, dass auch GDF-15 eine immunologisch relevante Funktion im Tumorkontext ausüben könnte. In dieser Arbeit wurden daher die Expression und die mögliche Funktion von GDF-15 als Immunmodulator im Ovarialkarzinom untersucht.

Expressionsanalysen von OvCA-Gewebe und primären OvCA-Zellen zeigten, dass GDF-15 das am stärksten überexprimierte Gen der untersuchten TGF- β -Familienmitglieder im OvCA ist. Auch als sezerniertes Protein wird GDF-15 *in vivo* und *in vitro* im OvCA detektiert. Damit reiht sich das OvCA in die Gruppe der Tumore ein, die GDF-15 überexprimieren. Gleichzeitig deutet die hohe Expression auf eine funktionale Rolle von GDF-15 im OvCA hin.

Unter Zuhilfenahme von GDF-15-defizienten und GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zelllinien wurde ermittelt, welche Bedeutung GDF-15 als autokriner Faktor für das Wachstum von OvCA-Zellen hat. Doch sowohl GDF-15-Defizienz als auch GDF-15-Überexpression haben nur einen marginalen Einfluss auf das Wachstum und die Viabilität der Tumorzellen. Die Oberflächenexpression der NKG2D-Liganden dagegen ist unter GDF-15-Defizienz, nicht jedoch bei GDF-15-Überexpression induziert. Dies macht GDF-15-defiziente OvCA-Zellen immunologisch angreifbar für zytotoxische Immunzellen. OvCA-Zellen, die GDF-15 daher *in vivo* exprimieren, verschaffen sich so einen immunologischen Vorteil.

Normalerweise eliminiert das Immunsystem entartete körpereigene Zellen. Manchmal gelingt es Tumorzellen jedoch, sich dieser Immunüberwachung zu entziehen und dem Immunsystem zu „entwischen“ (Ostrand-Rosenberg, 2008; Quesnel, 2008; Stewart and Abrams, 2008). Inwieweit GDF-15 bei der Koordination des „*immune escape*“ des OvCA eine Rolle spielt, sollte im Fokus dieser Arbeit stehen. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Wirkung von GDF-15 auf NK-Zellen, da diese als frühe Effektoren und wichtige Mediatoren zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem nicht nur eine Schlüsselrolle bei der immunologischen Überwachung spielen, sondern sich dadurch auch als ideale Werkzeuge für die Tumorummuntherapie auszeichnen (Chan et al., 2008; Waldhauer and Steinle, 2008).

Exogenes GDF-15 hemmt *in vitro* die Lyseaktivität von NK-Zellen gegenüber OvCA-Zellen. Endogene GDF-15-Defizienz der OvCA-Zellen sensitiviert diese gegenüber der NK-Zell-Lyse und endogene GDF-15-Überexpression mindert die NK-Lyseaktivität. Die Hemmung der NK-Lyseaktivität erfolgt durch verschiedene synergistisch wirkende Mechanismen: durch Rezeptormodulation, durch direkte Modulation des Lysemechanismus und durch Apoptoseregulation.

Wie TGF- β 1 reguliert GDF-15 die Expression des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D von der Zelloberfläche herunter und ist damit das zweite Mitglied aus der TGF- β -Superfamilie mit dieser Eigenschaft. Zusätzlich induziert GDF-15 die Expression des inhibierenden Rezeptors CD305 und die des mit NKG2A- und NKG2C-assoziierten Rezeptors CD94. Neben der Rezeptormodulation greift GDF-15 direkt in den Lysemechanismus der NK-Zellen ein, indem es die Granzym B-Expression und die Granulafreisetzung beeinflusst. Zusätzlich nimmt GDF-15 Einfluss auf die Apoptose von NK-Zellen: zwar löst es selbst keine Apoptose aus, GDF-15 verstärkt jedoch selektiv die FasL-induzierte Apoptose in Immunzellen, indem es die Expression von Fas/CD95 auf Immunzellen induziert.

Abschließend wurden auch die von GDF-15 initiierten intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen und Genregulationen untersucht. Im Gegensatz zu TGF- β kann GDF-15 in OvCA-Zellen AKT aktivieren. Zusätzlich ist zelltypspezifisch die SMAD-abhängige Signaltransduktion in OvCA-Zellen möglich und auch der JNK-Weg kann durch GDF-15 in OvCA-Zellen aktiviert werden. Anders in Immunzellen: hier erfolgt die Aktivierung der SMAD-Proteine zeitverzögert zu TGF- β , was auf eine indirekte Wirkung von GDF-15 schließen lässt und im Unterschied zu TGF- β 1 aktiviert GDF-15 hier zusätzlich die p38/MAPK. Der Phospho-Immunrezeptor-Array, der die direkte und indirekte Aktivierung verschiedener Immunrezeptoren über ITAM/ITIM-Phosphorylierung bestimmt, zeigt wiederum ein sehr ähnliches Aktivierungsmuster von GDF-15 und TGF- β 1 in Immunzellen, das sich nur in der Stärke der Signale unterscheidet.

Die Genregulation von GDF-15 und TGF- β 1 in NK-Zellen ist dagegen sehr verschieden. Beide Zytokine regulieren überwiegend Gene aus gleichen funktionalen Gruppen, wie der MAPK-Signaltransduktion, der Apoptose und der Kalzium-assoziierten Gengruppe in NK-Zellen. Allerdings sind die einzelnen von TGF- β 1 und GDF-15 regulierten Gene verschieden. Nur drei Gene (CD55, Caspase-8 und Apolipoprotein 6) sind durch GDF-15 und TGF- β 1 gleich reguliert. TGF- β 1 reguliert daneben Gene aus der Gruppe der Zytokine/Chemokine und des Zellzyklus, GDF-15 dagegen überwiegend Gene der oxidativen Phosphorylierung.

Zusammengefasst zeigt sich eine funktionale Analogie von GDF-15 und TGF- β 1. Beide inhibieren die NK-Zytotoxizität, teilweise sogar über gleiche Mechanismen. TGF- β 1 ist jedoch funktional das potentere Protein, das in geringeren Konzentrationen häufig den stärkeren Effekt erzielt, dafür scheint GDF-15 ein breiteres Funktionalitätsspektrum zu besitzen. Ihre Wirkung vermitteln GDF-15 und TGF- β 1 in Immunzellen und OvCA-Zellen überwiegend auf ähnlichen Signalwegen, wohingegen die Genexpression in NK-Zellen grundlegend verschieden ist, obwohl die regulierten Gene in den gleichen Funktionalitätsclustern konzentriert sind.

Die Daten dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal eine funktionale Rolle von GDF-15 als immunmodulatorischer Faktor in Tumoren auf und identifizieren damit einen neuen Angriffspunkt für Immuntherapien, welcher Grundlage für neue Tumortherapiestrategien, nicht nur für das OvCA, sondern auch für andere GDF-15-exprimierende Tumore sein kann.

0.2 Summary

TGF- β superfamily members are involved in important physiological processes like cell homeostasis, growth regulation and cell differentiation (Massague, 2000; Siegel and Massague, 2003). Furthermore, TGF- β is expressed in many tumors and plays a pivotal role in tumor immune escape (Moutsopoulos et al., 2008). GDF-15 is an atypical member of the TGF- β superfamily. Under physiological conditions it is expressed only in the placenta, whereas it is over-expressed in many tumors (Bauskin et al., 2006; Brown et al., 2003; Chenau et al., 2009; Schober et al., 2001; Welsh et al., 2003). So far, the exact function of GDF-15 in physiological and tumor context remains unknown. Due to the high and frequent expression in different tumors GDF-15 might play an important role in tumor progression.

Ovarian cancer (OvCA) is one of the most deadly gynaecological malignancies although ten times less common than breast cancer. Often OvCA is diagnosed in late stages and therapies often fail. Initially, chemotherapy is successful but in many cases tumors re-grow and the 5-year survival rate is less than 30%. Until now, no cure for chemoresistent OvCA exists which demonstrates the need for new experimental strategies to ameliorate the prognosis of this aggressive cancer. Immunotherapy is one major subject of experimental OvCA therapy, as favorable immunological parameters correlate with the survival of OvCA patients (Curiel et al., 2004). In order to design new immunotherapeutic strategies against OvCA reliable and immunologically relevant targets have to be identified. GDF-15 is not only highly expressed in different tumors but is also closely related to one of the most immunosuppressive factors known suggesting a potential immunosuppressive role for GDF-15 itself. Thus, in this work GDF-15 expression and potential function as an immunomodulator in ovarian cancer is analyzed.

Expression analyses of OvCA tissue and primary OvCA cells reveal GDF-15 as the protein with the highest over-expression in OvCA of all analyzed TGF- β family members on RNA and protein level *in vivo* and *in vitro*. With that, OvCA joins the growing chain of GDF-15 over-expressing tumors. At the same time this high expression suggests a functional involvement of GDF-15 in ovarian carcinogenesis.

With the help of GDF-15 deficient and GDF-15 over-expressing OvCA cell lines the role of GDF-15 as an autocrine growth factor was analyzed. But neither GDF-15 deficiency nor GDF-15 over-expression has an influence on growth or viability of OvCA cell lines, whereas the NKG2D ligand expression on the cell surface of GDF-15 deficient OvCA cells is increased. NKG2D ligand expression renders the cells sensitive to a cytotoxic attack by immune cells. Thus, OvCA cells producing GDF-15 *in vivo* might gain an immunological advantage.

Normally, the immune system is able to eliminate altered cells but sometimes tumor cells escape from this immune surveillance (Ostrand-Rosenberg, 2008; Quesnel, 2008; Stewart and Abrams, 2008). The focus of this work lies in the contribution of GDF-15 to the immune escape of OvCA, concentrating on the influence of GDF-15 on NK cells. NK cells act as early cytotoxic effectors against tumors and represent important immune mediators with impact on innate and adaptive immunity. Thus, they are ideal tools for tumor immune therapy (Chan et al., 2008; Waldhauer and Steinle, 2008).

In vitro, exogenous GDF-15 inhibits NK cell lysis against OvCA cells. Additionally, GDF-15 deficient OvCA cells are killed more efficiently in NK lysis assays than GDF-15 over-expressing OvCA targets.

Inhibition of NK cell lysis occurs by different synergistic mechanisms: receptor modulation, direct inhibition of cytotoxic functions and apoptosis regulation. Like TGF- β GDF-15 down-regulates NKG2D receptor expression and is hence the second member of the TGF- β superfamily with this characteristic. Additionally, GDF-15 induces the expression of the inhibitory receptor CD305 and the NKG2A and NKG2C associated receptor CD94.

Beside receptor modulation GDF-15 interferes directly with the cytolytic activity of NK cells by reducing granzyme B expression and granula release. In addition, GDF-15 influences apoptosis regulation in NK cells. GDF-15 per se is not pro-apoptotic but selectively enhances FasL mediated lysis by up-regulation of CD95/Fas on NK cells.

The effect of GDF-15 on the immune system was not only functionally analyzed but also mechanistically with regard to GDF-15 mediated signal transduction and gene regulation. In contrast to TGF- β , GDF-15 can activate AKT in OvCA cells as well as cell type specific SMAD and JNK signal transduction. In immune cells GDF-15 dependent SMAD signaling is delayed compared to that of TGF- β suggesting a rather indirect effect of GDF-15. And in contrast to TGF- β , GDF-15 can additionally activate p38/MAPK in immune cells. A phospho-immunoreceptor array showed a similar activation pattern of GDF-15 and TGF- β differing only in the signals' strength, whereas their gene regulation in NK cells is different. Both cytokines regulate genes clustering in the same functional groups like MAPK signaling or apoptosis although the individual genes are different. Only three genes (CD55, caspase-8 and Apolipoprotein 6) are regulated by both cytokines. TGF- β predominantly regulates genes responsible for cytokine-cytokine-receptor interactions and cell cycle progression, whereas GDF-15 predominantly regulates genes involved in oxidative phosphorylation.

In summary, GDF-15 and TGF- β share the same functional characteristics. Both inhibit NK cytotoxicity, to some extent by similar mechanisms. TGF- β is the more potent protein mostly achieving a more powerful effect in a lesser concentration but GDF-15 seems to have a broader spectrum. Signal transduction in OvCA and immune cells is quite similar, whereas the target gene expression is completely different although regulated genes concentrate in the same functional clusters.

In this work the functional role of GDF-15 as an immune mediator in tumor context is described for the first time revealing an interesting new target for experimental therapy not only for OvCA but for all GDF-15 producing tumors.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Hintergrund und Diagnose

Obwohl das Ovarialkarzinom ungefähr zehn Mal seltener auftritt als Brustkrebs, stellt es die fünfthäufigste maligne Todesursache bei Frauen dar. In den USA werden pro Jahr ungefähr 23.000 Neuerkrankungen registriert und die Mortalitätsrate liegt bei etwa 14.000 Frauen jährlich (Greenlee et al., 2001; Jemal et al., 2006, <http://www.cancer.gov>). Damit nimmt das Ovarialkarzinom die Stellung der tödlichsten genuinen gynäkologischen Erkrankung ein. Die ausnehmend schlechte Prognose beruht dabei vor allem darauf, dass die Krankheit aufgrund der unspezifischen Symptome meist lange Zeit unerkannt bleibt. Zudem ist das Ovarialkarzinom ein Tumor, der häufig Resistenzen gegen Chemotherapeutika entwickelt (Abb. 1: Das Ovarialkarzinom).



Abb. 1: Das Ovarialkarzinom. (<http://www.cancersafe.com/cancersafe/cancers/img/over.jpg>).

90% aller Ovarialkarzinome entstehen aus dem ovariellen Oberflächenepithel. Aufgrund seiner proteolytischen und wachstumsregulierenden Eigenschaften hat dieses eine Funktion bei der Ovulation und der anschließenden Reparatur des Ovars (Auersperg et al., 2001; Feeley and Wells, 2001) (Abb. 2: Schematische Darstellung des Ovars). Die verbleibenden 10% der Ovarialkarzinome entstehen aus Mutationen in Granulosa-, Stroma- oder Keimzellen des Ovars. Im Folgenden wird mit Ovarialkarzinom (OvCA) das aus dem Epithel hervorgehende Ovarialkarzinom bezeichnet.

Häufige Ovulationen begünstigen das Auftreten von OvCA, während häufige Schwangerschaften und orale Kontrazeptiva, vermutlich aufgrund des darin enthaltenen Progestins, eine protektive Wirkung zeigen (Casagrande et al., 1979; Fathalla, 1971; Kvale et al., 1988; Rodriguez et al., 1998; Schildkraut et al., 1997).

Ungefähr 90% der OvCA entstehen sporadisch, wobei Umweltfaktoren wie Ernährung, Rauchen oder Infektionen eine Rolle spielen. Der genetische Einfluss und der familiäre Hintergrund scheinen für 5-10% der OvCA verantwortlich zu sein (Herbst, 1994).

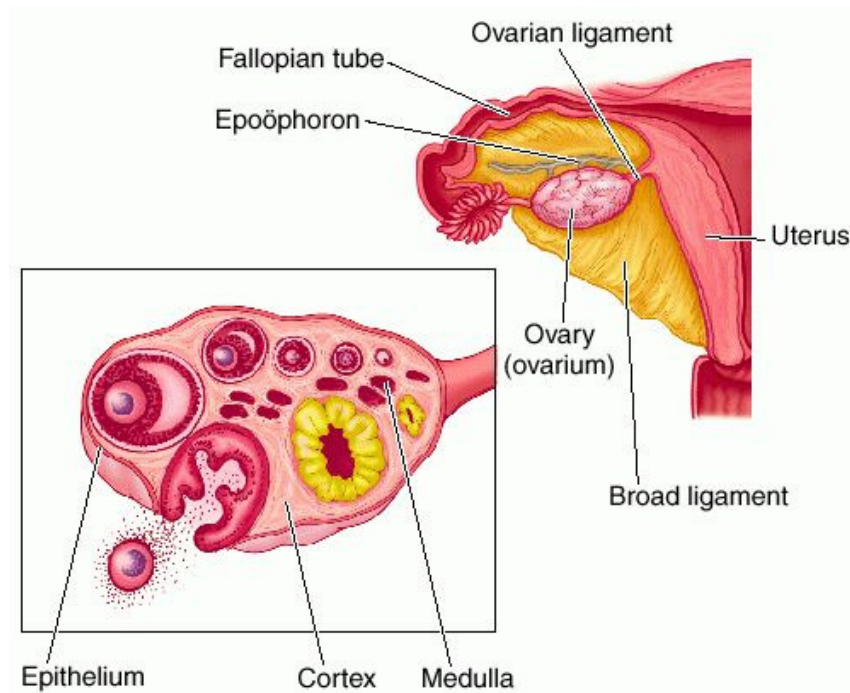


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ovars. Das Ovar ist über den Eileiter („fallopian tube“) mit dem Uterus verbunden und eingebettet in das Ligamentum („ovarian ligament“, „broad ligament“) ([http://a248.e.akamai.net/7/248/430/20080327144034/www.mercksource.com/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/images/ovarium\(1\).jpg](http://a248.e.akamai.net/7/248/430/20080327144034/www.mercksource.com/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/images/ovarium(1).jpg)).

Das OvCA bleibt lange Zeit beschwerdelos. Im Frühstadium zeigen sich, wenn überhaupt, wenige unspezifische Symptome, so dass nur ungefähr 5% der diagnostizierten OvCA in die frühen FIGO- (=„*Fédération Internationale de Gynécologie et d’Obstétrique*“) Stadien I oder II fallen und mehr als 90% der diagnostizierten OvCA in die späten Stadien III oder IV (Tab. 1: FIGO-Einteilung des Ovarialkarzinoms). Aufgrund der späten Diagnose beträgt die 5-Jahres-Überlebenschance beim OvCA nur 30-40% (Herbst, 1994). Nur eine gründliche gynäkologische Untersuchung mit transvaginalem und transabdominalem Ultraschall sowie digital-rektaler Untersuchung kann Hinweise auf den Befund „Ovarialkarzinom“ ergeben (Weber, 2005).

Die Metastasierung von OvCA-Zellen in das Peritoneum erfolgt durch direkte Ausbreitung auf umliegende Organe (Eileiter, Uterus) oder über die Peritonealflüssigkeit zu weiteren Organen des Bauchraums. Häufig geht die Metastasierung einher mit der Bildung von Aszites (Bauchwasser), dem deutlichsten Anzeichen für das OvCA (Abb. 3: Orte der Metastasierung von OvCA-Zellen). Immunzellen, insbesondere Makrophagen, sind an der Metastasierung von OvCA-Zellen wesentlich beteiligt (Robinson-Smith et al., 2007).

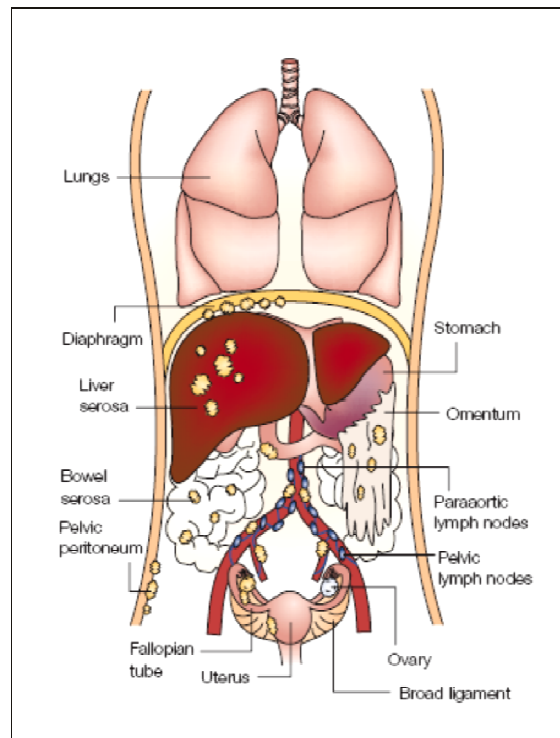


Abb. 3: Orte der Metastasierung von OvCA-Zellen. Das OvCA breitet sich ausgehend vom Ovar im gesamten Bauchraum auf Darm („*bowel*“), Bauchfell („*peritoneum*“), Leber („*liver*“), Zwerchfell („*diaphragm*“) und das Netz („*omentum*“) aus. Die Ausbreitung erfolgt direkt über die Bauchflüssigkeit oder das Blut- bzw. Lymphsystem (Naora and Montell, 2005).

1.1.2 Histologie und klinisches Erscheinungsbild

Die Klassifizierungsparameter des OvCA basieren auf dem histologischen Erscheinungsbild, dem Stadium der Erkrankung und dem Tumorgrad (Lepage et al., 2006). Das OvCA lässt sich aufgrund des Erscheinungsbildes histologisch in seröses, endometrioides, klarzelliges und muzinöses Adenokarzinom unterteilen, wobei seröse Adenokarzinome ungefähr 80% ausmachen (Scully et al., 1999). Morphologisch sind diese OvCA nicht von den Tumoren zu unterscheiden, die aus anderen Geweben des weiblichen Genitaltraktes hervorgehen. So gleicht das seröse OvCA den Tumoren der Eileiter, das endometrioides OvCA ähnelt Tumoren des Endometriums und der muzinöse Subtyp gleicht den Tumoren der Endozervix (Dubeau, 1999).

Die Eingruppierung in ein Tumorstadium erfolgt unter Berücksichtigung der Ausbreitung des Primärtumors entsprechend der FIGO-Richtlinien in die Stadien I-IV (Tab. 1: FIGO-Einteilung des Ovarialkarzinoms).

Die Einteilung nach Tumorgrad in niedriggradiges (=0,1) bzw. hochgradiges (=3) OvCA erfolgt anhand des Systems nach Silverberg (Shimizu et al., 1998) und beschreibt den Differenzierungsgrad des Tumors.

Tab. 1: FIGO-Einteilung des Ovarialkarzinoms (simplifizierte Darstellung).

Stadium	Befund
I (A, B, C)	Tumor auf Ovarien beschränkt
II (A, B, C)	Primärtumor mit Ausbreitung in das Becken hinein
III (A, B, C)	Primärtumor mit Befall des gesamten Abdominalbereichs
IV	Primärtumor und Fernmetastasen

1.1.3 Genexpression und molekulare Ursachen

Höchstwahrscheinlich hat das OvCA seinen Ursprung in der Einzelzellschicht des ovariellen Oberflächenepithels. Diese Schicht ist vom Mesothelium, das andere Gewebe und Organe auskleidet, nicht zu unterscheiden. Das OvCA ist morphologisch jedoch Müller-ähnlich (Resta et al., 1993; Scully, 1995). Daher scheint ein Übergang vom epithelialen zum müllerschen Phänotyp in der frühen Phase der Tumorgenese stattzufinden. Bapat et al. konnten zudem zeigen, dass Tumorzellen aus OvCA-Aszites stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen (Bapat et al., 2005).

Die molekularen Ursachen, die zur Tumorgenese und die Mechanismen, die letztendlich zur Entstehung des OvCA führen, sind noch unklar. Alle OvCA entstehen jedoch durch Mutationen in Regulationskaskaden, die bei der Zellproliferation, der Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Niedriggradige OvCA scheinen mit vorangegangener Endometriose verknüpft zu sein (Modesitt et al., 2002), während ungefähr 50% der hochgradigen OvCA aus vorangegangenen zystischen Läsionen hervorgehen (Horiuchi et al., 2003).

Das OvCA ist gekennzeichnet durch die Expression von Mucin (MUC1-4) und CA125 (MUC16) (Van Niekerk et al., 1993; Zhang et al., 1998). p53, das Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose kontrolliert, ist in 70-80% der OvCA-Fälle mutiert (Havrilesky et al., 2003; Wen et al., 1999). In 25-30% ist der EGF-Rezeptor Her2/neu amplifiziert, was mit einer schlechten Prognose einhergehen kann (Berchuck et al., 1990). Neuere Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Her2/neu-Status und dem Krankheitsverlauf ableiten (Tuefferd et al., 2007).

Tab. 2: Häufige Genmutationen im Ovarialkarzinom.

Gen	Vorkommen	Subtyp OvCA
p53	70-80%	alle Stadien, in 50% der hochgradigen OvCA
HLA-G	50%	hochgradige OvCA
Her2/neu	25-30%	alle Stadien, in 50% der hochgradigen OvCA
KRAS		niedriggradige, muzinöse OvCA
BRAF		niedriggradige, muzinöse OvCA

KRAS- oder BRAF-Mutationen treten häufig im niedriggradigen, muzinösen OvCA auf, während p53-Mutationen sowie HLA-G- und Her2/neu-Expression im hochgradigen OvCA in mehr als 50% der Tumore nachweisbar sind (Tab. 2: Häufige Genmutationen im Ovarialkarzinom) (Caduff et al., 1999; Kohler et al., 1993a; Kohler et al., 1993b; Kupryjanczyk et al., 1993; Ross and Fletcher, 1999; Ross et al., 1999; Singer et al., 2003a; Singer et al., 2003b).

1.1.4 Tumormarker im Ovarialkarzinom

Tumormarker sind wichtige Werkzeuge für die Prognose, Diagnose und Therapieüberwachung sowie für die Nachuntersuchungen nach der Behandlung von Krebserkrankungen. Idealerweise hat ein Tumormarker eine hohe Spezifität für die Erkrankung: er unterscheidet zwischen bösartiger Erkrankung und benignem bzw. gesundem Phänotyp und ist äußerst sensitiv. Zudem muss der Marker zuverlässig und der Nachweis klinisch praktikabel sein. Spezifische und zuverlässige Tumormarker bieten die Möglichkeit Tumore früher erkennen und behandeln zu können und erhöhen so die Überlebenschancen.

Die hohe Mortalität des OvCA resultiert aus dem unzuverlässigen Screeningprotokoll für frühe Stadien. Patientinnen, deren Erkrankung im frühen Stadium I diagnostiziert wird, haben eine Überlebenschance von 90%, während OvCA-Patientinnen in den späten Stadien III oder IV nur noch eine 5-Jahres-Überlebenserwartung von knapp 30% haben (Holschneider and Berek, 2000; Meyer and Rustin, 2000). Dies zeigt die Dringlichkeit auf, zuverlässige Tumormarker, die bereits früh in der Tumorgenese exprimiert sind, für den klinischen Einsatz zu finden.

Im OvCA sind viele Tumormarker bekannt, allerdings hat im klinischen Alltag nur CA125 bei der Überwachung des Therapieverlaufs eine Bedeutung (Eltabbakh et al., 1999; Nagele et al., 1995). CA125 ist ein Glykoprotein mit unbekannter Funktion. Es ist im Epithel von gesundem Ovar, den Eileitern, dem Endometrium und der Zervix exprimiert. Weiterhin findet man es auf Oberflächen der Pleura, des Perikards und des Peritoneums. Erhöhte CA125-Spiegel im Serum sind bei mehr als 90% der OvCA-Patientinnen nachzuweisen, allerdings auch bei 40% der Patienten mit anderen intra-abdominalen Tumorerkrankungen (Tuxen et al., 1995). Der Einsatz von CA125 als Tumormarker für das OvCA ist daher limitiert. Auch die Sensitivität von CA125 ist gering: nur ungefähr 50% der Stadium-I-OvCA-Patientinnen weisen erhöhte CA125-Serumspiegel auf. Im Gegensatz dazu ist CA125 in vielen benignen Erkrankungen wie der Endometriose, bei Ovarialzysten, der uterinen Fibrose und bei chronischer Leberentzündung erhöht (Mann et al., 1988). Daher eignet sich dieser Marker für ein prognostisches Screening ebenfalls nur eingeschränkt (Jacobs et al., 1993; Jacobs et al., 1999; Menon and Jacobs, 2001a,b). Auch als Marker zur Analyse des Therapieverlaufs ist CA125 nur bedingt geeignet, da falsch-negative Ergebnisse in mehr als 20% der Fälle auftreten und damit die Gefahr einer vorzeitigen Therapiebeendigung besteht (Rustin et al., 1999).

Auf der Suche nach geeigneten prognostischen Markern sowie möglichen Angriffspunkten gegen das OvCA gibt es viele experimentelle Therapieansätze (Adib et al., 2004; Biade et al., 2006; Bignotti et al., 2006; Hibbs et al., 2004; Santin et al., 2004; Schaner et al., 2003). Denn obwohl

Tumorthapeutika kontinuierlich weiterentwickelt werden, ist in den letzten 20 Jahren die Überlebenschance beim OvCA kaum gestiegen (Adib et al., 2004). Eine Studie von Visintin et al. zeigte, dass eine Kombination aus sechs verschiedenen Markern (CA125, MIF, Leptin, Prolaktin, Osteopontin, IGF II) das Ovarialkarzinom in allen Stadien mit einer Spezifität von 99% und einer Sensitivität von 95% diagnostizierte (Visintin et al., 2008). Dabei zeigte nur die Kombination dieser Marker diese hohe Treffsicherheit, nicht jedoch die Marker im Einzelnen.

Auch andere Studien zeigen, dass durch die Kombination verschiedener Marker zusammen mit CA125 die Sensitivität zur Erkennung des OvCAs erhöht wird (Woolas et al., 1993). Oftmals scheitern diese Ansätze jedoch an der eingeschränkten Spezifität, da teilweise auch Gesunde bzw. Patienten mit benigner Erkrankung einen erhöhten Serumspiegel einer oder mehrerer dieser Marker aufweisen. Nur mit Hilfe geeigneter Marker kann eine zuverlässige Diagnose erstellt werden und damit entsprechend therapiert werden. Daher ist die Identifizierung zuverlässiger Tumormarker für das OvCA wesentlich für den Kampf gegen diesen Tumor.

1.1.5 Therapie von Ovarialkarzinomen

Die Standardtherapie beim OvCA ist die chirurgische Entfernung der gesamten Tumormasse mit anschließender Chemotherapie. Da das OvCA häufig über das lymphatische System metastasiert, ist die Lymphadenektomie ebenfalls eine wichtige diagnostische, prognostische und therapeutische Maßnahme im Rahmen der OvCA-Behandlung (Morice et al., 2003a; Morice et al., 2003b). Etwa 90% der behandelten Patientinnen sprechen initial auf diese Therapie an, aber bei nur etwa 10% bleibt es bei einer kompletten Ausheilung ohne Remission. Der Großteil der Patientinnen wird wegen der bereits stattgefundenen (Mikro-)Metastasierung und aufgrund von Resistenzen im weiteren Verlauf der Erkrankung erliegen.

Die Chemotherapie gegen das OvCA beginnt nach chirurgischer Entfernung der Tumormasse einschließlich der Metastasen. In den letzten 20 Jahren wurde die Chemotherapie gegen das OvCA stetig verbessert. Man weicht zunehmend von den alkylierenden Substanzen ab und therapiert heute fast ausschließlich mit Taxanen und platinhaltigen Therapeutika (Memarzadeh and Berek, 2001). Seit den 80iger Jahren ist die Kombination aus Cisplatin, Cyclophosphamid und Doxorubicin im Einsatz. Carboplatin ersetzt heute häufig Cisplatin aufgrund der geringeren Toxizität. Bei Resistenzen gegen Platin-basierte Chemotherapeutika wird Paclitaxel eingesetzt (Aabo et al., 1998; du Bois et al., 1999a; du Bois et al., 1999b; McGuire et al., 1996a,b). Momentan erzielt die Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel über 6 x 3 Wochen eine 80%ige Ansprechrates mit 40-60% kompletter Krankheitselimination über die folgenden 18 Monate hinweg (Abb. 4: Standardtherapie beim Ovarialkarzinom mit Carboplatin und Paclitaxel).

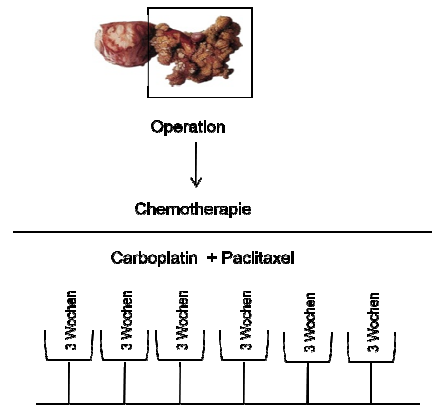


Abb. 4: Standardtherapie beim Ovarialkarzinom mit Carboplatin und Paclitaxel. Nach chirurgischer Entfernung des Tumors sowie möglichst aller Metastasen folgt die Chemotherapie mit einer Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel drei Wochen lang über sechs Zyklen. Auf diese Therapie sprechen 80% der Patientinnen mit OvCA an; davon bleiben 40-60 % krankheitsfrei für die folgenden 18 Monate.

Allerdings kann ein zunächst chemosensitiver Tumor über die Dauer der Behandlung hinweg chemoresistent werden, was bei einem Großteil der Patientinnen mit OvCA vorkommt (Greenlee et al., 2001; Markman et al., 2004). Für diese Fälle gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt keine effektive Therapie, daher werden neue, innovative Therapiestrategien dringend benötigt, um die Heilungschancen für diesen aggressiven Tumor zu verbessern.

1.1.6 Experimentelle Therapiekonzepte für das Ovarialkarzinom

Neue Therapiekonzepte wie beispielsweise die Immuntherapie stehen beim OvCA, wie auch bei anderen Arten von Krebs, im Mittelpunkt der Tumorforschung. Entscheidend für einen immuntherapeutischen Ansatz ist, ob und in welchem Maße das Immunsystem einen bereits etablierten Tumor bekämpfen oder kontrollieren kann. Beim OvCA korrelieren günstige immunologische Parameter mit der Überlebensdauer der Patientinnen (Curiel et al., 2004), was die Immuntherapie beim OvCA in den Fokus der experimentellen klinischen Tumortherapie rückt.

Schon vor über 100 Jahren wurden die ersten Grundsteine auf dem Weg zur Tumorimmuntherapie gelegt. William Coley injizierte 1893 Tumorpriente pyogene Bakterien zur Therapie maligner Tumore (Coley, 1893, 1991; Nauts and McLaren, 1990). 1909 stellte Paul Ehrlich das Konzept der immunogenen Eigenschaften von Tumoren vor, welches Burnet dann um 1960 in seiner „*tumor immune surveillance*“-Hypothese aufgriff (Burnet, 1967; Ehrlich, 1909). In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedenste tumorassoziierte Antigene (TAA) als molekulare Ursache für die immunologische Eliminierung von Tumorzellen identifiziert (Boon et al., 2006; Boon and van der Bruggen, 1996; Novellino et al., 2005). Tumore sind demzufolge immunogen; das Immunsystem kann

transformierte Zellen erkennen und eliminieren. Tritt ein Tumor klinisch in Erscheinung, hat das Immunsystem versagt bzw. der Tumor ist dem Immunsystem „entwischt“. Diese „*tumor escape*“-Varianten entstehen dadurch, dass das Immunsystem einen entarteten Zellklon nicht komplett beseitigen kann, dieser weiterexpandiert und aufgrund der genetischen Instabilität neue, immunologisch verschiedenartige Tochterzellen hervorbringt, bis schließlich eine Variante an Tumorzellen entsteht, die nicht mehr vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden kann (Khong and Restifo, 2002). Dieser dynamische, wechselseitige Prozess wird als „*cancer immunoediting*“ bezeichnet (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004a, b; Smyth et al., 2006a).

Mediatoren des „*tumor immune escape*“ können vom Tumor sezernierte Faktoren sein wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren, die ein immunsuppressives Milieu erzeugen und Immuneffektorzellen parakrin inhibieren (Kim et al., 2006; Kryczek et al., 2006; Thomas and Massague, 2005). Außerdem können Tumore tolerogene Immunzellen zu ihrem Zweck missbrauchen, indem sie diese zur Inhibition von tumorspezifischen T-Effektorzellen bewegen. In diesem Zusammenhang sind besonders regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und tumorassoziierte Makrophagen (TAM) von Bedeutung (Abb. 5: „*tumor immune escape*“-Strategien) (Curiel et al., 2004; Kryczek et al., 2006; Smyth et al., 2006b; Wolf et al., 2005).

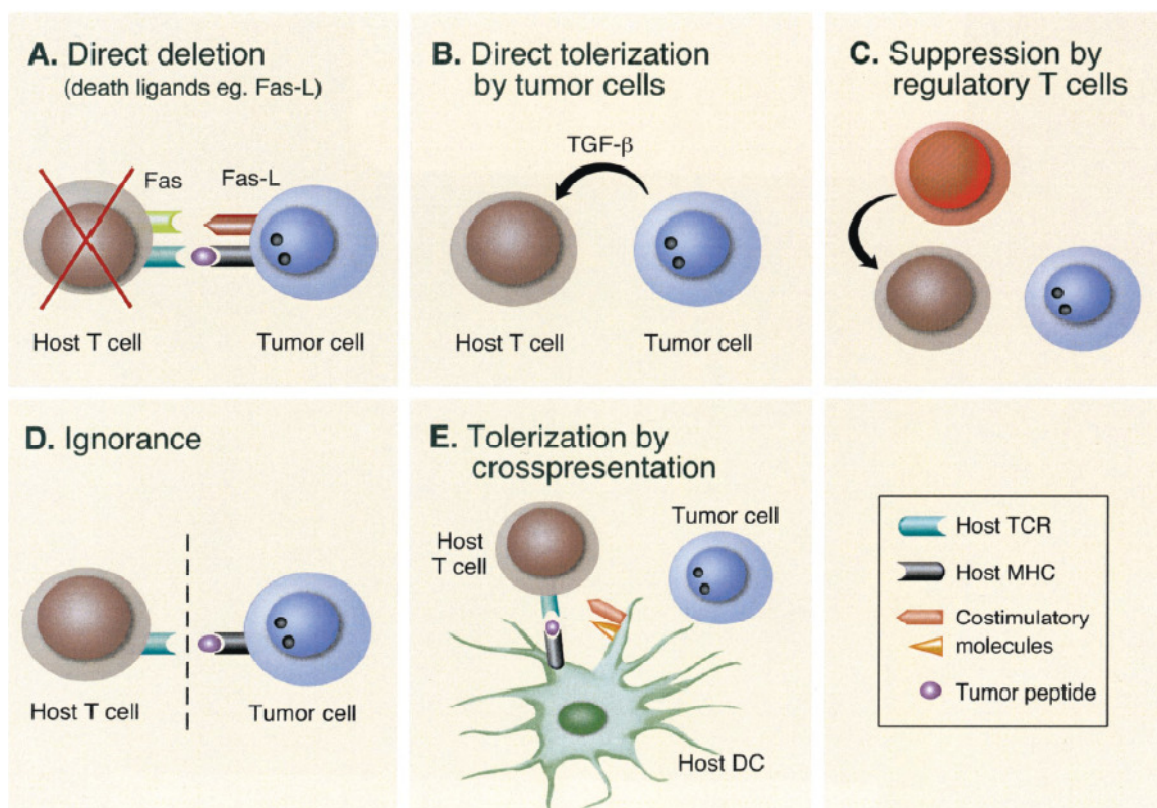


Abb. 5: „*tumor immune escape*“-Strategien. Der Tumor kann dem Immunsystem auf verschiedene Weise entgehen: durch Eliminierung der Effektorzellen (A), durch Toleranzinduktion (B, E), durch T_{reg} -vermittelte Suppression (C) und durch lokale Barrieren (D) (Mapara and Sykes, 2004).

Die Zusammensetzung der tumorinfiltrierenden Immunzellen ist ausschlaggebend für das „*tumor immunoediting*“, wie eine Studie von Galon et al. an kolorektalen Tumoren zeigte (Galon et al., 2006). Dabei ist die Beurteilung und Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen für die Prognose des Krankheitsverlaufs verlässlicher als jeder Tumormarker. Im OvCA wurde eine positive Korrelation zwischen zytotoxischen T-Zellen im Tumor und der Überlebensrate ermittelt (Sato et al., 2005). Die 5-Jahres-Überlebensrate von OvCA-Patientinnen mit tumorinfiltrierenden T-Zellen betrug 38% im Gegensatz zu 4,5% bei OvCA-Patientinnen, bei denen keine oder wenige T-Zellen im Tumor nachgewiesen wurden (Zhang et al., 2003). Dazu kommt, dass die komplette Entfernung des Tumors in 67% der Fälle bei Patientinnen mit T-Zellinfiltraten erreicht wurde, während dies nur in 29% der Fälle bei Patientinnen ohne Infiltrat gelang. Das lässt vermuten, dass die infiltrierenden T-Zellen die Tumormasse zusammenhalten und eine Metastasierung erschweren, selbst wenn eine Tumoreliminierung durch das Immunsystem nicht erfolgreich war. Bei OvCA-Patientinnen mit T-Zellinfiltrat, bei denen eine komplette chirurgische Entfernung der Tumormasse nicht möglich war, war die 5-Jahres-Überlebensrate mit 54% dennoch besser als bei Patientinnen ohne T-Zellinfiltrat mit nur 6,5% (Zhang et al., 2003). Allerdings ist die Zusammensetzung der T-Zellinfiltrate bzw. das Verhältnis von zytotoxischen T-Zellen zu T_{reg} von entscheidender Bedeutung für den Verlauf der Tumorerkrankung.

Ihre physiologische Funktion haben T_{reg} in der Kontrolle ungewollter Autoimmunreaktionen (Shimizu et al., 1999). Im Tumorkontext, wo eine Immunreaktion gegen (veränderte) Eigenantigene erwünscht ist, können T_{reg} die Immunreaktion gegen den Tumor jedoch unterdrücken und somit den Krankheitsverlauf verschlechtern (Chen et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2005; Smyth et al., 2006b). Im OvCA wurde eine negative Korrelation zwischen T_{reg} -Infiltrat im Tumor und der Überlebenswahrscheinlichkeit gefunden. Zudem war, wie oben erwähnt, das Verhältnis von $CD8^+$ -T-Zellen zu T_{reg} der beste prognostische Faktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patientinnen mit fortgeschrittenem OvCA (Curiel et al., 2004; Dietl et al., 2007; Sato et al., 2005; Wolf et al., 2005). Das Immunsystem spielt also nicht nur bei der Entstehung, sondern auch im weiteren Krankheitsverlauf des Ovarialkarzinoms eine wichtige Rolle. Aufgrund vieler immunrelevanter Ansatzmöglichkeiten (T-Zellinfiltrate) eignet sich das OvCA besonders für die Immuntherapie. Daher ist diese beim OvCA ein möglicher und vielversprechender Ansatz, um der Chemoresistenz dieses Tumors entgegenzuwirken.

Um eine Immunantwort gegen den Tumor zu initiieren, gibt es zwei mögliche Strategien: die Aktivierung und Verstärkung der Immunmechanismen gegen den Tumor oder die Ausschaltung von Komponenten, die die Immunantwort unterdrücken (Tab. 3: Ansatzpunkte der Tumorimmuntherapie).

Tab. 3: Ansatzpunkte der Tumorimmuntherapie (adaptiert nach Zou, 2005).**a. Verstärkung von Immuneffektormechanismen.**

Immuneffektor oder Molekül	Verstärkung der Effektoren
T-Zellen	Injektion von zytotoxischen T-Zellen
Dendritische Zellen (DC)	DC-Vakzinierung
NK-Zellen	Injektion von aktivierten NK-Zellen
Tumorassoziierte Antigene (TAA)	Peptid- oder TAA-Vektorvakzinierung
Zytokine	IL-2-, IFN- α - und IL-12-Administration

b. Blockade von inhibitorischen Immunmechanismen.

Immunsuppressor	Blockade des Inhibitors
T _{reg}	Elimination von T _{reg} (Denileukin Diffitox)
Tolerogene oder dysfunktionale DC	DC-Blockade
Tolerierte Eigenantigene	Erhöhung der Stroma-Antigenfreisetzung Tumorantigen-„ <i>Priming</i> “
Suppressive Zytokine	Zytokin-Signaltransduktionsblockade

Für eine Tumorimmuntherapie müssen zunächst geeignete tumorspezifische immunogene Angriffspunkte identifiziert, eine ausreichend starke Immunreaktion hervorgerufen und Strategien entwickelt werden, um dem „*tumor immune escape*“ entgegen zu wirken. Speziell für das OvCA bieten sich Strategien an, die zum Ausschalten von T_{reg} oder zum Durchbrechen anderer Immuntoleranzmechanismen im Tumormilieu führen, sowie Strategien, die eine Verstärkung der Immunreaktion und die Aktivierung von infiltrierenden Immuneffektorzellen wie zytotoxischen T-Zellen („*cytotoxic T cells*“, CTL) oder NK-Zellen bewirken.

1.1.7 Die zelluläre Zusammensetzung des Ovarialkarzinoms

Ein Tumor ist ein heterogenes Gebilde, das nicht nur aus entarteten Zellen besteht. Neben den eigentlichen Tumorzellen bilden Fibroblasten, Endothelzellen, Myofibroblasten und infiltrierende Immuneffektoren das Tumorstroma. Zusammen mit Kollagenfasern und Proteoglycanen bilden diese Zellen eine Kapsel um den Tumor und bieten diesem damit einen Schutz vor Übergriffen des Wirtes (Hwu and Freedman, 2002). Zudem versorgen die Stromazellen den Tumor mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen.

Im Tumormikromilieu finden komplexe Interaktionen der malignen mit den nicht-malignen Zelltypen statt, was zum Tumorwachstum, zur Metastasierung und zur Angiogenese beiträgt (Mbeunkui and Johann, 2009; Witz, 2008). Man geht davon aus, dass das Tumormikromilieu infiltrierende

Immunzellen hin zu einem tumor-„freundlichen“ Phänotyp verändert (Lin and Pollard, 2004; Pollard, 2004). Eine Studie von Hagemann et al. zeigte, dass OvCA-Zellen den Phänotyp von Makrophagen *in vitro* verändern können (Hagemann et al., 2006). Dabei änderten sich sowohl das Zytokinexpressionsmuster als auch die Expression von Oberflächenrezeptoren auf den Makrophagen nach Co-Kultur mit OvCA-Zellen und sie ähnelten fortan dem Phänotyp, der *in vivo* in tumorassoziierten Makrophagen (TAM) gefunden wird.

Die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate hängt mit davon ab, welche Chemokine im Tumor sezerniert und in die Lymph- bzw. Blutbahn abgegeben werden. Im OvCA wurde u.a. MCP-1 nachgewiesen, das chemotaktisch auf T-Zellen und Monozyten/Makrophagen wirkt (Negus et al., 1995). Daher wurden im OvCA überwiegend Monozyten/Makrophagen und T-Zellinfiltrate nachgewiesen (Dietl et al., 1993; Kabawat et al., 1983). NK-Zellen und Mastzellen sind weit weniger häufig, B-Zellen sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten sind nur vereinzelt oder gar nicht zu finden (Tab.4: Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate im OvCA). CD68⁺-Makrophagen sind im Tumor vorwiegend in nekrotischen Bereichen lokalisiert, während Lymphozyten im Stroma aggregieren oder einzeln, assoziiert mit Tumorzellen vorliegen (Negus et al., 1997).

Tab. 4: Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate im OvCA. (Quelle: Negus et al., 1997).

Zelltyp	Median	Anzahl im Tumor
CD3 ⁺ -T-Zellen	2200	50-40.300
CD8 ⁺ -T-Zellen	2800	0-18.200
CD45RO ⁺ -Zellen	2900	200-43.200
CD68 ⁺ -Zellen	3700	600-15.200
Mastzellen	200	0-1600
NK-Zellen	100	0-1000
B-Zellen	0	0-2900

Im Tumor, wie auch im Peritoneum, überwiegt ein immunsuppressives Umfeld. CD14⁺DR⁻-myeloide Immunzellen sezernieren IL-10 und TGF- β , was *in vitro* zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation führt (Ioannides et al., 1991a; Ioannides et al., 1991b; Loercher et al., 1999; Melichar et al., 2001). Auch die häufig im OvCA vorkommenden T_{reg} tragen durch Sekretion von TGF- β sowie durch Generierung von extrazellulärem Adenosin zum immuninhibitorischen Mikromilieu des Tumors bei (Dietl et al., 2007; Woo et al., 2001). Neben zytotoxischen T-Zellen und T_{reg} sind auch naive T-Zellen mit CD45RO-Phänotyp im OvCA zu finden.

Antigenpräsentierende Zellen im OvCA haben häufig einen unreifen Phänotyp (Melichar et al., 1998). TAM infiltrieren fast jeden soliden Tumor. Sie werden durch Chemokine angelockt, die von Tumorzellen oder vom Tumorstroma produziert werden. TAM selbst produzieren Wachstums- und Angiogenesefaktoren (z.B. TNF- α) sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche die Metastasierung erleichtern, und tragen so zur Tumorprogression bei (Mantovani et al., 1992; Naylor et al., 1993; Negus et al., 1997; Orre and Rogers, 1999; Robinson-Smith et al., 2007; Wu et al., 1992). Monozyten bzw. Makrophagen, die aus dem Blut bzw. aus Aszites von OvCA-Patientinnen isoliert

wurden, haben im Vergleich zu gesunden Donoren eine veränderte Morphologie und keine anti-tumorigene Funktion mehr. Beispielsweise können die OvCA-Monozyten/Makrophagen keine Fc γ R-vermittelte Zytotoxizität mehr bewirken und keine Phagozytose betreiben, weiterhin aber Zytokine produzieren (Gordon and Freedman, 2006). Auch Dendritische Zellen (DC) finden sich im Tumor, v.a. aber im Aszites von OvCA-Patientinnen. Sie zeichnen sich durch einen unreifen Phänotyp sowie gestörte Antigenpräsentation aus und exprimieren keine co-stimulatorischen Moleküle (Allavena et al., 2000; Hwu and Freedman, 2002). Damit ist es ihnen nicht möglich potente anti-tumorale Immunantworten zu induzieren.

Immunzellen tragen im Tumorstroma wesentlich zur Progression und Metastasierung etablierter Tumore bei. Um dieses Paradoxon zu verstehen, muss man die komplexe Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und Etablierung von Tumoren genauer betrachten.

1.2 Die wechselseitige Beziehung von Tumor und Immunsystem

1.2.1 Das Immunsystem als Tumorinitiator

Das Immunsystem vermittelt zwei gegensätzliche Funktionen bei der Progression von Tumoren. Zum einen schützt das Immunsystem den Organismus vor der Entstehung von Tumoren, indem es veränderte körpereigene Zellen erkennt und eliminiert. Zum anderen moduliert es durch Selektion von sogenannten „*tumor escape*“-Varianten den Phänotyp progredienter Tumore. Schließlich kann durch fehlregulierte Immunreaktionen das Immunsystem sogar selbst Auslöser für eine maligne Transformation werden.

Schon vor über 100 Jahren wurde eine Assoziation zwischen Entzündung und Tumorentstehung hergestellt (Balkwill and Mantovani, 2001; Philip et al., 2004; Zou, 2005; Bruns, 1887/88; Fehleisen, 1882). Chronische Entzündungen können nicht nur ein tumorfreundliches Milieu schaffen, sondern können auch Ursache für die Entstehung von Tumoren sein, was beispielsweise beim Prostatakrebs (Prostata-CA), beim Lungenkrebs und bei gastrointestinalen Tumoren der Fall sein kann (de Visser et al., 2006; Huang et al., 2002; Melichar et al., 2003). Daneben wurde aber auch beobachtet, dass akute Entzündungen zum Tumorrückgang führen können, so dass die ambivalente Rolle inflammatorischer Prozesse im Tumorgeschehen bereits im 19. Jahrhundert erkannt wurde.

1.2.2 Die Selektion von „*tumor escape*“-Varianten durch das Immunsystem

Die weithin akzeptierte Hypothese des „*immunoediting*“ von Dunn et al. beschreibt den Einfluss des Immunsystems auf die Entstehung von immunresistenten Tumoren. Im Tumoranfangsstadium eliminieren Immunzellen immunogene Tumorzellen. Dadurch findet eine aktive Selektion auf

Tumorzellen mit geringer Immunogenität statt, die vom Immunsystem nicht erkannt werden. Nach einer Phase des Equilibriums, in der sich Tumoreliminierung und Tumorevasion die Waage halten, dominieren die schwach immunogenen Tumorzellen über die Immunmechanismen und „entwischen“ letztendlich dem Immunsystem (Abb. 6: Tumormunooediting nach Dunn et al., 2002) (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004a, b).

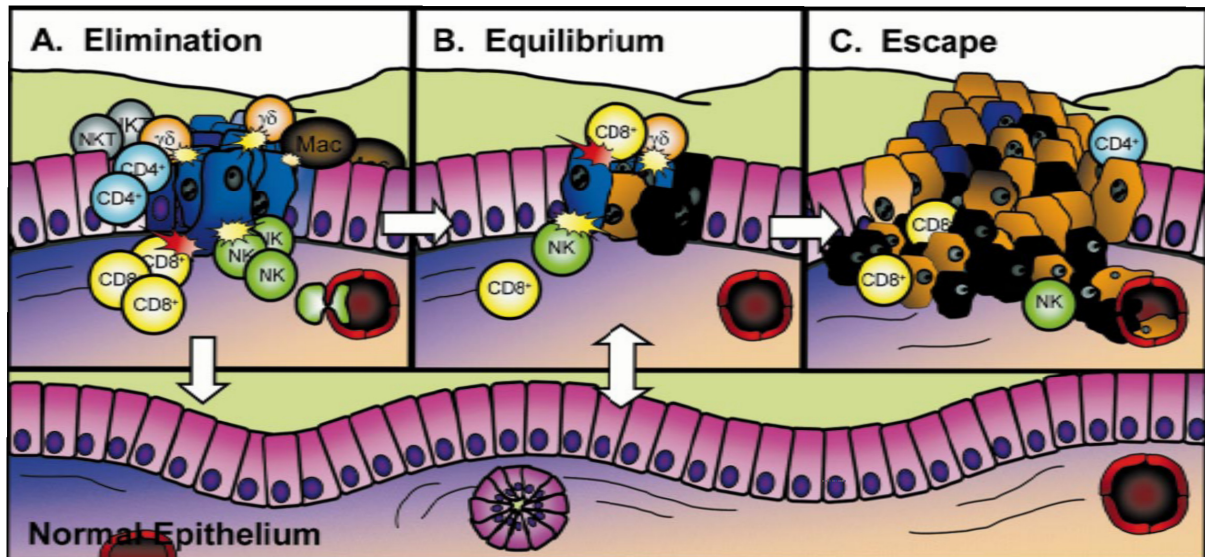


Abb. 6: Tumormunooediting nach Dunn et al., 2002. In der Anfangsphase des Tumorwachstums überwiegt die Eliminierung der transformierten Zellen durch das Immunsystems (A). Dabei werden jedoch Tumorzellen selektioniert, die weniger immunogen sind und daher vom Immunsystem übersehen werden. In dieser Phase des Equilibriums gleichen sich Tumorwachstum und –eliminierung aus (B). Im fortgeschrittenen Stadium können sich die selektionierten, wenig immunogenen Tumorzellen vermehren und dem Immunsystem entwischen (C) (Dunn et al., 2002).

Der so entstandene Tumor aus überwiegend wenig immunogenen Tumorzellen wird vom Immunsystem nicht mehr erkannt und von ihm toleriert. Das Immunsystem verliert demnach im Lauf der Tumorentwicklung seine eliminierende Wirkung und kann von einem zunächst wachstumshemmenden zu einem nunmehr wachstumsfördernden Faktor für den Tumor werden.

1.2.3 „Tumor immune escape“-Mechanismen und Tumortoleranz

Tumore haben verschiedenste „immune escape“-Mechanismen entwickelt, um der Überwachung des Immunsystems zu entkommen. Diese Mechanismen beruhen auf der Induktion immunologischer Toleranz oder der Inhibition von Immuneffektorzellen und schließen sowohl lösliche Faktoren als auch direkte Zellkontakte ein.

Das immunsuppressive Milieu im Tumor wird durch die Sekretion von inhibitorischen Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β aufrechterhalten. Sezerniert werden diese Zytokine sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von den Stromazellen. Das immunsuppressive Umfeld führt zu einer Veränderung des

Phänotyps von antigenpräsentierenden Zellen („antigen-presenting cells“, APC). Diese liegen im Tumormilieu als dysfunktionale und unreife Makrophagen und DCs vor und sind unfähig, infiltrierenden Effektorzellen geeignete Aktivierungssignale zu vermitteln. Fehlen diese co-stimulatorischen Signale, werden T-Zellen trotz Antigenpezifität nicht aktiviert. Im Gegenteil: durch den unreifen Zustand der APC induzieren diese sogar die Toleranz der T-Zellen gegenüber den Tumorzellen.

Regulatorische T-Zellen sind Mediatoren von Toleranz und Immunsuppression. Sie wandern durch einen Chemokingradienten in den Tumor ein (Zou, 2005). Über lösliche Moleküle (z.B. IL-10, TGF- β) und inhibitorische Liganden (z.B. CTLA-4) unterdrücken sie Immunreaktionen. Gerade im OvCA treten T_{reg} häufig in Erscheinung und gehen einher mit einer schlechten Prognose (Dietl et al., 2007).

Immuneffektorzellen, insbesondere zytotoxische $CD8^+$ -T-Lymphozyten und NK-Zellen sind von großer Bedeutung bei der Überwachung und Eliminierung von Tumoren (Pardoll, 2001; Yee and Greenberg, 2002; Zhang et al., 2003). Tumorzellen haben jedoch Wege gefunden, der zellvermittelten Toxizität zu entgehen. Neben den oben genannten Effekten, vermittelt durch das Tumorstroma, gibt es auch direkte Mechanismen wie die Herunterregulation von co-stimulatorischen Molekülen, von aktivierenden Liganden, von MHC-Molekülen oder von Antigenen von der Tumorzelloberfläche (Algarra et al., 2004; Jager et al., 2001) sowie die Freisetzung löslicher und blockierender Liganden wie beispielsweise lösliches („soluble“) MIC-A (sMIC-A) oder löslicher Fas-Ligand (sFasL) (French and Tschopp, 2002; Salih et al., 2006).

Im Tumor zeichnet sich daher ein Bild eines weit gestrickten, immunsuppressiven Netzwerkes aus inhibitorischen löslichen und membranständigen Faktoren ab (Abb. 7: Immunsuppressives Netzwerk im Tumormikromilieu).

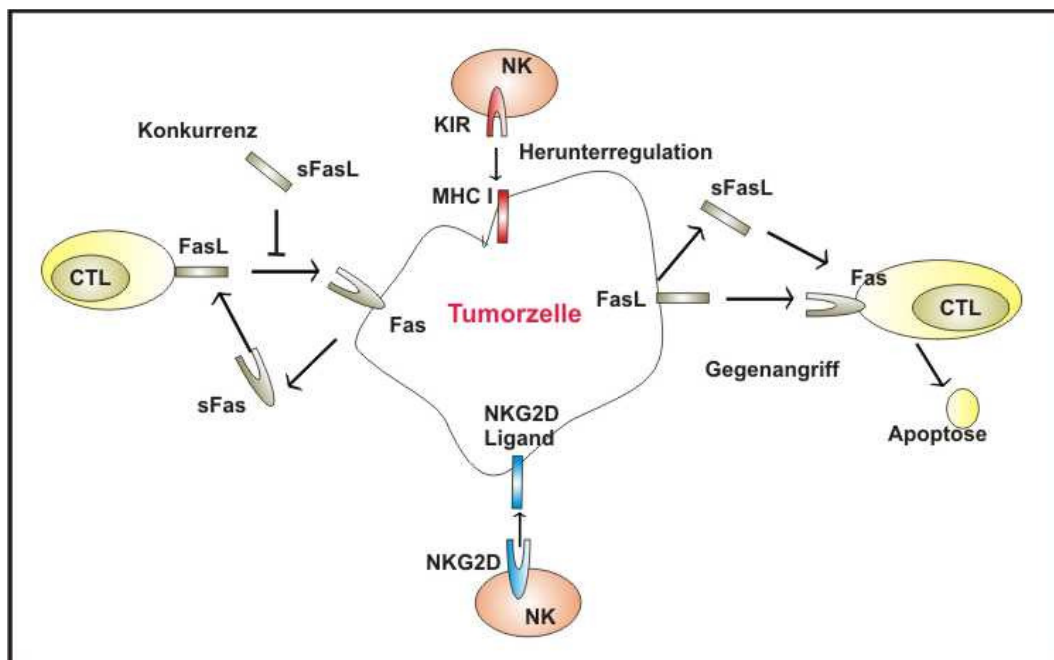


Abb. 7: Immunsuppressives Netzwerk im Tumormikromilieu. Über immunsuppressive membranständige und lösliche Faktoren (z.B. sFasL) sowie die Regulation von co-stimulatorischen Molekülen (z.B. MHC, NKG2D-Liganden) unterdrückt der Tumor zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen (adaptiert nach Kim et al., 2006).

Für eine effektive Anti-Tumorimmuntherapie muss dieses immunsuppressive Netzwerk im Tumor durchbrochen werden, damit die Effektorzellen - CTL und NK-Zellen – aktiviert werden können.

1.2.4 Die zytotoxischen Effektoren des Immunsystems

1.2.4.1 Zytotoxische T-Lymphozyten

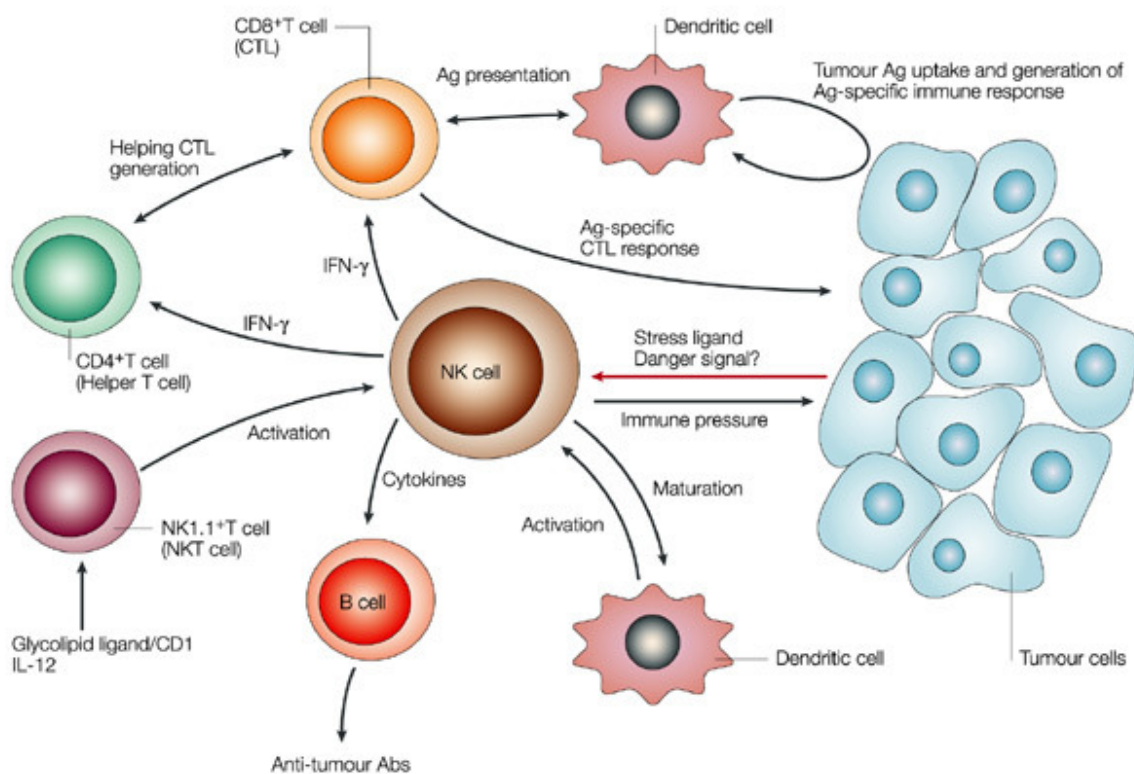
Die zytotoxischen T-Zellen („*cytotoxic T lymphocytes*“, CTL) sind Teil der CD8⁺-T-Zellfraktion und lysieren, nach antigenabhängiger Bindung, ihre Targetzellen (Yu and Fu, 2006). T-Zellen unterscheidet man neben ihrer Funktion nach der Art ihrer T-Zellrezeptorexpression (TCR) in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen. $\alpha\beta$ -T-Zellen exprimieren neben dem TCR CD4- oder CD8-Co-Rezeptoren, welche die Bindung an MHC-II bzw. MHC-I vermitteln. CD4⁺-T-Zellen haben im Tumorkontext eine Vermittlerrolle bei der Aktivierung von CTL, hauptsächlich über die Aktivierung von APC. Bevor CTL ihre Effektorfunktion ausüben können, müssen sie antigenspezifisch aktiviert werden. Dieses sogenannte „*priming*“ geschieht vornehmlich durch APC (Ridge et al., 1998) und erfolgt im Tumor überwiegend durch „*cross presentation*“ von tumorassoziierten Antigenen (TAA) (Spiotto et al., 2002; Yu et al., 2003).

CD4⁺-T-Zellen werden weiter in T_{H1}⁺, T_{H2}⁺ und T_{H17}-Zellen unterteilt. T_{H1}-Zellen, die anhand ihres vorwiegend durch IFN- γ -Sekretion charakterisierten Zytokinprofils bestimmt werden, induzieren eine zelluläre Immunität, während IL-4- und IL-5-sezernierende T_{H2}-Zellen eine humorale Immunität induzieren. T_{H17}-Zellen zeichnen sich durch die Sekretion von IL-17, IL-17F, IL-22 und CCL-20 aus und spielen eine Rolle bei der bakteriellen Infektabwehr. Außerdem scheinen sie an der Entstehung von allergischen Erkrankungen, wie Asthma, dem atopischen Ekzem und der Kontaktdermatitis beteiligt zu sein (Louten et al., 2009). Für die Tumorummunität ist vor allem die T_{H1}-Antwort wichtig (Aruga et al., 1997; Tsung et al., 1997), während eine T_{H2}-Antwort unter Umständen sogar tumorfördernd ist (Pellegrini et al., 1996).

T-Zellen, die spezifisch sind gegen TAA, können nicht nur im Tumor selbst, sondern auch im Blut und in Sentinellymphknoten nachgewiesen werden (Lee et al., 1999; Romero et al., 1998). Isoliert und expandiert man diese T-Zellen *ex vivo*, können diese sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* autologe Tumorzellen eliminieren (Curiel et al., 2003). Im Tumor selbst scheinen diese „*tumor infiltrating lymphocytes*“ (TIL) in einem dysfunktionalen Zustand vorzuliegen, was auf das immunsuppressive Milieu im Tumor zurückzuführen ist. Es ist auch bekannt, dass CD3 ζ , der signalweiterleitende Co-Rezeptor auf TILs und NK-Zellen, im Tumorkontext herunterreguliert wird (Finke et al., 1993; Nakagomi et al., 1993). Und obwohl CD8⁺-T-Zellen aus OvCA-Patientinnen einen aktivierten Phänotyp aufweisen, exprimieren sie (fast) keinen IL-2 α -Rezeptor (Woo et al., 2001), so dass sie kaum auf IL-2-abhängige Aktivierung reagieren.

1.2.4.2 Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sind der zweite Zelltypus neben den CTL, der Tumorzellen zytolysieren kann. Sie werden der angeborenen Immunität zugeordnet und machen bei Gesunden einen Anteil von 5-15% der Lymphozyten des humanen peripheren Blutes aus (Janeway, 5th Edition, 2005). Ihre Aufgabe ist die Lyse von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen (Ljunggren and Karre, 1985; Riccardi et al., 1980). Sie sind zudem über die Expression des Fc γ -Rezeptors CD16 an der antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität („antibody-dependent cellular cytotoxicity“, ADCC) beteiligt (Terunuma et al., 2008). Eine besonders wichtige Funktion nehmen sie durch die frühe Bereitstellung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ ein. Dies führt zur Aktivierung von adaptiven Immunkomponenten und initiiert eine T_{H1}-Antwort (Cooper et al., 2001; Martin-Fontecha et al., 2004; Rautet, 2004; Smyth et al., 2005). Durch den Aufbau eines komplexen Netzwerks, vermittelt über Zytokine und direkte Zellkontakte, stellen NK-Zellen ein wichtiges Verbindungsglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Ihre duale Rolle als Effektor und Vermittler ermöglicht ihnen, eine schnelle, effiziente und umfassende Immunantwort gegen transformierte oder infizierte Zellen zu initiieren (Abb. 8: NK-Zellen als Mediatoren der Anti-Tumorimmunität) (Smyth et al., 2002).

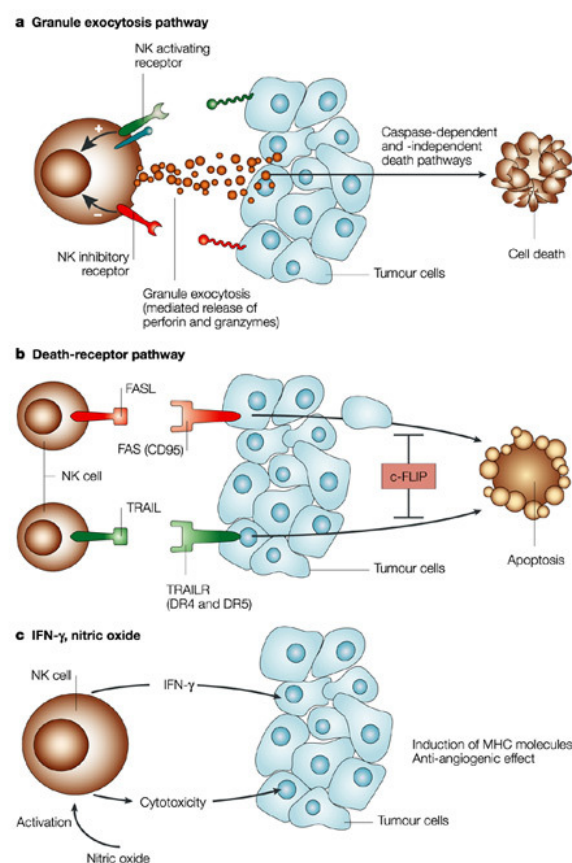


Nature Reviews | Cancer

Abb. 8: NK-Zellen als Mediatoren der Anti-Tumorimmunität. NK-Zellen regulieren über Zytokinsekretion die Aktivierung des adaptiven Immunsystems, welches so in die Anti-Tumorantwort eingebunden wird, und können selbst zytotoxisch wirken (Smyth et al., 2002).

Die Lyse durch Freisetzung zytolytischer Granula ist der Haupteffektormechanismus, den NK-Zellen gegen Tumorzellen und virusinfizierte Zellen einsetzen. Die Granula enthalten Perforin, das für die Aufnahme in die Zielzelle benötigt wird, und Granzyme, die durch ihre Proteaseaktivität Apoptose in der Zielzelle einleiten (Davis et al., 2001; Smyth et al., 1999; Smyth et al., 2000a, 2000b; Trapani et al., 2000; van den Broek et al., 1995).

Ein weiterer Effektormechanismus ist die Induktion der Apoptose über die „death receptors“ (DR) auf Tumorzellen. NK-Zellen exprimieren Fas-Ligand (FasL), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und „TNF-related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL), die alle der TNF-Familie angehören (Bradley et al., 1998; Screpanti et al., 2001). Nach Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor auf der Tumorzelle wird in dieser die Apoptose induziert. Die Expression von TRAIL ist IFN-abhängig reguliert (Typ I und II) und wird besonders nach Virusinfektionen induziert (Smyth et al., 2003). Die IFN- γ -Sekretion induziert auf Tumorzellen Fas/CD95, was sie anfällig für die FasL-vermittelte Lyse durch NK-Zellen macht (Abb. 9: Effektorfunktionsmechanismen von NK-Zellen) (Screpanti et al., 2001; Smyth et al., 2002). Unreife NK-Zellen vermitteln ihre Zytotoxizität über TRAIL, während reife NK-Zellen meistens über Fas-Aktivierung und Perforinfreisetzung lysieren (Zamai et al., 1998).



Nature Reviews | Cancer

Abb. 9: Effektorfunktionsmechanismen von NK-Zellen. NK-Zellen vermitteln ihre Zytotoxizität durch Freisetzung lytischer Granula (a), über die Aktivierung von Todesrezeptoren auf Tumorzellen (b) oder über lösliche Moleküle wie IFN- γ oder NO (c) (Smyth et al., 2002).

NK-Zellen werden nach ihrer CD56-Expressionsstärke in CD56^{dim}CD16⁺-NK-Zellen, die den Hauptanteil der NK-Zellen ausmachen, und eine kleinere Population CD56^{bright}CD16⁻-NK-Zellen unterteilt. CD56^{dim}CD16⁺-NK-Zellen bilden große Mengen an zytolytischen Granula, exprimieren KIR-Rezeptoren und sind zytotoxisch. Die CD56^{bright}CD16⁻-NK-Zellen sind kaum zytotoxisch, dafür sezernieren sie in hohem Maße Zytokine und sind damit v.a. für die Regulierung der Immunantwort verantwortlich (Cooper et al., 2001; Jacobs et al., 2001).

Die Funktion von NK-Zellen wird über Signale von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren reguliert (Tab. 5: Auswahl der wichtigsten aktivierenden und inhibitorischen NK-Zellrezeptoren). Aktivierende Rezeptoren führen zur Freisetzung der lytischen Granula sowie zur Zytokin- und Chemokinsekretion. Inhibitorische und aktivierende Signale können gleichzeitig in NK-Zellen eingehen. Die Art der Signale und deren Gewichtung in der Zelle bestimmen letztendlich, ob und wie stark die NK-Zelle aktiviert oder inhibiert wird (Abb. 10: Wechselwirkung von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen mit Liganden auf Tumorzellen) (Lanier, 2003; Tomasello et al., 2000). Die genauen zellulären Mechanismen sind jedoch nicht bekannt. Aktivierende Rezeptoren stehen unter der Kontrolle von inhibierenden HLA-I-spezifischen-Rezeptoren, um ungewollte Zellschäden zu verhindern (Moretta et al., 2001). In ihrer Funktion scheinen die Rezeptoren redundant zu sein, da bis jetzt noch kein Rezeptor identifiziert wurde, der zur Aktivierung von NK-Zellen unerlässlich ist (Long, 2002).

Zu den aktivierenden Rezeptoren gehören die „*natural cytotoxicity receptors*“ (NCR) NKp30, NKp44, NKp46 und NKp80, die für die spontane Zytotoxizität von NK-Zellen gegen Tumore *in vivo* verantwortlich sind (Moretta et al., 2001; Moretta et al., 2000). Über die Liganden von NKp44 und 46 auf der Tumorzelle ist noch nichts bekannt; AICL, der Ligand von NKp80, ist auf myeloiden Zellen exprimiert (Welte et al., 2006), „*nuclear factor HLA-B-associated transcript*“ 3 (BAT3), das als Ligand für NKp30 identifiziert wurde, wird u.a. von Tumorzellen sezerniert (Pogge von Strandmann et al., 2007).

Der „*natural killer group 2D*“ (NKG2D) Rezeptor ist einer der wichtigsten aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen, der auch auf CD8⁺-T, NKT- und $\gamma\delta$ -T-Zellen als Co-Aktivator exprimiert ist (Bauer et al., 1999). Seine Liganden MIC-A und -B sind nicht-klassische MHC-Moleküle und die „*UL-16 binding proteins*“ ULBP1-4, die nach Zellstress und viraler oder maligner Transformation von Zellen exprimiert werden. Im gesunden Gewebe sind MIC-A und -B nur auf dem Darmepithel exprimiert, vermutlich induziert durch die bakterielle Flora (Groh et al., 1996). Die Bindung von NKG2D-Liganden (NKG2D-L) an ihren Rezeptor führt zur Aktivierung des Adaptormoleküls DAP10. DAP10-Signaltransduktion führt letztendlich zu einer Perforin-abhängigen zytolytischen Reaktion der NK-Zelle. Barber et al. zeigten im Mausmodell, dass eine NKG2D-basierte Therapiestrategie gegen das OvCA zur Eliminierung bereits etablierter Tumore führen kann (Barber et al., 2008).

Tab. 5: Auswahl der wichtigsten aktivierenden und inhibitorischen NK-Zellrezeptoren.

Aktivierende	Zelluläre Expression	Ligand	Referenz Liganden
NK-Rezeptoren			
NKG2D	NK, $\gamma\delta$ -T, CD8 ⁺ -T, NKT	MIC-A, MIC-B ULBP1, 2, 3, 4	Groh et al., 1996 Bauer et al., 1999
NKp30	Ruhende und aktivierte NK	BAT 3	Pogge von Strandmann et al., 2007
NKp44	Aktivierte NK	Unbekannt	
NKp46	Ruhende und aktivierte NK	Unbekannt	
NKp80	Ruhende und aktivierte NK, T-Zellsubset	AICL	Welte et al., 2006
KIR2DS1, 2, 4	NK, T-Zellen	HLA-C	Kärre et al., 1986; Ljunggren & Kärre, 1985
NKG2C, E	NK, T-Zellen	HLA-E	
DNAM-1	NK, T-Zellen	PVR/CD155, Nectin-2/CD112	Bottino et al., 2003
CD16	NK, T-Zellen	IgG	Lanier et al., 1985
Inhibitorische			
NK- Rezeptoren			
KIR2DL1, 2	NK, T-Zellen	HLA-C	Kärre et al., 1986; Ljunggren & Kärre, 1985
KIR3DL3	NK, T-Zellen	HLA-A	
KIR3DL1	NK, T-Zellen	HLA-B	
KIR2DL4	NK, T-Zellen	HLA-G	
CD158	NK	HLA	
CD85i	NK, DC	HLA	Allan et al., 2000
CD94/NKG2A	NK, CTL	HLA-E	Kärre et al., 1986; Ljunggren & Kärre, 1985
NKG2C	NK, CTL	HLA-E	

NK-Zellen unterscheiden zwischen normalen Zellen und veränderten Zellen über deren MHC-I-Expressionsprofil. Dafür exprimieren sie „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIR), die die Bindung an MHC-I vermitteln. Durch die Interaktion von KIR mit MHC-I wird die zytotoxische Effektorfunktion dieser Rezeptoren verhindert (Liao et al., 1991; Lanier et al., 1998, 2008; Long et al., 2001; Kärre et al., 1986). Tumorzellen können durch Herunterregulation von MHC-I-Molekülen der CD8⁺-T-Zell-Immunität zwar entgehen, werden dadurch aber anfällig für die NK-Zell-Immunität (Koh, C.Y. et al., 2001). Über den „missing self“-Mechanismus werden Tumore, die keine oder veränderte MHC-Moleküle besitzen, erkannt. Schon der Verlust eines Allels von HLA-B oder -C reicht aus, um NK-Zellen zu de-inhibieren (Long et al., 2002). Die Expression der verschiedenen inhibitorischen Rezeptoren ist stochastisch unter den NK-Zell-Klonen verteilt, nicht jeder NK-Zell-Klon hat das gleiche

Repertoire an KIR. Jedoch hat jede NK-Zelle mindestens einen inhibitorischen Rezeptor für ein MHC-I-Molekül (Valiante et al., 1997).

CD94/NKG2A ist ein weiterer inhibitorischer NK-Rezeptor, dessen Ligand, HLA-E, ein nicht klassisches MHC-Molekül ist. *In vitro* wurde CD94/NKG2A eine Rolle bei der Inhibition der ADCC durch NK-Zellen gegen Tumorzelllinien zugeschrieben (LeDrean et al., 1998).

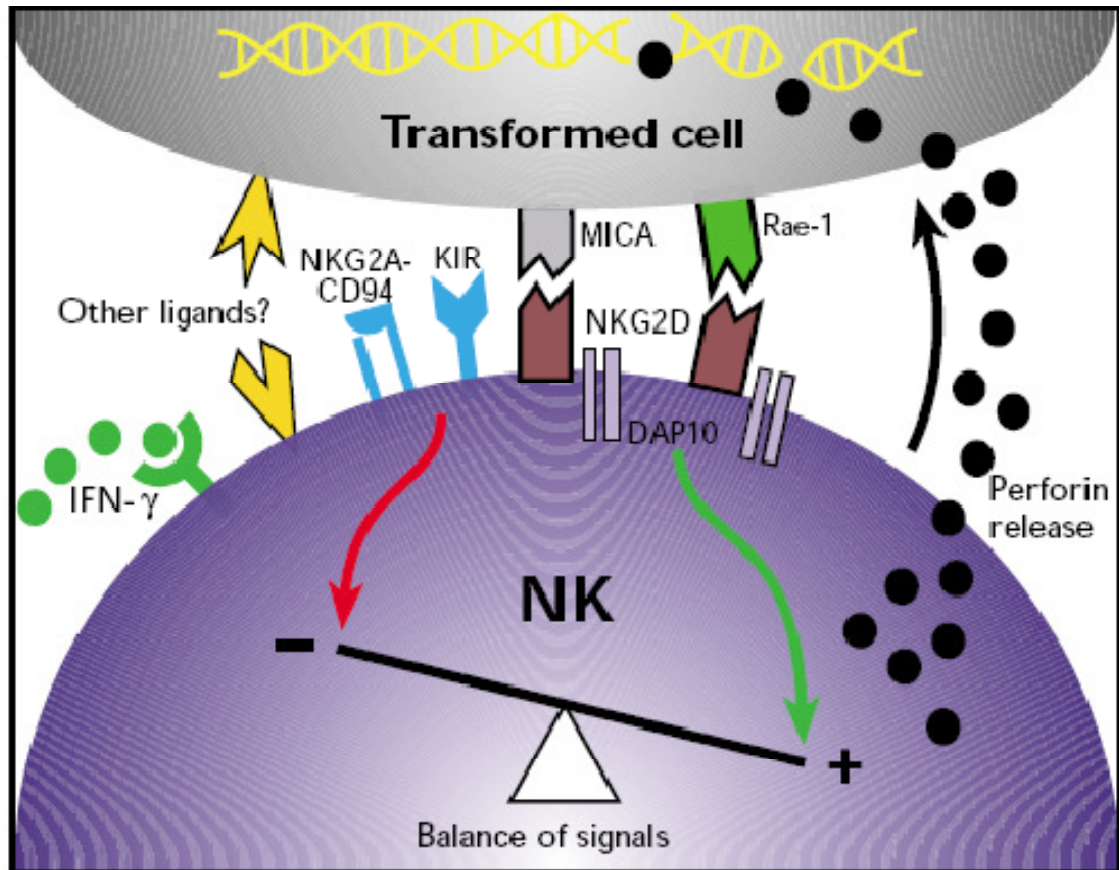


Abb. 10: Wechselwirkung von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen mit Liganden auf Tumorzellen. Nach Integration der Art und Anzahl der eingehenden Signale, wird die NK-Zelle aktiviert oder inhibiert (Smyth et al., 2001).

NK-Zellen nehmen eine besondere Rolle in der Tumormimmuntherapie ein, da sie Tumorzellen, im Gegensatz zu CTL, ohne vorherige Sensibilisierung für ein Antigen („*priming*“) eliminieren können (Robertson et al., 1990). Damit ermöglichen sie eine schnelle potentielle Immunantwort auf Infektionen oder (maligne) zelluläre Veränderungen. NK-Zellen sind daher v.a. zu Beginn der Tumorentstehung für die Eliminierung von Tumorzellen verantwortlich (Diefenbach et al., 2001; Cerwenka et al., 2001; Kelly et al., 2002) und stellen ideale Kandidaten für einen adoptiven Transfer v.a. bei hämatopoetischen Erkrankungen dar. Der Einsatz von NK-Zellen in der Tumorthherapie hat jedoch Einschränkungen: so ist die Aktivierung von NK-Zellen der kritische Punkt, der überwunden werden muss. Von anderen hämatopoetischen Zellen erhalten NK-Zellen starke Aktivierungssignale, nicht aber von anderen Zelltypen. Dazu kommt das immunsuppressive Milieu im Tumor, das eine Aktivierung der NK-Zellen erschwert. Ein weiterer Nachteil für die Tumormimmuntherapie ist, dass NK-Zellen spezielle „*homing*“-Signale benötigen, um ins Gewebe einzuwandern (Salazar-Mather et al.,

2000). Das ist ein Grund dafür, dass im Vergleich zu T-Lymphozyten weniger NK-Zellen im Tumor zu finden sind (Negus et al., 1997).

Überwindet man diese zwei Schwachpunkte, kann eine NK-Zell-basierte Tumorthherapie eine effiziente Methode sein, um Tumore zu eliminieren.

1.3 GDF-15, ein atypisches Mitglied der TGF- β -Superfamilie

1.3.1 Die TGF- β -Superfamilie

Die humane TGF- β -Superfamilie besteht aus mehr als 40 Proteinen, die ein breites Spektrum an biologischen Funktionen vermitteln. Charakteristisch für Mitglieder der TGF- β -Superfamilie und Eingliederungsmerkmal ist ein Cysteinknoten in der Proteinsekundärstruktur (verdeutlicht durch die roten Linien in Abb. 11: Proteinstruktur eines repräsentativen TGF- β -Superfamilienmitglieds) (Massague, 1987; Shi and Massague, 2003; Vitt et al., 2001). Dieser Cysteinknoten im C-terminalen Teil besteht aus sieben Cysteindomänen, die eine knotenähnliche Struktur bilden und in der Sekundär- und Tertiärstruktur ein stabiles Dimer formen.

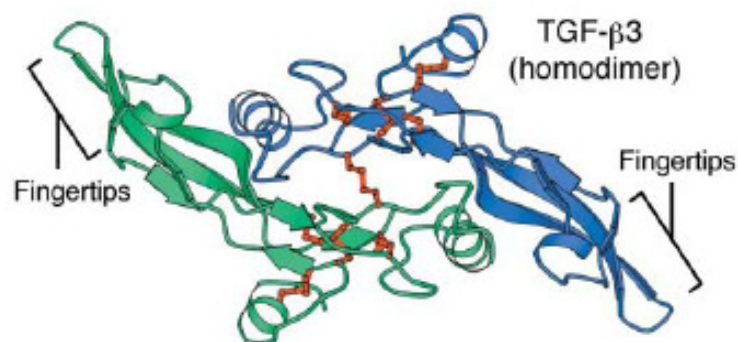


Abb. 11: Proteinstruktur eines repräsentativen TGF- β -Superfamilienmitglieds. Die roten Linien repräsentieren die Cysteinseitenketten, die charakteristisch für die TGF- β -Superfamilie sind, blau bzw. grün ist je ein Monomer des hier dargestellten Dimers markiert (Shi and Massague, 2003).

Die Superfamilie lässt sich in mehrere Unterfamilien einteilen: die „transforming growth factor“- β (TGF- β), die Activin/Inhibin, die „bone morphogenetic protein“ (BMP), die „growth and differentiation factor“ (GDF), die Nodal, die Myostatin, die „mullerian inhibiting substance“ (MIS) und die „lymphocyte inhibiting factor“ (LIF) -Unterfamilie (Chen et al., 2006). In Tab. 6 sind die Mitglieder der wichtigsten TGF- β -Unterfamilien aufgeführt:

Tab. 6: Mitglieder der wichtigsten TGF- β -Unterfamilien.

Unterfamilie			
TGF- β	BMP	GDF	Activin/Inhibin
TGF- β 1,2,3,4,5	BMP2,4,5,6,10	GDF-1,-3,-9	Activin-A,-B,-AB,-C,-E
	BMP3/Osteogenin	GDF-11/BMP11	Inhibin-A,-B,-C
	BMP3b/GDF10	GDF-7/BMP12	
	BMP7/OP-1	GDF-6/BMP13	
	BMP8a/OP-2	GDF-5/BMP14	
	BMP8b/OP-3	GDF-9b/BMP15	
	BMP16/Nodal	GDF-8/Myostatin	
		GDF-15/MIC-1	

TGF- β -Mitglieder sind an fast allen physiologischen Prozessen beteiligt und verantwortlich für den Erhalt der Zellhomöostase. Sie regulieren die Zellproliferation und -differenzierung, kontrollieren die Embryonalentwicklung und die Wundheilung, sie vermitteln Zelladhäsion und -migration, tragen zur Ausbildung der Extrazellulären Matrix („*extracellular matrix*“, ECM) bei und können Apoptose induzieren (Kingsley, 1994). Die Wirkung dieser Zytokin- und Wachstumsfaktorenfamilie ist zelltypspezifisch, so dass letztendlich die Art und das Entwicklungsstadium einer Zelle ausschlaggebend dafür sind, welche Wirkung das Zytokin vermittelt (Massague, 2000; Siegel and Massague, 2003). Letterio & Roberts zitieren die Funktion von TGF- β mit den Worten von M. B. Sporn: „*The function of TGF- β ...is not to have an intrinsic action, but to serve as a mechanism for coupling a cell to its environment, so that the cell has the plasticity to respond appropriately to changes in its environment or changes in its own state*“ (Letterio and Roberts, 1998; Sporn and Roberts, 1990).

1.3.2 TGF- β

TGF- β ist das Prototypzytokin, nach dem die TGF- β -Superfamilie benannt ist. Praktisch jede Körperzelle trägt Rezeptoren für TGF- β (Massague, 1992, 1996). TGF- β wird in bis zu zwölf Isoformen exprimiert, wobei TGF- β 1 und 2 die häufigsten und am besten charakterisierten Isoformen sind. TGF- β wird als Prä-Proprotein gebildet, das eine Reihe von Prozessierungsschritten im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat durchlaufen muss, bei denen Furin-ähnliche Proteasen eine Schlüsselrolle spielen. Der aktive C-Terminus des Vorläuferproteins bindet dann über Disulfidbrücken zunächst an ein N-terminales Fragment („*latency associated peptide*“, LAP), das anschließend über Disulfidbrückenaustausch die Bindung an eines von drei „*latent TGF- β binding proteins*“ (LTBP-1, -3 und -4) vermittelt. Dieser „*large latent complex*“ scheint für die korrekte Faltung von TGF- β sowie für die Sekretion und Bindung an die ECM essentiell zu sein. Nach Abspaltung

durch Proteasen oder Dissoziation des LAP und des LTBP binden dann zwei TGF- β -Moleküle in ihrer aktiven Form an den TGF- β -Rezeptor III (TGF- β RIII), der somit die Bildung von Homodimeren unterstützt, die anschließend den TGF- β -Rezeptor II (TGF- β RII) aktivieren können. Dieser rekrutiert und phosphoryliert nach Aktivierung durch TGF- β den TGF- β RI, der dann selbst eine Signalkaskade in Gang setzt, vorwiegend über die Phosphorylierung und damit einhergehende Aktivierung von SMAD-Proteinen (Derynck et al., 1996; Massague, 1996, 2000) (Abb. 12: Signaltransduktion von TGF- β über SMAD).

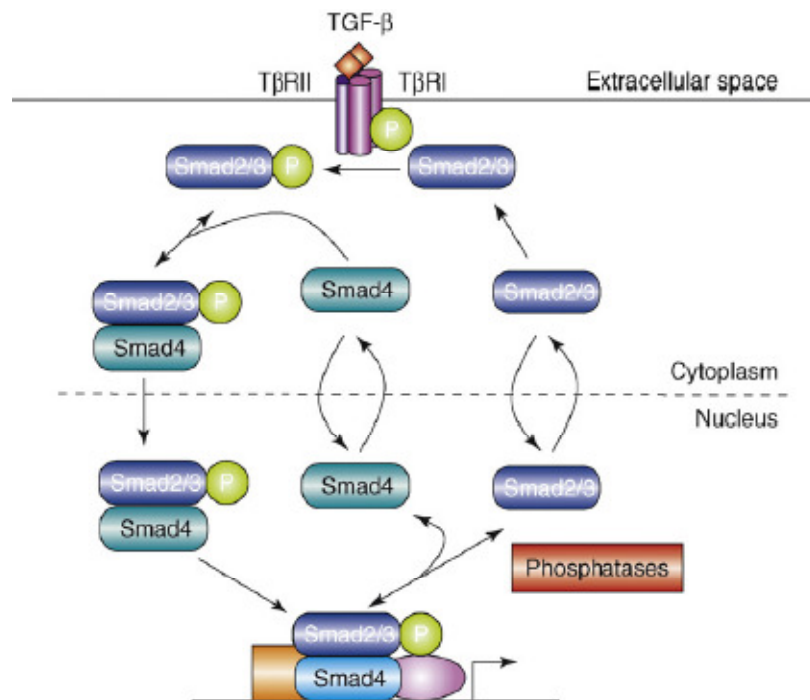


Abb. 12: Signaltransduktion von TGF- β über SMAD. TGF- β bindet an den TGF- β RII, dieser aktiviert den TGF- β RI, welcher wiederum eine Signaltransduktionskaskade über die Phosphorylierung von SMAD-Proteinen initiiert. Der SMAD/Transkriptionsfaktor-Komplex bindet im Nucleus an TGF- β -Zielgene und aktiviert/inhibiert deren Transkription (Clarke and Liu, 2008).

Die Rezeptor-SMAD-Proteine (R-SMAD) SMAD2 und SMAD3 werden vom TGF- β RI phosphoryliert, was die Bindungsaffinität zum Co-SMAD SMAD4 erhöht. So komplexiert und wandert der SMAD-Komplex in den Kern. Hier findet eine Assoziation mit p300 und CBP statt, die als transkriptionelle Co-Aktivatoren die Bindung an die DNA von Zielgenen verstärken (Massague, 2000; Shi and Massague, 2003). Alternativ kann der SMAD-Komplex auch die Transkriptionsinhibitoren Ski und SnoN binden, was zu einer Inhibition der TGF- β -Zielgene führt. Die Art der TGF- β -vermittelten Transkriptionsaktivität bzw. -hemmung ist zelltypspezifisch und hängt vom Vorhandensein der jeweiligen Transkriptionsaktivatoren bzw. -repressoren ab. Wenn vorhanden, kann Betaglycan, der TGF- β RIII, die Bindung von TGF- β an TGF- β RII vermitteln. Reguliert wird die TGF- β -Signaltransduktion von den inhibitorischen SMAD-Proteinen (I-SMAD) SMAD6 und SMAD7, die die Phosphorylierung der Co-SMAD verhindern (Massague, 1996; Massague et al., 2000; Massague and Chen, 2000; Shi and Massague, 2003).

Alternativ können TGF- β -Signale über eine Aktivierung von JNK, p38, PI3K/AKT und ERK laufen (Abb. 13: Alternative Signaltransduktion von TGF- β) (Derynck and Zhang, 2003; Engel et al., 1999; Hanafusa et al., 1999; Massague, 2000).

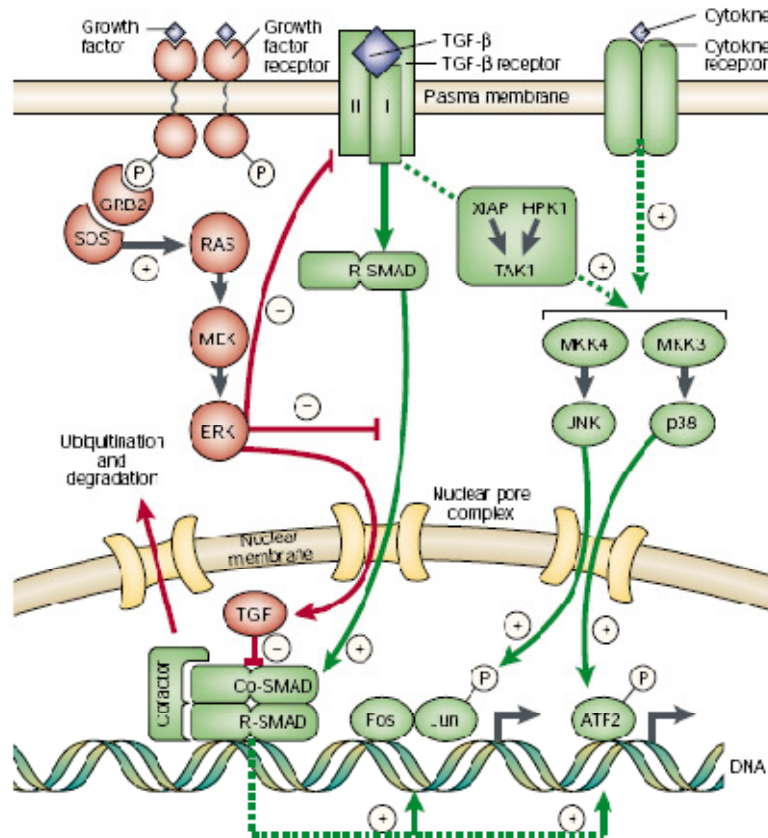


Abb. 13: Alternative Signaltransduktion von TGF- β . Zelltypabhängig kann TGF- β auch unabhängig von SMAD über andere Signalwege wie den JNK- oder den p38/MAPK-Signalweg agieren (Massague, 2000).

Fast alle Säugerzellen exprimieren TGF- β -Rezeptoren und sind damit empfänglich für die TGF- β -vermittelten Effekte, die abhängig vom Kontext, dem Zelltyp und dem Entwicklungsstadium sind. Obwohl der Name einen positiven Effekt auf die Wachstumseigenschaft von Zellen vermuten lässt, ist TGF- β ein starker Wachstumsinhibitor für Fibroblasten, epitheliale, endotheliale und hämatopoetische Zellen. Als Wachstumsregulator nimmt es damit eine Schlüsselrolle beim Erhalt der Zellhomöostase ein und beeinflusst die Wechselwirkung zwischen den Zellen und ihrer Umgebung. TGF- β ist zudem das am stärksten inhibierende, anti-inflammatorische Zytokin überhaupt und damit ein wichtiger Immunmodulator (Frolik et al., 1983; Siegel and Massague, 2003). Abb. 14 verdeutlicht die Funktion von TGF- β in verschiedenen Zellen und Geweben. Wie wichtig TGF- β in der Entwicklung und Zellhomöostase ist, zeigen Experimente an TGF- β -„knock out“ (k.o.)-Mäusen: diese leiden an einer deregulierten, überschießenden Entzündungsreaktion, die zum frühen Tod der Mäuse führt (Kulkarni et al., 1993).

Im Tumor wird die immunmodulatorische Funktion von TGF- β missbraucht: die Sekretion von TGF- β durch Tumor- und Stromazellen schafft ein immunsuppressives Milieu, was die Tumoreliminierung durch das Immunsystem zum Erliegen bringt.

TGF- β ist ein pleiotropes Zytokin mit sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Wirkung. Wie TGF- β autokrin auf Tumorzellen wirkt, hängt, neben dem Tumormikromilieu, auch hier von der Tumorart und dem Tumorstadium ab (Elliott and Blobe, 2005).

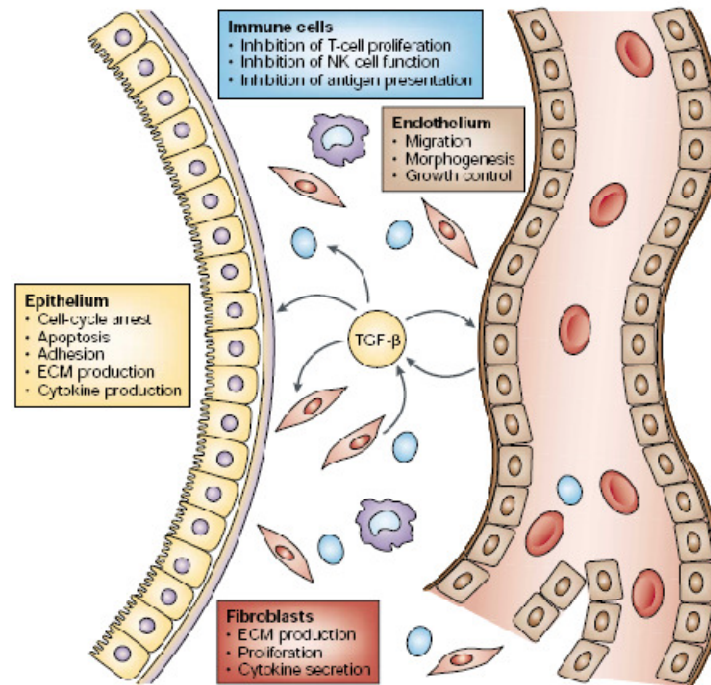


Abb. 14: Die Funktion von TGF- β in verschiedenen Zellen und Geweben. TGF- β inhibiert Immunzellen, reguliert das Endothelwachstum und die Fibroblastenproliferation, blockiert den epithelialen Zellzyklus und induziert Apoptose (Siegel and Massague, 2003).

1.3.3 Die Rolle von TGF- β -Familienmitgliedern im Ovarialkarzinom

1.3.3.1 TGF- β im Ovarialkarzinom

In den Anfangsstadien der Tumorgenese wirkt TGF- β als Tumorsuppressor. TGF- β -Rezeptoren werden im gesunden Ovar exprimiert, was auf eine anfängliche Sensitivität für die TGF- β -vermittelte Wachstumsinhibition schließen lässt (Jakowlew et al., 1997; Lynch et al., 1998). Es inhibiert die Proliferation von gesunden Ovariepithezellen und von primären OvCA-Zellen *in vitro* (Havrilesky et al., 1995). Doch während die Proliferation frisch isolierter Primärzellen aus gesunden Ovarien und einzelnen OvCA durch TGF- β um bis zu 95% gehemmt wird, sind OvCA-Zelllinien und die Mehrzahl der aus OvCA gewonnenen Primärkulturen resistent gegenüber der TGF- β -vermittelten Proliferationsinhibition (Berchuck et al., 1990b; Berchuck et al., 1992). Der Verlust des autokrinen inhibitorischen Signalwegs dürfte dabei die Progression TGF- β -positiver Tumore erheblich erleichtern. Als Mechanismen, die zur TGF- β -Resistenz im OvCA führen, werden Mutationen in Komponenten des TGF- β -Signalwegs sowie der Verlust der TGF- β -Rezeptorexpression beschrieben (Kadin et al., 1994)

(Abb. 15: Die Funktion von TGF- β im Tumorprogress) (Pardali and Moustakas, 2007). Insgesamt sind mehr als 75% der OvCA, insbesondere rezidierte Tumoren, TGF- β resistent (Hu et al., 2000; Yamada et al., 1999). Für das OvCA wurden Mutationen der TGF- β -Rezeptoren I und II sowie der Signaltransduktionskomponenten SMAD2 und SMAD4 beschrieben (Cardillo et al., 1997; Chen et al., 2001; Lynch et al., 1998; Schutte et al., 1996; Wang et al., 2000a, 2000b). 25% der OvCA weisen einen veränderten TGF- β RII auf (Lynch et al., 1998), während TGF- β RI in 33% der OvCA mutiert oder deletiert ist (Chen et al., 2001; Wang et al., 2000a, 2000b). Es wurde weiterhin beschrieben, dass Betaglycan – der TGF- β -Rezeptor III – in einem Großteil der untersuchten OvCA durch epigenetische Veränderungen herunterreguliert ist (Hempel et al., 2007). Das an der TGF- β -Signaltransduktion beteiligte Protein km23 ist ebenfalls bei 42% der OvCA mutiert (Ding et al., 2005).

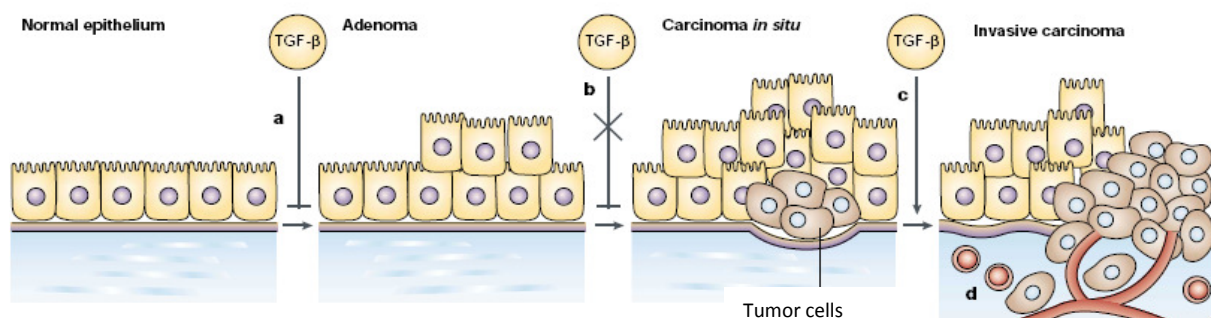


Abb. 15: Die Funktion von TGF- β im Tumorprogress. Normale Epithelien und Tumore im Frühstadium reagieren mit Wachstumsarrest auf TGF- β (a). Im Laufe der Tumorprogression geht die TGF- β -vermittelte Wachstumsinhibition aufgrund von Mutationen im Signalweg verloren (b). In späten Tumorstadien fördert TGF- β das Tumorwachstum (c) und ermöglicht die Tumorausbreitung (d) (Siegel and Massague, 2003).

Durch den Verlust der TGF- β -Responsivität gewinnt der Tumor einen entscheidenden Vorteil gegenüber den Abwehrmechanismen des Körpers: er kann sich der Immunüberwachung entziehen und ungehindert proliferieren, während andere Zellen wie die Immuneffektorzellen, sensitiv für die TGF- β -vermittelte Inhibition bleiben. So ist es nicht verwunderlich, dass viele Tumore TGF- β sezernieren (Tab. 7: Tumore mit erhöhtem TGF- β -Spiegel).

Tab. 7: Tumore mit erhöhtem TGF- β -Spiegel (adaptiert nach Teicher, 2007).

Tumortyp	
Gliom	Ovarialkarzinom
Nierenzellkarzinom	Brustkrebs
Melanom	Cervixkarzinom
Pankreaskrebs	Blasenkarzinom
Multiples Myelom	Prostatakrebs
Colorektalkarzinom	

In einer Studie von Bartlett et al. waren TGF- β 1 in 44%, TGF- β 2 und 3 in je 66% der untersuchten OvCA exprimiert (Bartlett et al., 1997). Eine Hauptquelle für TGF- β im OvCA sind die infiltrierenden T_{reg} (Woo et al., 2001), Makrophagen und Thrombozyten, aber auch die Tumorzellen selbst (Kehrl et al., 1986). Das durch TGF- β erzeugte immunsuppressive Tumormilieu induziert einen negativ regulierenden Kreislauf auf die infiltrierenden Immunzellen des Tumorstromas. TGF- β inhibiert die Reifung von Makrophagen und DCs und unterbindet damit ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen. Unreife DCs wiederum produzieren selbst große Mengen an TGF- β , was die Generierung von T_{reg} bewirkt. T_{reg} im OvCA korrelieren wiederum mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf (Curiel et al., 2004). TGF- β induziert zusätzlich Apoptose in aktivierten CD8⁺-T-Zellen und DCs (Cumont et al., 2007; Ito et al., 2006), verhindert die Freisetzung zytotoxischer Granula und inhibiert die Expression von zytotoxischen Mediatoren wie Perforin (Li et al., 2006). Auch die IFN- γ Sekretion wird durch TGF- β unterbunden und damit die MHC-Expression in DCs und Tumorzellen unterdrückt. Gleichzeitig induziert TGF- β die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_{H17} anstelle von T_{H1}-Zellen (Liu et al., 2007). Durch diese vielfältigen Effekte wird das Immunsystem im Tumor lahmgelegt.

Nicht nur durch Immunsuppression im Tumormikromilieu trägt TGF- β zur Tumorprogression bei, es ist auch selbst wesentlich an der OvCA-Genese beteiligt, indem es den Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp begünstigt (Derynck et al., 2001; Do et al., 2008). In späten Tumorstadien initiiert TGF- β dann die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen (MMP), die die Invasion und die Metastasierung von Tumorzellen erleichtern und die Angiogenese fördern (Abb. 16: Die Rolle von TGF- β in Tumoren) (Bierie and Moses, 2006a and 2006b; Do et al., 2008).

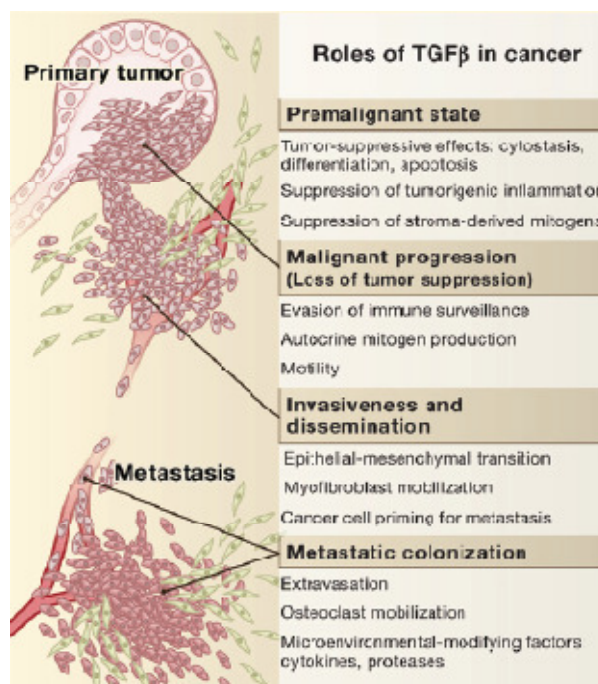


Abb. 16: Die Rolle von TGF- β in Tumoren. TGF- β entfaltet sich während der Tumorprogression von einem Tumorsuppressor zu einem Tumorpromotor, der malignes Wachstum, Invasion und Metastasierung steuert (Massague, 2008).

1.3.3.2 Weitere TGF- β -Familienmitglieder im Ovarialkarzinom

Inhibin und Activin sind in den Gonaden exprimierte Mitglieder der TGF- β -Superfamilie und gehören der Inhibin/Activin-Untergruppe an. Inhibin dimerisiert zu Inhibin A (α und β A-Untereinheiten) oder zu Inhibin B (α und β B-Untereinheiten). Activin tritt als Heterodimer oder Homodimer der β -Untereinheiten von Inhibin auf (Activin A, B oder AB). Inhibin/Activin ist im gesunden wie im malignen Ovar exprimiert (Choi et al., 2001a; Choi et al., 2001b; Di Simone et al., 1996). Im physiologischen Kontext haben Inhibin/Activin eine Funktion bei der Follikelgenese sowie bei der Produktion vom „*follicle-stimulating hormone*“ (FSH). Dabei wirkt Inhibin inhibitorisch, während Activin die Wirkung von Inhibin antagonisiert und als pluripotenter Wachstums- und Differenzierungsfaktor in Erscheinung tritt (Billestrup et al., 1990).

Im serösen und muzinösen OvCA ist Activin stärker exprimiert als Inhibin, welches vornehmlich in Granulosazelltumoren exprimiert ist (Zheng et al., 1998). Activin dient der Proliferation und Invasion von Tumorzellen (Fukuda et al., 1998; Steller et al., 2005). *In vitro* exprimieren 96% der OvCA-Zellen Activin und *in vivo* ist Activin im Serum von OvCA-Patientinnen nachweisbar (Welt et al., 1997). Ähnlich wie TGF- β hat Activin eine duale Funktion im Tumorkontext (Choi et al., 2001b). So inhibiert es die Proliferation verschiedener Tumorzellen wie die der Gallenblase, der Prostata und der Hypophyse ebenso wie die Angiogenese (Chen et al., 2002; Danila et al., 2000; McPherson et al., 1999; Panopoulou et al., 2005; Yokomuro et al., 2000). Ob Activin pro- oder anti-tumorigen wirkt ist abhängig vom Tumorstadium, Mikromilieu und Zelltyp.

In Mäusen, denen die α -Untereinheit von Inhibin fehlt, entstehen vermehrt Ovarialkarzinome. Dies führte zur Annahme, dass Inhibin- α als Tumorsuppressor im Ovar agiert (Matzuk et al., 1992). Dafür spricht auch, dass Inhibin- α die Proliferation und Invasion von humanen OvCA-Zelllinien einschränkt und Inhibin-resistente Zelllinien im Xenograft-Tumor aggressiver wachsen (Steller et al., 2005).

Die „*bone morphogenetic proteins*“ (BMP) sind eine weitere Unterfamilie innerhalb der TGF- β -Superfamilie, die im Ovar eine Rolle spielt. Sie sind wichtig bei der Follikelreifung und werden dementsprechend im gesunden Ovariepithel exprimiert. Auch im OvCA sind BMPs exprimiert, v.a. BMP4 und BMP2 (Moll et al., 2006; Shepherd and Nachtigal, 2003). Die Funktion im OvCA ist noch nicht gründlich erforscht. Für BMP2 wurde eine Rolle bei der Kalzifizierung von Psammomakörpern im serösen OvCA beschrieben (Kiyozuka et al., 2001).

Die „*Mullerian-inhibiting substance*“ (MIS), ein weiteres Mitglied der TGF- β -Superfamilie, wird postnatal in den Granulosazellen des Ovars produziert und reguliert deren Proliferation im entstehenden Follikel (Robertson et al., 2004a; Robertson et al., 2004b). Erhöhte Serumlevel von MIS wurden bisher nur in Granulosazelltumoren festgestellt (Lane et al., 1999). Welche Bedeutung MIS für das epitheliale Ovarialkarzinom hat, ist bislang nicht geklärt.

Nodal gehört ebenfalls zur TGF- β -Superfamilie und ist ein wichtiger Regulationsfaktor in der Embryogenese (Brennan et al., 2002). Nodal wurde als Inhibitor der OvCA-Proliferation beschrieben und induziert in OvCA-Zelllinien Apoptose (Xu et al., 2004). Wie viele Mitglieder der TGF- β -Familie vermittelt Nodal seine Funktion in OvCA-Zellen über „*activin-like receptors*“ (ALK)-Rezeptoren (Xu et al., 2006a).

1.3.4 GDF-15, ein divergentes Mitglied der TGF- β -Superfamilie

1.3.4.1 Allgemeines

1997 beschrieben Bootcov et al. GDF-15 erstmals unter dem Namen „*macrophage inhibitory cytokine-1*“ (MIC-1) als neues Mitglied der TGF- β -Superfamilie, das in aktivierten Makrophagen induziert wird und deren weitere Aktivierung hemmt (Bootcov et al., 1997). Eine Zuordnung zu einer Unterfamilie ist schwierig, da es Charakteristika mehrerer Subgruppen aufweist. Daher steht es für eine eigene, neue Unterfamilie, die zwischen der BMP- und der TGF- β -Unterfamilie anzusiedeln ist (Abb. 17: Dendrogramm der TGF- β -Superfamilie) (Fairlie et al., 1999; Paralkar et al., 1998). In den darauffolgenden Jahren wurde GDF-15 auch von weiteren Gruppen und unter anderen Namen beschrieben: neben „*growth & differentiation factor*“ (GDF)-15 (Bottner et al., 1999a) beschreiben plazentares (p)TGF- β (Lawton et al., 1997), „*placental bone morphogenetic protein*“ (PLAB) (Hromas et al., 1997), „*nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene*“ 1 (NAG-1) (Baek et al., 2001), „*prostate derived factor*“ (PDF) (Paralkar et al., 1998) und PL74 (Li et al., 2005) das selbe Zytokin.

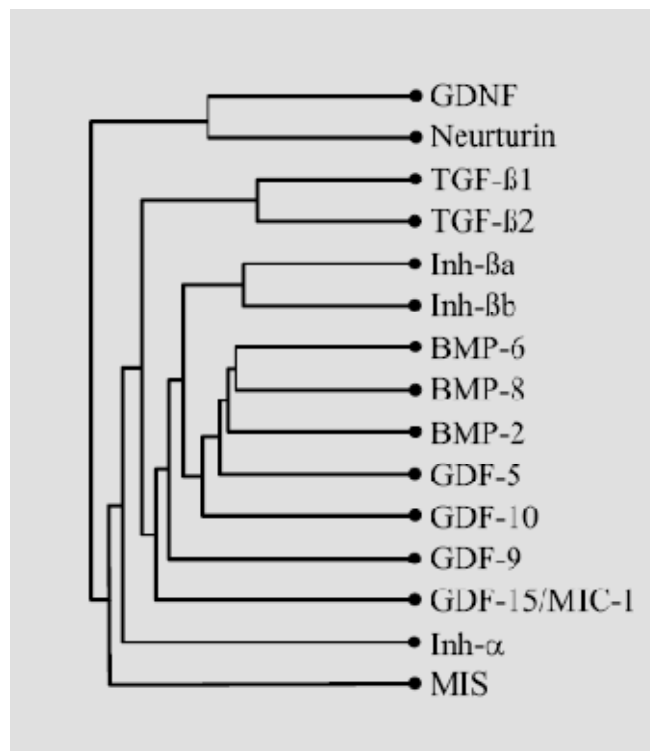


Abb. 17: Dendrogramm der TGF- β -Superfamilie. GDF-15 ist ein TGF- β -Familienmitglied, das mit GDF-9 am nächsten verwandt ist, aber aufgrund geringer Homologien eine neue Untergruppe bildet (Bottner et al., 1999a).

GDF-15 wird wie andere TGF- β -Familienmitglieder als inaktives Vorläuferprotein von 62 kDa synthetisiert. Dieses wird weiter prozessiert zu einer 40 kDa großen Proform, bevor im ER eine Dimerisierung erfolgt. Von dort wird es an den Golgi-Apparat weitergeleitet. Dort erfolgt die Prozessierung durch Furin-ähnliche Proteasen unter Abspaltung des Propeptides von der reifen Form,

so dass GDF-15 schließlich als 25 kDa großes Homodimer sezerniert wird (Bauskin et al., 2000; Bootcov et al., 1997; Fairlie et al., 1999, 2001a). Eine Besonderheit von GDF-15 ist, dass es im Gegensatz zu anderen TGF- β -Mitgliedern das Propeptid weder für eine korrekte Faltung in das aktive Protein noch für die Sezernierung braucht (Fairlie et al., 2001b). In einigen Tumoren und Tumorzelllinien wird GDF-15 nicht als reifes Dimer sezerniert, sondern als nicht-prozessiertes Propeptid. Aufgrund der starken Bindungsfähigkeit dieser GDF-15-Proform an die ECM verbleibt es im Gewebe und wird nicht wie das reife GDF-15 ins Blut abgegeben (Bauskin et al., 2005).

In der Bevölkerung existiert ein Polymorphismus für GDF-15: der Basenaustausch von Guanin gegen ein Cytosin in der Gensequenz führt zum Austausch einer Histidin (H)- gegen eine Aspartatseitenkette (D) an Position 6 des reifen GDF-15-Proteins. Dieser H6D-Polymorphismus tritt mit 54% homozygot (HH), 39% heterozygot (HD) und 7% homozygot (DD) in Erscheinung (Brown et al., 2002a). Da diese beiden Aminosäuren unterschiedliche Eigenschaften besitzen, kann der Polymorphismus eine Funktionsänderung des reifen Proteins zur Folge haben. So ist beispielsweise der GDF-15-Polymorphismus beim Kolon-CA mit einem erhöhtem Metastasierungsrisiko verbunden (Brown et al., 2003). Im Prostata-CA ist der H6D-Polymorphismus mit einem verringerten Tumorrisiko verbunden, gleichzeitig aber mit einer erhöhten Aggressivität, wenn es zum Tumorwachstum kommt (Hayes et al., 2006; Lindmark et al., 2004).

1.3.4.2 Expression von GDF-15

GDF-15 hat ein weit eingeschränkteres Expressionsprofil als andere TGF- β -Mitglieder. Im epithelialen Gewebe findet sich kaum oder gar kein GDF-15. Im physiologischen Kontext wird GDF-15 hauptsächlich von den Trophoblasten in der humanen Plazenta exprimiert (Li et al., 2005; Marjono et al., 2003). In humanem Fötalgewebe konnte GDF-15-mRNA-Expression in der fötalen Lunge und Niere nachgewiesen werden, nicht aber im Gehirn oder in der Leber (Fairlie et al., 1999). Geringe GDF-15-mRNA-Expression kann auch in adulten Epithelien der Niere, des Pankreas und der Prostata detektiert werden (Fairlie et al., 1999; Lawton et al., 1997; Moore et al., 2000).

Im pathogenen Zustand finden sich erhöhte GDF-15-Serumspiegel bei Entzündungen, akuter Verletzung oder im transformierten Gewebe (Schober et al., 2001; Welsh et al., 2003). Auf Proteinebene wird GDF-15 in Tumoren der Brust, der Prostata und des Kolons sehr stark exprimiert, nicht aber im entsprechenden gesunden Gewebe (Brown et al., 2003; Fairlie et al., 1999). Eine Studie von Welsh et al. zeigte, dass GDF-15 zudem das am stärksten überexprimierte Zytokin in den untersuchten Tumorgeweben ist (Welsh et al., 2001). Nakamura et al., bestätigten diese Daten, wohingegen eine Studie von Thomas et al. die mRNA-Expression von GDF-15 in Prostatatumoren als herunterreguliert beschreibt (Nakamura et al., 2003; Thomas et al., 2001).

Das Expressionsprofil von GDF-15 im Menschen unterscheidet sich von dem in Nagern: in der Ratte wurde GDF-15-mRNA-Expression im Gehirn, in der Prostata, in der Lunge und im Brustdrüsengewebe nachgewiesen (Bottner et al., 1999a; Bottner et al., 1999b). Das mRNA-Expressionsprofil im Mausgewebe umfasst Niere, Lunge, Leber und Milz und zu einem geringen Teil Herz, Darm, Muskeln,

Thymus und Hypophyse (Bottner et al., 1999a; Hsiao et al., 2000). Die unterschiedliche Expression erklärt sich wahrscheinlich aus den starken Unterschieden in der GDF-15-Promotersequenz, die zwischen Mensch und Maus nur eine Homologie von 39% aufweist (Baek et al., 2001). Ob daher die Funktion von murinem GDF-15 der humanen Funktion entspricht, bleibt noch zu klären.

Die GDF-15-Expression in Tumoren kann durch verschiedene „*non-steroidal anti-inflammatory drugs*“ (NSAID) und andere anti-tumorigene Substanzen wie Genistein, Resveratrol und Berberin, aber auch durch Vitamin D3 induziert werden (Baek et al., 2001; Baek et al., 2002a; Eling et al., 2006; Piyanuch et al., 2007; Wilson et al., 2003). Signalwege, die zur GDF-15 Expression führen, umfassen, abhängig vom Tumortyp, den Proteinkinase C-, den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-, den MAP-Kinase- und den AKT-Signalweg (Boyle et al., 2009; Shim and Eling, 2005; Wollmann et al., 2005). GDF-15 selbst ist ein direktes Target von p53 und eignet sich, da es sezerniert wird, als Biomarker für die Aktivierung des p53-Signalweges (Li et al., 2000; Yang et al., 2003). Auch andere Transkriptionsfaktoren, z.B. Egr-1, SP-1 und MTF, regulieren die GDF-15-Expression, ebenso wie NF- κ B, das über seine p65-Untereinheit an die GDF-15-Promotorsequenz binden kann (Baek et al., 2005; Boyle et al., 2009; Shim and Eling, 2005).

Wie GDF-15 seine Funktion auf Zielzellen ausübt, ist noch unklar. In TGF- β -sensitiven Tumorzellen und Kardiomyozyten aktiviert GDF-15, ähnlich wie TGF- β , den SMAD-Signalweg (Tan et al., 2000; Xu et al., 2006b). Dies scheint aber nicht generell der Fall zu sein: in Magen- und Brusttumorzellen aktiviert GDF-15 den ERK1/2-Signalweg (Lee et al., 2003; Wollmann et al., 2005), in einer Prostatazelllinie aktiviert GDF-15 die Proteinkinase C und NF- κ B (Shim and Eling, 2005), in einer anderen Brusttumorzelllinie hingegen den AKT-Signalweg (Wollmann et al., 2005). Interessanterweise kann GDF-15 über die Transaktivierung von ErbB2 (Her2/neu) den AKT- und ERK1/2-Signalweg aktivieren, was besonders bei ErbB2-überexprimierenden Tumoren wie dem Mamma-CA zur Progression beiträgt (Kim et al., 2008). GDF-15 kann demnach abhängig von der Art der Zelle verschiedene Signalwege induzieren bzw. selbst über verschiedene Signalwege und Transkriptionsfaktoren induziert werden.

1.3.4.3 Funktionen von GDF-15

Die Funktion von GDF-15 ist noch weitgehend unklar. Wie viele TGF- β -Mitglieder ist auch GDF-15 ein Wachstumsfaktor, der aber besonders im Tumorkontext paradoxe Wirkungen entfalten kann. Bei der Erstbeschreibung wurde gezeigt, dass GDF-15 in Makrophagen durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α , nicht aber durch IFN- γ und LPS induziert wird. In diesem Zusammenhang scheint GDF-15 autokrin durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Makrophagenaktivierung zu regulieren (Bootcov et al., 1997). Demgemäß ist auch die Expression von GDF-15 in der Plazenta zu interpretieren, wo es eine immuninhibitorische Rolle einnimmt, um den Fötus vor dem maternalen Immunsystem zu schützen. Dies wird auch durch den Befund bestätigt, dass niedrige GDF-15-Spiegel in der Plazenta und im Serum Schwangerer einem spontanen Abort voraus gehen (Moore et al., 2000; Tong et al., 2004). Wie die BMPs induziert GDF-15 auch das Knochen- und Knorpelwachstum. In Rattenhirnen wurde GDF-15 zudem als neuroprotektiver Faktor

bei dopamin- und serotonergen Neuronen beschrieben, der das motorische Verhalten nach neuronaler Beschädigung normalisiert (Strelau et al., 2000b).

GDF-15 ist in vielen entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis erhöht und wurde als prognostischer Marker für verschiedene pathologische Abläufe identifiziert (Brown et al., 2007). Neben der Markereigenschaft für das Abortenrisiko konnte in einer Studie von Brown et al. GDF-15 als prognostischer Marker für kardiovaskuläre Ereignisse identifiziert werden: Patienten mit erhöhtem GDF-15-Serumspiegel hatten ein dreimal höheres Risiko einen Herzinfarkt, einen Schlaganfall oder eine andere kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden (Brown et al., 2002b; Brown et al., 2007). Im Prostata-CA konnte GDF-15 in Kombination mit anderen Serummarkern die Spezifität zur Detektion dieses Tumors stark erhöhen (Brown et al., 2006; Brown et al., 2003). Ebenfalls im Zusammenhang mit der GDF-15-Überexpression in Tumoren steht die Studie von Johnen die GDF-15 als Mediator von Appetitlosigkeit bei Krebspatienten und damit verbundener Gewichtsabnahme (Cachexie) identifizierten (Johnson and Nakamura, 2007). Damit in Einklang ist auch der Phänotyp von Mäusen mit veränderter GDF-15-Expression: GDF-15-k.o.-Mäuse sind dicker und größer als normale Kontrollmäuse, während GDF-15-transgene Mäuse dünner und kleiner sind (Baek et al., 2006).

Da GDF-15 die Expression des Eisenregulators Hepcidin moduliert, ist GDF-15 zudem ein wichtiger Faktor beim Eisenmetabolismus und der Erythropoese. Dementsprechend ist GDF-15 bei hämatologischen Erkrankungen wie der Thalassämie und der sideroblastischen Anämie häufig dereguliert (Ramirez et al., 2009; Tanno et al., 2007).

1.3.4.4 GDF-15 in Tumoren

TGF- β -Mitglieder spielen eine Rolle bei der Immunevasion und Metastasierung von Tumoren, beispielsweise beim Brustkrebs, beim Blasenkrebs, beim kleinzelligen Lungenkrebs, bei endometrioiden Tumoren und bei Glioblastomen (Boyd and Kaufman, 1990; Damstrup et al., 1993; Geiser et al., 1992; Gorelik and Flavell, 2001; Sun et al., 1994; Weller and Fontana, 1995). Da GDF-15 in vielen Tumoren überexprimiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass es ebenfalls eine Funktion bei der Tumorprogression hat. Allerdings ist die Datenlage dazu paradox. Einerseits gibt es Hinweise auf eine anti-proliferative, inhibierende und pro-apoptotische Funktion von GDF-15. So induziert die Überexpression von GDF-15 bei Mamma-, Kolon- und Prostata-Tumorzelllinien *in vitro* einen Wachstumsarrest in der G1-Phase und löst Apoptose aus, beim Kolon-CA und Gliom auch *in vivo* (Albertoni et al., 2002; Baek et al., 2006; Graichen et al., 2002; Li et al., 2000; Liu et al., 2003; Tan et al., 2000). In OvCA-Zelllinien induzierte das therapeutische Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) bzw. Isochaihulacton in einer Lungen-CA-Zelllinie ebenfalls GDF-15-abhängig Apoptose (Appierto et al., 2007; Chen et al., 2007).

Andererseits scheint GDF-15 eine anti-apoptotische Wirkung zu haben und das Wachstum von Tumoren zu unterstützen. Beim Magenkarzinom führt die GDF-15-Sekretion zur Migration und Invasion der Tumorzellen und erhöht damit das Metastasierungsrisiko (Lee et al., 2003). Im Prostata-CA wird GDF-15 durch klinische Chemotherapeutika *in vitro* und *in vivo* induziert und ist besonders bei

chemoresistenten Tumoren erhöht (Huang et al., 2007). Und im Gegensatz zu früheren Berichten induziert GDF-15 keine Apoptose in Glioblastomzelllinien, sondern fördert in einzelnen Fällen sogar die Tumorpheriferation (Strelau et al., 2008). Ein hoher GDF-15-Serumspiegel in kolorektalen Tumoren geht einher mit dem Tumorprogress und ist mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert (Brown et al., 2003). Die Autoren dieser Studie postulieren eine positive Regulationsschleife für die GDF-15-Produktion in diesem Tumor: GDF-15 ist ein immunsuppressiver Faktor, der dem Tumor zum „immune escape“ verhilft. Das fortschreitende Tumorstadium führt dann zu weiter ansteigenden GDF-15-Serumspiegeln.

GDF-15 scheint daher, ähnlich wie TGF- β , eine widersprüchliche Wirkung auf Tumorzellen zu haben (Tab. 8: Widersprüchliche Funktionen von GDF-15 in verschiedenen Tumoren).

Tab. 8: Widersprüchliche Funktionen von GDF-15 in verschiedenen Tumoren.

Wirkung im entsprechenden Tumortyp		↑=induziert ↘=inhibiert	anti-/pro-tumorigen	Referenz
G D F 1 5	Magen-CA urokinase-type Plasminogen activator (uPA) und uPA-Rezeptor Invasion, Apoptose	↑ ↑	pro- und anti-tumorigen	Pang et al., 2007
	Prostata-CA (<i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>) Apoptose, Chemoresistenz Zelladhäsion	↑ ↘	pro- und anti-tumorigen	Huang, 2007
	Orale Tumore Apoptose, Proliferation, Invasion	↑	pro- und anti-tumorigen	Zhang, L., 2008
	murines Kolon-CA (<i>in vivo</i>) Suppression der Karzinogenese Gewichtsreduktion	↑ ↘	pro-tumorigen	Li, P.-X., 2007
	Kolorektaler Krebs, Kolon-CA (<i>in vitro</i>) Apoptose	↑	anti-tumorigen	Lim, 2007
	Leberkarzinom (in GDF-15-k.o.-Mäusen)		kein Einfluss	Zimmers, 2007
	OvCA (<i>in vitro</i>) Apoptose (4-HPR-abhängig)	↑	anti-tumorigen	Appierto, 2007
	Lungen-CA (<i>in vitro</i>) Apoptose (Isochailulacton-abhängig)	↑	anti-tumorigen	Chen, Y.L., 2007
	Melanom (<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>) Proliferation	↑	pro-tumorigen	Boyle, 2009
	Glioblastoma (<i>in vitro</i>) Proliferation, Invasion Kein Effekt auf Apoptose	↑	pro-tumorigen	Strelau, 2008
	Mamma-CA, Magen-CA Proliferation (via ErbB2) (<i>in vivo</i>) HIF-Induktion Invasion (via GDF-15 von Adipozyten)(<i>in vitro</i>)	↑ ↑ ↑	pro-tumorigen	Kim, K.-K., 2008 Kim, 2008

Es wäre denkbar, dass GDF-15 in Tumoranfangsstadien als Tumorsuppressor auftritt, während es in späteren Stadien als Tumorpromotor das Wachstum und die Ausbreitung unterstützt. Wie bei TGF- β sind dabei der Zelltyp, das Tumorstadium und wahrscheinlich auch das Tumormikromilieu von Bedeutung (Bauskin et al., 2006). Dies könnte die gegensätzlichen Funktionen, die bisher für GDF-15 in Tumoren beschrieben wurden, erklären.

1.4 Zielsetzung

Mitglieder der TGF- β -Familie sind an wichtigen physiologischen Prozessen wie der Zellhomöostase, der Wachstumsregulation und der Zelldifferenzierung beteiligt (Massague, 2000; Siegel and Massague, 2003). Gleichzeitig sind TGF- β -Moleküle in vielen Tumoren überexprimiert und nehmen eine essentielle Rolle beim „*tumor immune escape*“ ein (Moutsopoulos et al., 2008). GDF-15 ist ein divergentes Mitglied der TGF- β -Familie, das unter physiologischen Bedingungen nur in der Plazenta in großen Mengen vorkommt, während es in zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert wird (Bauskin et al., 2006; Brown et al., 2003; Chenau et al., 2009; Schober et al., 2001; Welsh et al., 2001). In einer Tumorscreeningstudie von Welsh et al. an verschiedenen Tumoren war GDF-15 das Zytokin, das am stärksten überexprimiert wurde. Die genaue Funktion von GDF-15 ist bislang weder im physiologischen Kontext noch im Tumorkontext geklärt. Aufgrund der häufigen und hohen Tumorexpression scheint GDF-15 eine wesentliche Rolle im Tumorgeschehen einzunehmen. Verschiedene Studien lassen auf einen ambivalenten Charakter von GDF-15 schließen: während einige Untersuchungen GDF-15 als ein pro-apoptotisches, anti-tumorigenes Molekül beschreiben, weisen andere Studien GDF-15 als einen anti-apoptotischen, pro-tumorigenen Wachstumsfaktor aus (Kadara et al., 2006; Lambert et al., 2006). Ähnliches ist auch über TGF- β bekannt (Sanchez-Capelo, 2005). Wie GDF-15 letztendlich in Tumoren agiert, scheint kontextspezifisch zu sein und muss individuell ermittelt werden.

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von GDF-15 im Ovarialkarzinom (OvCA), einem sehr aggressiven Tumor, untersucht werden. Die Charakterisierung von GDF-15 als Immunmodulator im OvCA sollte in Anlehnung an das strukturell verwandte TGF- β , das stärkste immunsuppressive Zytokin überhaupt, durchgeführt werden. Dazu sollte zunächst ermittelt werden, ob und in welchem Umfang GDF-15 im Ovarialkarzinom exprimiert ist. Basierend auf den Expressionsstudien sollte unter Zuhilfenahme von GDF-15-defizienten und GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen geklärt werden, welche Bedeutung GDF-15 für das Wachstum von OvCA-Zellen hat („autokrine Wirkung“).

Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Wechselwirkung von GDF-15 mit dem Immunsystem gelegt werden („parakrine Wirkung“). Normalerweise eliminiert das Immunsystem entartete körpereigene Zellen. Manchmal gelingt es Tumorzellen jedoch, sich dieser Immunüberwachung zu entziehen und dem Immunsystem zu „entwischen“ (Ostrand-Rosenberg, 2008; Quesnel, 2008; Stewart and Abrams, 2008). Das Verständnis dieser „*tumor immune escape*“-Mechanismen ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Tumortherapiestrategien. Inwieweit GDF-15 bei der Koordination des „*immune escape*“ des OvCA eine Rolle spielt, sollte in dieser Arbeit geklärt werden. Im Mittelpunkt sollte dabei die Wirkung von GDF-15 auf NK-Zellen stehen, da diese als frühe Effektoren und wichtige Mediatoren zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem eine Schlüsselrolle für die immunologische Überwachung spielen. NK-Zellen vermitteln nicht nur direkte Zytotoxizität gegen Tumorzellen, sondern können über die Sezernierung von Zytokinen weitere Komponenten des Immunsystems gegen den Tumor aktivieren. Diese Eigenschaften zeichnen NK-Zellen als ideale Werkzeuge für die Tumormimmuntherapie aus (Chan et al., 2008; Waldhauer and Steinle, 2008).

Schließlich sollte die Wirkung von GDF-15 auf das Immunsystem nicht nur von der funktionalen Seite analysiert werden, sondern auch die von GDF-15 initiierten intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen und Genregulationen untersucht werden.

Die Erkenntnisse über GDF-15 aus dieser Arbeit sollen zu einem klareren Bild über die Funktion dieses Zytokins verhelfen, das sein häufiges Auftreten in Tumoren erklären kann.

Desweiteren sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis für immunmodulatorische Mechanismen im OvCA beitragen und neue Angriffspunkte für die Immuntherapien aufzeigen, welche Grundlage für neue Tumortherapiestrategien, nicht nur für das OvCA, sondern auch für andere GDF-15-exprimierende Tumore sein können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tab. 9: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Spezies	Label	Verdünnung	Quelle
Anti-human AKT/PKB	Kaninchen	-	1:1000	Exbio
			1:1000	Cell Signaling
Anti-human β -Aktin	Maus	-	1:5000	Abcam
Anti-human CD3	Maus	FITC	1:50	Immunotools
		PE	1:50	
		PECy5	1:100	
Anti-human CD4	Maus	FITC	1:50	Immunotools
		PE	1:50	
Anti-human CD8	Maus	FITC	1:50	Immunotools
		PE	1:50	
Anti-human CD16	Maus	PE	1:50	Caltag
Anti-human CD25	Maus	PE	1:50	Immunotools
Anti-human CD56	Maus	FITC	1:25	Immunotools
		PE	1:50	
Anti-human CD69	Maus	PE	1:50	Immunotools
Anti-human CD94	Maus	-	1:100	AbDSerotec
Anti-human CD95	Maus	-	1:11	Miltenyi
		FITC	1:50	Immunotools
		R-PE	1:5	AbD Serotec
Anti-human CD107a	Maus	Alexa- 488	1:10	Exbio
		PE	1:20	BD Bioscience
Anti-human CD155	Maus	-	1:20	Beckman Coulter
Anti-human CD158a/h; e; i	Maus	PE	1:11	Miltenyi
Anti-human CD226 (DNAM-1)	Maus	PE	1:50	Miltenyi
		-	1:50	AbD Serotec
Anti-human CD305	Maus	-	1:100	AbD Serotec
Anti-human DR4, DR5	Maus	-	1:100-1:500	Exbio
Anti-human FasL	Maus	-	10-20 μ g/ml	Santa Cruz
				Biotechnologies
Anti-human GDF-15	Ziege	-	1:200	Santa Cruz Biotech.
			1:500-1:1000	R&D Systems
Anti-human Granzym B	Maus	PE	1:50	Immunotools
Anti-human IgG	Maus	-	1:200	AbD Serotec
(Isotypantikörper)		-	1:100	Calbiochem

		FITC	1:100	Caltag
		PE	1:100	
Anti-human JNK1/2	Maus	-	1:200	BD Bioscience
Anti-human KIR	Maus	-	1:100	AbD Serotec
Anti-human KIR2D	Maus	PE	1:11	Miltenyi
Anti-human (pan) MHC Klasse I (Klon W6/32)	Maus	-	unverdünnt, Hybridoma-SN	Prof. Stevanovic, Uni Tübingen
Anti-human MIC-A, -B	Maus	-	unverdünnt Hybridoma-SN	Prof. Steinle, Uni Tübingen
Anti-human NKG2D	Maus	-	1:100	R&D Systems
		-	1:100	Biologend
		PE	1:100	Miltenyi
Anti-human NKp30, 44, 46	Maus	PE	1:100	Miltenyi
Anti-human Perforin	Maus	Alexa488	1:20	Biologend
Anti-human Phospho-AKT	Kaninchen	-	1:1000	Cell Signaling
Anti-human Phospho-Erk1/2	Kaninchen	-	1:1000	Chemikon
			1:1000	Cell Signaling
Anti-human Phospho-JNK1/2	Kaninchen	-	1:1000	Millipore, Cell Signaling
Anti-human Phospho-Smad1/5/8	Kaninchen	-	1:1000	Cell Signaling
Anti-human Phospho-Smad2/3	Kaninchen	-	1:1000	Cell Signaling
Anti-human Phospho-Stat1	Maus	-	1:500-1:1000	Exbio
Anti-human Phospho-Stat3	Kaninchen	-	1:1000	Cell Signaling
Anti-human p38/MAPK	Kaninchen	-	1:1000	AbD Serotec
			1:1000	Cell Signaling
Anti-human PRR2	Maus	PE	1:5	Immunotech
Anti-human Smad1/5/8	Kaninchen	-	1:1000	Cell Signaling
Anti-human Smad2/3	Kaninchen	-	1:1000	Cell Signaling
	Maus		1:1000	
Anti-human Stat1	Maus	-	1:500-1:1000	Exbio
Anti-human Stat3	Maus	-	1:1000	Cell Signaling
Anti-human TGF- β 1, 2, 3	Kaninchen	-	1:200	Santa Cruz Biotech.
Anti-human TRAIL	Maus	-	1:50	AbD Serotec
Anti-human TRAILR1, 2 (=DR4, 5)	Maus	-	1:100	Exbio
Anti-Kaninchen IgG (Sekundäntikörper)	Ziege	HRP	1:1000	KPL
Anti-Maus IgG (Sekundäntikörper)	Ziege	Cy3	1:600	Dianova
		FITC	1:500	Immunotools
		HRP	1:1000	KPL
Anti-Ziege IgG (Sekundäntikörper)	Kaninchen	HRP	1:1000	KPL
Anti-Schaf-IgG (Sekundäntikörper)	Kaninchen	HRP	1:1000	KPL

2.1.2 Bakterien

Der zur Transfektion von Plasmiden verwendete kompetente *Escherichia coli* Bakterienstamm NEB 5-alpha wurde von New England Biolabs (NEB) bezogen.

2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Tab. 10: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Reagenzien.

Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	Hersteller bzw. Vertreiber
ACD-A (Natriumcitratlösung)	Haemonetics
Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Annexin V (-FITC)	Immunotools
Aprotinin	Roth
7-aminoactinomycin D (7-AAD)	Biotium
Aqua ad iniectabilia	Braun
Beriglobinlösung	Behring
Brefeldin A	Applichem
Bromphenolblau	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	Applichem
Carboxylfluorescein succinimidylester (CFSE)	Calbiochem, Molecular Probes
Chloroform	Sigma
Coomassie Brilliant Blue 6250	Sigma
Cutasept	Bode
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Applichem
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Applichem
Eisessig	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (EtOH)	Klinikapotheke
FACS-Clean	Becton Dickinson (BD)
FACS-Flow	BD
FACS-Rinse	BD
Fötale Kälberserum („fetal calf serum“, FCS)	PAA
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
FugeneHD Transfection Reagent	Roche
GelRed	Biotium
Geneticindisulfat (G418)	Roth
Glycin	Roth

Glycyl-Glycin	Roth
Glycerin	Roth
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure (Hepes)	Roth
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
Humanes Serumalbumin (HSA)	Behring
Isopropanol	Roth, Merck
Kaliumchlorid	Roth
(Di-) Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Kalium (di-)hydrogenphosphat	Roth
Kaninchenserum	Caltag
Kristallviolettsalz	Roth
Luria-Bertani (LB)-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
Leupeptin	Roth
Lipofectamine	Invitrogen
Lipofectamine RNAiMax	Invitrogen
Luziferin	P.J.K.
Luminolsalz	Sigma
Magermilchpulver	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
Mausserum	Caltag
β -Mercapthoethanol	Roth
Methanol (MetOH)	Merck
Monensin	Biolegend
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth
Natriumacetat	Applichem
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumfluorid	Applichem
Natrium (di-)hydrogenphosphat	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Applichem
Natriumhydroxid	Roth
Natriumorthovanadat	Applichem
Nonidet P-40	Roth
Paraformaldehyd	Roth
Ponceau S	Roth
Penicillin/Streptomycinlösung (P/S)	PAA
Phythämagglutinin (PHA)	Sigma
Phospho-Stopp (Tabletten)	Roche
PKH-26	Sigma
Phorbol-12-myristoyl-13-acetat (PMA)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
PrepProtect	Miltenyi
Puromycin	Roth

Reporter-Lysis-Buffer	Promega
Roti-Quant	Roth
Salzsäure	Applichem
Saponin	Roth
SDS	Roth
SYBR <i>Safe DNA Gel Stain</i>	Invitrogen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth
Trichloressigsäure	Roth
Triethanolamine	Roth
Tricine	Roth
Tri-Reagenz	Abgene
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Ultra	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton-X-100	Roth
Tween20	Roth
VybrantDill	Cambrex
Wasserstoffperoxid	Sigma
Ziegenserum	Caltag

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme für Klonierungen und enzymatische Restriktion von Plasmid-DNA wurden von Fermentas und NEB bezogen.

2.1.5 Geräte

Tab. 11: Benutzte Geräte.

Gerät	Hersteller bzw. Vertreiber
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Roth, MupID-exU
Autoklav	H+P
Brutschrank	Thermo Elektron
Eismaschine	Scotsman
ELISA-Reader Sunrise	Tecan
FACScan, FACSCalibur	Becton Dickinson
Gefrierschrank	Liebherr; Thermo Electron, Kirsch
Geldokumentationssystem	Biometra
Heizblock	VWR, Biometra
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific
Kryobox	Nalgene

Kühlschrank	Liebherr
Luminometer Orion II	Berthold Detection Systems
Magnetrührer	VWR
Mikroskop	Leica
Mikrowelle	Sharp
PCR-Thermocycler	Biometra
pH-Meter	Mettler, Schott
Photometer	Thermo Electron
Pipetten	Eppendorf
Power-Supply	Consort, Thermo Electron
Röntgenfilmkassetten	Roth
Rollinkubator	Stuart
Schüttler	Heidolph
SDS-Gelelektrophorese-System	Biometra
Sterilbank	Heraeus
Stickstofftank	Air Liquide
Vortex	VWR, Scientific Industries
Thermomixer	Eppendorf
Ultratiefkühlschrank (-86 °C)	Heraeus
Wasserheizbad	Julabo
Waage	Sartorius
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen	Eppendorf, Thermo Electron

2.1.6 Größenstandards

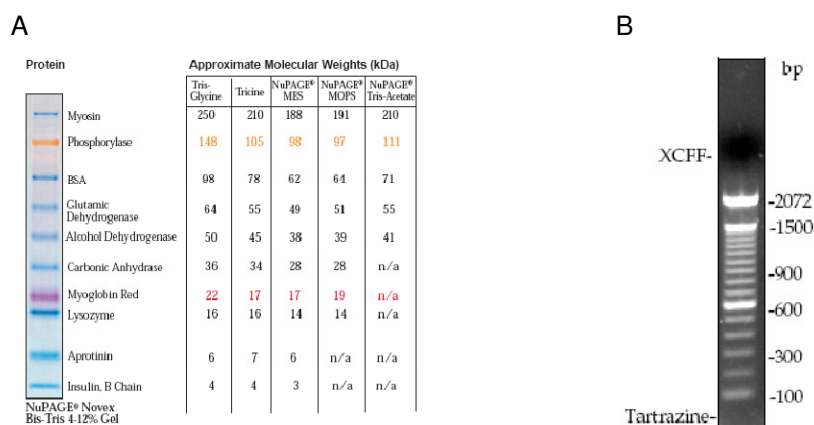


Abb. 18: Verwendete DNA- und Protein-Größenstandards. Proteinstandard SeeBlue®Plus2 für TrisGlycine-SDS-Gele (**A**) und TrackIt Plus 100bp DNA-Standard (**B**) (beide von Invitrogen, www.invitrogen.com).

2.1.7 Kits

Tab. 12: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
AmpliTaq PCR Kit	Applied Biosystems
Cell Proliferation Kit ELISA-BrdU	Roche
Cell Proliferation Reagent WST	Roche
DuoSet ELISA Development System - human GDF-15	R&D Systems
EndoFree Plasmid MIDI Kit	Qiagen
iScript cDNA Synthesis Kit	Biorad
KIR Typing Kit	Miltenyi
MACS CD8 T Cell Isolation Kit II	Miltenyi
MACS NK Cell Isolation Kit II	Miltenyi
Power SYBR®Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Proteome Profiler Array-Human: Phospho-Immuneceptor-Kit	R&D Systems

2.1.8 Medien und Medienzusätze

Tab. 13: Verwendete Zellkulturmedien und Medienzusätze.

Medium	Zusatz	Firma
RPMI 1640	10-15% FCS	PAA
	1% P/S, 0,5% Na-Pyruvat	
DMEM	10% FCS	PAA
	1% P/S, 0,5% Na-Pyruvat	
X-VIVO 15	-	Calbiochem
MCDB 105	-	Sigma
Medium 199	-	PAA
„M+M“-Medium	10% FCS	MCDB105+Medium 199 (1:1)
	1% P/S, 0,5% Na-Pyruvat	Eigene Herstellung (Auersperg et al. 2001)
Kryomedium	70% FCS, 20% Medium, 10 % DMSO	Eigene Herstellung
Mediumzusatz	Konzentraion	Firma
Fötale Kälberserum (FCS)	10-15%	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (P/S)	1%	PAA
Natrium-Pyruvat	0,5%	PAA
β-Mercaptoethanol (50 mM)	1:200	Gibco
Hepes (1 M)	1:40	Gibco
DMSO	10%	Roth

2.1.9 Puffer und Lösungen

Tab. 14: Allgemeine Puffer und Lösungen.

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
DEPC-H ₂ O	H ₂ O, 0,1% DEPC, autoklaviert
6 x DNA-Ladepuffer	30% Glycerin, 50 mM EDTA, 0,001% Bromphenolblau
FACS-Puffer	PBS, 2% FCS, 0,05% NaN ₃
Formamid/ Formaldehyd-Mix für RNA-Gele	50% Formamid, 10% 37%ige Formaldehyd-Lösung, 50 µl 10x MOPS, DEPC-H ₂ O ad 500 µl
MACS-Puffer	PBS pH 7,2, 0,5% BSA, 2 mM EDTA
10 x MOPS	200 mM MOPS, 80 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, DEPC-H ₂ O ad 500 ml, pH 7
PBA	PBS, 1% BSA
PBS	37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBS-T	PBS, 0,05% Tween20
PFA 4%	4% Paraformaldehyd in PBS
Saponinpuffer	PBA, 0,5% Saponin
50 x TAE	2 M Tris, 0,6 M EDTA, 0,57% Eisessig
TMB-Puffer	Na-Acetat pH 5,5, 0,1 mg/ml TMB

Tab. 15: Puffer für Polyacrylamidgele.

	Sammelgel		Trenngel
	5%	10%	12%
dH ₂ O	0,68 ml	1,9 ml	1,6 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	0,17 ml	1,7 ml	2 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	0,13 ml	-	-
SDS (10%)	10 µl	50 µl	50 µl
APS (10%)	10 µl	50 µl	50 µl
TEMED	1 µl	2 µl	2 µl

Tab. 16: Puffer für SDS-PAGE und Western Blot.

Puffer	Zusammensetzung
„Blocking“-Puffer	5% Magermilchpulver (MMP) in TBST
ECL-Lösung	
A	50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 6,8
B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
Laufpuffer	25 mM Tris, 193 mM Glycin, 0,5% SDS pH 8,8
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8, 120 mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% NP-40, 2 µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml PMSF, 50 mM NaF, 200 µM NaVO ₅

Neutralisierungspuffer	1,5 M Tris-Base pH 7,4
Ponceaulösung	0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure
Proteinladepuffer (5x)	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol
„Stripping“-Puffer	0,2 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 2,8
TBS	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,3
TBS-T	TBS, 0,05% Tween20
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
TS-TMBSA	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20, 5% MMP, 2% BSA, 0,01%
(Antikörperverdünnung)	NaN_3

Tab. 17: Puffer und Lösungen für Reporterassays.

Puffer	Zusammensetzung
„Firefly“-Puffer	25 mM Glycylglycin, 15 mM K_2HPO_4 (pH 8), 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1 mM DTT, 15 mM MgSO_4 , 0,1 mM CoA, 75 μM Luziferin
„Renilla“-Puffer	1,1 M NaCl, 2,2 mM Na-EDTA, 220 mM K_2HPO_4 (pH 5,1), 0,44 mg BSA, 1,3 mM NaN_3 , 1,43 μM Coelenterazine

2.1.10 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide, siRNA und Plasmide

Tab. 18: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Herkunft
18sRNA, forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA	Sigma
18sRNA, reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT	Sigma
β -Aktin, forward	TGTTTGAGACCTTCAACACCC	Sigma
β -Aktin, reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	Sigma
GAPDH, forward	ACGACAGTCCATGCCATCAC	Eurogentec
GAPDH, reverse	TCCACCACCCTGTTCTCTGTA	Eurogentec
GDF-15, forward	CCCTGCAGTCCGGATACTC	Sigma
GDF-15, reverse	GAACAGAGCCCGGTGAAG	Sigma
MIC-A, forward	CCTTGCCATGAACGTCAGG	Sigma
MIC-A, reverse	CCTCTGAGGCCTCACTGCG	Sigma
MIC-B, forward	ACCTTGGCTATGAACGTCACA	Sigma
MIC-B, reverse	CCCTCTGAGACCTCGCTGCA	Sigma
MIF, forward	GCCCCGACAGGGTCTACA	Sigma
MIF, reverse	CTTAGCGAAGGTGGAGTTGTT	Sigma
NKG2D, forward	TCTCGACACAGCTGGGAGATG	Sigma
NKG2D, reverse	GACATCTTTGCTTTTGCCATCGTG	Sigma
TGF- β 1, forward	GCCCTGGACACCAACTATTG	Sigma

TGF- β 1, reverse	CGTGTCCAGGCTCCAAATG	Sigma
TGF- β 2, forward	AAGCTTACACTGTCCCTGCTGC	Sigma
TGF- β 2, reverse	TGTGGAGGTGCCATCAATACCT	Sigma
TGF- β 3, forward	AGCTCACACATGAAGATGCAC	Sigma
TGF- β 3, reverse	CATAGTATTCCGACTCGGTG	Sigma
ULBP-1; forward	GTA CTGGGAACAAATGCTGGAT	Sigma
ULBP-1; reverse	AACTCTCCTCATCTGCCAGCT	Sigma
ULBP-2, forward	TTACTTCTCAATGGGAGACTGT	Sigma
ULBP-2, reverse	TGTGCCTGAGGACATGGCGA	Sigma
ULBP-3, forward	CCTGATGCACAGGAAGAAGA	Sigma
ULBP-3, reverse	TATGGCTTTGGTTGAGCTAA	Sigma
ULBP-4, forward	CTGGCTCAGGGAATTCTTAGG	Sigma
ULBP-4, reverse	CTAGAAGAAGACCAGTGGATATC	Sigma

Tab. 19: Sequenzen der verwendeten siRNA.

siRNA	Sequenz 5' -> 3'	Herkunft
GDF-15, sense	ACAUGCACGCGCAGAUCAA99	Eurogentec
GDF-15, antisense	UUGAUCUGCGCGUGCAUGU99	Eurogentec
scrambled, sense	GCGCGCUUUGUAGGAUUCG99	Eurogentec
scrambled, antisense	CGAAUCCUACAAAGCGCGC99	Eurogentec

Tab. 20: Verwendete Plasmide und Vektoren (siehe auch 5.3).

Plasmid bzw. Vektor	Genexpression	Herkunft
pCDNA3.1	-	Invitrogen
pCDNA3.1-GDF-15	GDF-15	Prof. Unsicker, Heidelberg
pCDNA3.1-fluc	(<i>"Firefly"</i> -)Luziferase	Dr. Christine Brown, Duarte
pIRESeGFP	<i>"enhanced green fluorescence protein"</i> (GFP)	Clontech
pIRESeGFP-GDF-15	GFP, GDF-15	Prof. Samuel Breit, Sydney
pSUPER	-	Prof. Reuven Agami, Amsterdam, NL
pSUPERpuro	-	Dr. Wischhusen
pSUPERpuro-GDF-15	GDF-15	Dr. Wischhusen

Reporterplasmid*	Reporterelement
pRL-CMV	Kontrollplasmid („ <i>Renilla</i> “-Luziferase)
pTGF- β -luc	TGF- β -Gen-Reporter
pTIE-luc	TGF- β -abhängige c-myc Repressions-Reporter

p3TP-luc	SMAD-abhängiger Reporter
pARE-luc	Antioxidant-Reporterelement
pMBE6-luc	SMAD-abhängiger Reporter SMAD (mutierte Kontrolle zu SBE)
pSBE2-luc	SMAD-abhängiger Reporter (SMAD „ <i>binding element</i> “)
p154xSBR-luc	SMAD abhängiger Reporter (SMAD „ <i>binding region</i> “)

*Alle Reporterplasmide von J.Massagué, New York

2.1.11 Wachstumsfaktoren, Liganden und lösliche Rezeptoren

Tab. 21: Verwendete Wachstumsfaktoren, Liganden und Rezeptoren.

Wachstumsfaktor bzw. Ligand bzw. löslicher Rezeptor	(End-) Konzentration	Quelle
(mega) FasL	1:3000	Alexis
GDF-15*	5-50 ng/ml	R&D Systems Peprtech
	100-200 ng/ml	AG Prof. T. Müller, Univ. Würzburg
IL-2	10-100 U/ml	Peprtech
TGF- β 1 und 2	5 ng/ml	Peprtech
TGF- β 3	5 ng/ml	Immunotools
TGF- β RII und RIII	0,1-10 μ g/ml	R&D Systems
TNF- α	10 ng/ml	Immunotools
TRAIL/Apo2L	5-10 μ g/ml	Peprtech

* Die Aktivität der GDF-15-Chargen und -Präparationen war unterschiedlich stark ausgeprägt, weshalb die eingesetzten Mengen in den verschiedenen Experimenten von 5 - 200 ng/ml reichten.

2.1.12 Verbrauchsmaterial

Tab. 22: Verbrauchsmaterial.

Verbrauchsmaterial	Hersteller bzw. Vertreiber
Drei-Wege-Hahn mit Schlauch	Braun
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner
Folie (TaqMan)	Sarstedt
Handschuhe	Cardinal Health, Sempermed
Injektionskanüle	Braun
Combitips	Eppendorf
Kryoröhrchen	Nunc, Sarstedt
LS Säulen	Miltenyi

Luminometerplatten	Greiner
Mikrotiterplatten (Maxisorp)	Nunc
Nitrozellulosemembran	Schleicher&Schuell, Roth
Nylonsieb, 40 µM	BD
Parafilm	Pechiney
PCR-Reaktionsgefäße (8er-Stripes, 96-Well-Platte, ABITaqMan-Platte)	Sarstedt, Applied Biosystems, Eppendorf
Perfusorspritze	Braun
Petrischalen	Roth
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 100 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2ml)	Sarstedt, Eppendorf
Röntgenfilme	Thermo Scientific
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt
Vivaspin-Konzentrationsröhrchen	Sartorius
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner
Zellkulturplatten (96-Well, 24-Well, 12-Well, 6-Well)	TPP
Zellkulturschalen	TPP

2.1.13 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien und ihre Herkunft sind im Folgenden aufgelistet. Alle Patientenproben (Gewebe, Aszites, Serum) wurden an der Universitäts- Frauenklinik Würzburg im Zeitraum von 2005 bis 2008 gesammelt. Die Patientinnen waren zwischen 25 und 82 Jahre alt; das Durchschnittsalter lag bei 59,5 Jahren. Das Tumorgewebe und die Asziteszellen wurden von mindestens zwei erfahrenen Pathologen beurteilt. Die Experimente waren durch das Ethikkomitee der Universität Würzburg genehmigt und die Patienten gaben eine Einverständniserklärung ab.

Tab. 23: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Spezies	Plasmid	Herkunft
CCL-64, CCL-64-luc	Nerz, Lungenepithel	p800neoLuc	Prof D. Rifkin, New York University
HEK293	Human, Niere	-	ATCC
NKL	Human, Lymphom	-	Robertson MJ et al. 1996
OaW-42	Human, OvCA	-	Frauenklinik, Univ. Würzburg
OaW-42-pSUPERpuro	Human, OvCA	pSUPERpuro	diese Arbeit
OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15	Human, OvCA	pSUPERpuro-GDF-15	diese Arbeit
OVCAR-3	Human, OvCA	-	Frauenklinik, Universität Würzburg

OVCAR-3-pCDNA3.1	Human, OvCA	pCDNA3.1	diese Arbeit
OVCAR-3-pCDNA3.1-GDF-15	Human, OvCA	pCDNA3.1-GDF-15	diese Arbeit
OVCAR-3-pIRESeGFP	Human, OvCA	pIRESeGFP	diese Arbeit
OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15	Human, OvCA	pIRESeGFP-GDF-15	diese Arbeit
RPMI 8866	Human, Lymphom	-	Prof. Weller, Universität Tübingen
SKOV-3	Human, OvCA	-	Frauenklinik, Universität Würzburg
SKOV-3-fluc	Human, OvCA	pCDNA3.1-fluc	diese Arbeit

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden für das Arbeiten mit Tumor- und Immunzellen

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden durch Resuspendieren in 1 ml vorgewärmten Medium aufgetaut, in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml vorgewärmten Medium überführt und 5 min bei 1500 „*rounds per minute*“ (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipette abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Zum Anwachsen wurden die Zellen bei 37°C/5% CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung und Subkultivierung von Tumorzellen

Nach Anwachsen der Zellen in 25 cm²-Zellkulturflaschen erfolgte die Kultivierung der verwendeten Zelllinien in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml Medium bei 37°C/5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Mediumwechsel bzw. Subkultivierung bei konfluentem Zellrasen erfolgte alle drei Tage. Zur Subkultivierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA 5-10 min lang bei 37°C abgelöst. Die Wirkung von Trypsin/EDTA wurde mit 5 ml FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen wurden bei 1500 rpm 5 min lang zentrifugiert, in 10 ml Medium resuspendiert und 1/10 der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche zur weiteren Kultur eingesetzt.

Tab. 24: Zelllinien und ihre Medien.

Zelllinien	Medium
Frisch isolierte, primäre Tumorzellen	MCDB105 + Medium199 (1:1) (=“M+M”), 10% FCS, 1% Pen/Strep, 0,5% Na-Pyruvat
SKOV-3, OaW-42, PA-1, OVCAR-3, RPMI 8866, polyklonale NK-Zellen	RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 0,5% Na-Pyruvat
CCL-64/ -luc, HEK293	DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 0,5% Na-Pyruvat
NKL	RPMI 1640, 15% FCS, 1% Pen/Strep, 0,5% Na-Pyruvat
Primäre Immunzellen	X-VIVO 15

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeit-Archivierung wurden die Zellen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff in einem dafür konzipierten Flüssigstickstofftank gelagert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst, bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml frischem Einfriermedium aufgenommen. Die Konservierung erfolgte in Kryoboxen bei -80°C 24 h lang.

In diesen verringert sich die Temperatur um ca. 1 °C/ min, was ein langsames und Zell-schonendes Einfrieren bewirkt. Nach 24 h wurden die Zellen aus der Kryobox in den Stickstofftank überführt.

2.2.1.4 Isolierung von Tumorzellen aus frischem Aszites

Frischer Aszites von Tumorpatientinnen wurde bei 1500 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Ein Teil des Zell-freien Aszitesüberstandes wurde für spätere Verwendung (ELISA) weggefroren. Die Asziteszellen (Immunzellen, Epithelzellen, Tumorzellen,...) wurden in PBS gewaschen und Erythrozyten 3 min in ddH₂O lysiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Asziteszellen gezählt, ein Teil wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben eingefroren und ein Teil in eine bis mehrere 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml M+M-Medium sowie 15% Aszitesüberstand eingesät. Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage, wobei jeweils 15% des alten Mediums in der Flasche verblieb und frisches Medium supplementiert wurde. Angewachsene primäre Tumorzellen konnten so für ein bis drei Passagen kultiviert werden, bevor sie seneszent wurden. Als seneszent wurde definiert, wenn die Zellen einen flachen, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp annahmen und Konfluenz auch nach vier Wochen Kultur nicht mehr erreicht wurde.

2.2.1.5 Isolierung von peripheren humanen Lymphozyten aus Vollblut

Zur Isolierung von peripheren Blutlymphozyten („*peripheral blood lymphocytes*“, PBL) wurde 50 ml Vollblut aus der Armbeuge eines gesunden, allergiefreien Probanden durch einen Arzt entnommen. Zur Gerinnungshemmung wurde 10% steriler ACD-A-Citratpuffer in die Perfusor-Spritze vorgelegt. Das Vollblut wurde mit vorgewärmtem PBS (4/6) verdünnt und das verdünnte Blut auf 15 ml Biocoll geschichtet. Dieser sogenannte Biocoll-Leukozytendichtegradient (Abb. 19) wurde bei 600 rpm 20 min ohne Bremse in einer Schwingzentrifuge zentrifugiert. Vom Gradienten wurden 4 ml der obersten, Thrombozyten-haltigen Serumphase abgesaugt und danach weitere 30 min bei 1400 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Dichte der Immunzellen erfolgte so eine Auftrennung der verschiedenen Immunzellen und Blutbestandteile.

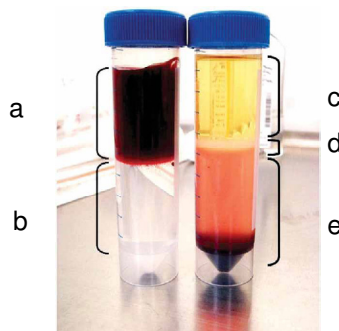


Abb. 19: Biocoll-Leukozytendichtegradient. Übersichtung von Biocoll (b) mit Vollblut (a) vor der Zentrifugation (links) und nach der Zentrifugation (rechts). Die Blutbestandteile teilen sich in die Phasen Plasma mit Thrombozyten (c), Lymphozyten und Monozyten (d) und Erythrozyten und Granulozyten (e) auf (McGuckin et al., 2008).

Der weiße Lymphozytenring wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in frische 50 ml Röhren überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 1800 rpm 8 min lang zentrifugiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS bei 1500 rpm gewaschen. Zur Adhärenz der monozytären Zellen aus dieser Fraktion erfolgte eine Inkubationsphase in einer Zellkulturschale bei 37°C 1 h lang. In dieser Zeit setzten sich monozytäre Zellen ab, während Lymphozyten im Überstand verblieben. Diese wurden nach vorsichtigem Abspülen der Platte mit PBS aufgenommen, in ein 15 ml Röhren überführt, gewaschen, in X-VIVO 15-Medium aufgenommen und gezählt. Die für Versuche benötigten PBL wurden wie jeweils angegeben in (96-, 24-, 12- oder 6-Well-) Platten eingesetzt.

2.2.1.6 Isolierung von NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen aus Vollblut mittels „magnetic activated cells sorting“ (MACS)-Technologie

PBL wurden wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben isoliert. Die isolierten Immunzellen wurden gezählt, durch ein 40 µm großes Nylonsieb filtriert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, und bei 300 x g und 8°C 10 min lang zentrifugiert. Die Markierung und Auftrennung der Zellen erfolgte entsprechend der Anleitung des „NK cell Isolation Kit II“ bzw. des „CD8 T cell Isolation Kit II“ von Miltenyi. Dabei wurden alle außer den gewünschten Zellen mit biotinylierten Antikörpern gegen die entsprechenden Oberflächenmarker markiert und anschließend mit eisenhaltigen anti-Biotin-Beads gefärbt. Die so markierten Immunzellen wurden auf eine LS-Säule geladen und im magnetischen Feld, in dem die markierten, unerwünschten Immunzellen zurückgehalten wurden, aufgetrennt. Die durchgelaufene Fraktion enthielt die gewünschten NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit MACS-Puffer wurden die aufgereinigten Zellen bei 1500 rpm 5 min lang zentrifugiert, gezählt und die Reinheit durchflusszytometrisch mittels CD3⁺CD56⁺- bzw. CD3⁺CD8⁺-Oberflächenmarkierung der aufgereinigten Zellfraktion gegen die ursprünglichen PBL überprüft. Nur Zellsuspensionen mit mindestens 80% Reinheit wurden für anschließende Versuche eingesetzt.

2.2.1.7 Herstellung von polyklonalen NK-Zell-Kulturen

RPMI 8866-Feeder-Zellen wurden in einer Gamma-Bestrahlungsanlage (Neurologische Universitätsklinik Würzburg) mit 30 Gy bestrahlt und dadurch teilungsunfähig gemacht. PBL wurden wie in Abschnitt 2.2.1.5 isoliert. Feeder-Zellen und PBL wurden im Verhältnis 1:4 in 500 µl RPMI 1640/10% FCS/1% P/S/0,5% Na-Pyruvat pro Well einer 24-Well-Platte eingesät und 8 Tage lang bei 37°C kultiviert. Am Tag 6 der Kultivierung wurde 500 µl frisches Medium pro Well supplementiert. Die teilungsunfähigen Feeder-Zellen produzierten während dieser Zeit Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die NK-Zellen der PBL-Fraktion aktivierten und zum klonalen Wachstum anregten. Zu beobachten war dies anhand der Zell-Cluster-Bildung in den Kulturen. Auf diese Weise hergestellte polyklonale NK-Zellkulturen konnten zwischen Tag 8 und 11 für Versuche verwendet werden. Die Reinheit der polyklonalen NK-Zell-Kulturen wurde mittels Oberflächenmarkerfärbung auf CD3⁻- und CD56⁺-Zellen

zum Zeitpunkt der Verwendung durchflusszytometrisch ermittelt. Es wurden nur NK-Zellkulturen mit mindestens 80% Reinheit verwendet.

2.2.1.8 Herstellung von Zellkulturüberständen

Für die Gewinnung von Zellkulturüberständen wurden 2×10^5 Zellen pro Well in eine 6-Well Platte eingesät. Nach Anwachsen der Zellen wurde das Medium gegen frisches Medium mit bzw. ohne FCS bzw. mit 0,5% BSA ausgetauscht. Die Zellen wurden so 72 h lang bei 37°C kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 2000 rpm 5 min abzentrifugiert. Ein Teil wurde bei -80°C eingefroren, der andere Teil des Überstandes wurde mittels Vivaspin-Konzentrationsröhrchen ca. 10-40fach konzentriert und die Gesamtproteinmenge mittels Bradford-Assay bestimmt.

2.2.1.9 Transfektion von OvCA-Zelllinien mit Plasmiden

Für die Transfektion von Plasmid-Vektoren wurden 5×10^4 Tumorzellen in 500 µl Medium pro Well einer 24-Well-Platte bzw. 10^4 Tumorzellen in 100 µl Medium pro Well einer 96-Well-Platte eingesät und ÜN anwachsen gelassen. Nach Mediumwechsel erfolgte die Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid. Dazu wurden 2 µg Plasmid-DNA in 100 µl Serum-freies Medium (SFM) aufgenommen und mit 5 µl FuGeneHD 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zu den Zellen eines Wells der 24-Well-Platte bzw. 5 µl des Ansatzes zu den Zellen eines Wells der 96-Well Platte tropfenweise unter Schwenken der Platte zugegeben. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel. Für stabile Transfektionen wurde 48 h nach der Transfektion das entsprechende Selektionsantibiotikum zugegeben. Für den transienten Ansatz wurden die transfizierten Zellen zwischen Tag 2 und 5 nach Transfektion für Versuche verwendet.

2.2.1.10 Transfektion von OvCA-Zelllinien mit siRNA

Zur Transfektion von siRNA wurden nur RNase-freie Plastikmaterialien und DEPC-H₂O-behandelte Glaswaren sowie Filterspitzen verwendet. Für die Transfektion wurden 10000 OvCA-Zellen pro Well einer 96-Well-Platte in 100 µl des entsprechenden Mediums eingesät und ÜN anwachsen gelassen. Für Ansätze im 24-Well- bzw. 6-Well-Plattenformat wurden entsprechend 5×10^4 bzw. 2×10^5 Zellen in 500 µl bzw. 2 ml Volumen eingesetzt. Vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Pro Well bzw. je Ansatz wurde 25 µl SFM mit 0,75 µl HiPerFect in einem Cap angesetzt und in einem zweiten Cap 25 µl SFM mit 0,075 µl siRNA (=50 nM Endkonzentration/Well). Der Ansatz des ersten Caps wurde zum Ansatz des zweiten Caps zugegeben, gemixt und 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Komplex-Bildung des Transfektionsreagenzes mit der siRNA. Unter vorsichtigem Schwenken der Platte wurde dieser Mix tropfenweise ins Well gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen bzw. der Überstand wurden 24-96 h nach Transfektion für Versuche herangezogen.

2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse von Immunzellen

2.2.2.1 Oberflächenmarkeranalyse von Immunzellen

Die Immunzellen wurden für die durchflusszytometrische Färbung in spezielle FACS-Röhrchen überführt und einmal in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen für Antikörper (Fc-Rezeptoren) wurden 20 min lang bei 4°C mit Beriglobinlösung - humanen Immunglobulinen - abgesättigt. Nach einmal Waschen in FACS-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bzw. mit dem direkt markierten Antikörper in entsprechender Konzentration (siehe Tab. 9) 30 min lang bei 4°C im Dunkeln. Nach zweimal Waschen in FACS-Puffer erfolgte gegebenenfalls die Inkubation mit dem entsprechenden markierten Sekundärantikörper weitere 30 min bei 4°C im Dunkeln sowie zwei weitere Waschstre. Zur Bestimmung von Immunzellsubpopulationen wurde mit den entsprechenden Antikörpern gegen die CD-Antigene 30 min bei 4°C im Dunkeln gegengefärbt (siehe Tab. 25) und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die gefärbten Zellen in 150-200 µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACScan oder FACSCalibur gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Analyseprogramm Summit (Dako Cytomation, Version 4).

Tab. 25: Bestimmung der Immunzellsubpopulation durch Gegenfärbung gegen CD-Antigene.

Immunzellsubpopulation	CD-Antigenspezifität	Antikörpergegenfärbung
NK-Zellen	CD3 ⁻ CD56 ⁺	anti-CD3/anti-CD56
CD8 ⁺ -T-Zellen	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻	anti-CD3/anti-CD8
CD4 ⁺ -T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	anti-CD3/anti-CD4
NKT-Zellen	CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	anti-CD3/anti-CD8/anti-CD56

2.2.2.2 Nachweis intrazellulärer Antigene in Immunzellen

Die Immunzellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben isoliert und 48 h lang mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren behandelt (Abschnitt 2.2.3.1). Gegebenenfalls erfolgte vor der Färbung für die Durchflusszytometrie eine Blockade des Golgi-Apparates mit Brefeldin A (Endkonzentration 10 µg/ml) bzw. Monensin (1:1000, 6 µg/ml). Vor der Färbung wurden die Immunzellen in FACS-Röhrchen transferiert und in FACS-Puffer gewaschen. Für die Intrazellulärfärbung wurden die PBL mit Kaninchenserum 15 min bei 4°C geblockt und anschließend die Oberflächenmarker CD3 und CD56 zur Bestimmung der NK-Zellsubpopulation mit anti-CD3-PeCy5 und anti-CD56-FITC 30 min bei 4°C gegengefärbt. Nach zweimaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen mit 100 µl PFA 4% 15 min bei 4°C im Dunkeln fixiert, um die zelluläre Struktur zu erhalten. Das PFA wurde anschließend durch zweimal Waschen mit PBA von den Zellen entfernt. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen mit Saponinpuffer 0,5% mit

Kaninchenserum (1:200) 15 min bei 4°C im Dunkeln behandelt. Direkt anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper gegen das intrazelluläre Antigen- bzw. mit dem Isotyp-Antikörper in Saponinpuffer mit Kaninchenserum (1:200) 30 min bei 4°C im Dunkeln. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Saponin-Puffer gewaschen und in 150 µl FACS-Puffer am FACScan bzw. FACSCalibur gemessen.

2.2.2.3 Nachweis von CD107a (nach Betts et al., 2003 & Alter et al., 2004)

Immunzellen wurden wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben isoliert und stimuliert. Zur Färbung wurden sie in 50 µl Medium ins FACS-Röhrchen aufgenommen. Anti-CD107a wurde direkt zu den Immunzellen ins Medium gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Direkt anschließend wurde Brefeldin A (10 µg/ml Endkonzentration) und Monensin (1:1000, 6 µg/ml) zum Ansatz zugegeben, um die Exozytose und das Ansäuern von Endosomen zu stoppen. Dieser Ansatz wurde weitere 5 h bei 37°C inkubiert. Nach einmal Waschen in FACS-Puffer wurde eine anti-CD56-FITC/anti-CD3-PeCy5 Gegenfärbung wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben durchgeführt (Alter et al., 2004).

Tab. 26: Intrazelluläre Antigene.

Intrazelluläres Antigen	Antikörper	Golgi-Blockade
Granzym B	anti-GranB-PE	-
Perforin	anti-Perforin	Brefeldin A, Monensin
CD107a	anti-CD107a-Alexa488	Brefeldin A, Monensin

2.2.3 Funktionale Bioassays

2.2.3.1 Behandlung von Immunzellen mit rekombinanten Zytokinen für funktionale Assays

Für funktionale Studien wurden Immunzellen wie in Abschnitt 2.2.1.5 bzw. 2.2.1.6 beschrieben isoliert. Entsprechend ihrer Verwendung wurden 1-5 Mio PBL bzw. NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen in 1 ml X-VIVO 15 pro Well einer 24-Well-Platte bzw. 0,01-0,15 Mio in 100 µl X-VIVO 15 pro Well einer 96-Well-Platte eingesetzt und mit 5 ng/ml rekombinantes humanes (rh)TGF-β1 bzw. soweit nicht anders angegeben mit 50 ng/ml rhGDF-15 48 h lang inkubiert. Vor der Verwendung für die Versuche wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

2.2.3.2 CCL-64-Bioassay

Für diesen Bioassay wurden CCL-64-Lungenepithelzellen vom Nerz verwendet, die mit dem p800neoluc Luziferase-Reporterplasmid transfiziert sind (Prof. D. Rifkin, New York University, NY), sowie CCL-64 ohne Plasmid. 10^4 CCL-64-Zellen wurden in 100 μ l Medium pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. rhTGF- β 1 und rhGDF-15 wurden in den Konzentrationen 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,156 ng/ml zu CCL-64-luc zugegeben bzw. rhGDF-15 in den Konzentrationen 200, 100, 50, 25, 12,5, 6, 25, 3,125 ng/ml zu CCL-64. Alle Ansätze wurden im Triplikат durchgeführt. Die Inkubation erfolgte 14 h lang bei CCL-64-luc bzw. 24 h-48 h lang bei CCL-64. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 20 min bei RT mit 50 μ l Reporterlysepuffer (CCL-64-luc) bzw. Kristallviolettlösung (CCL-64) pro Well behandelt und bei -20°C ÜN eingefroren (CCL-64-luc) bzw. überschüssiges Kristallviolett mit H₂O gewegewaschen und im Dunkeln getrocknet (CCL-64). Zur Messung wurden 25 μ l der lysierten CCL-64-luc pro Well in eine weiße Luminometerplatte umgesetzt und die Lumineszenz nach Zugabe des „Firefly“-Puffers am Luminometer gemessen. Zur Messung der Zelldichte der CCL-64 wurde der Assay mit 100 μ l 0,1 M Na-Citrat in 50% MetOH pro Well entwickelt und bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.2.3.3 Reporter-gen-Assay mit TGF- β -sensitiven Reporterplasmiden

10^4 OvCA-Zellen wurden in 100 μ l Medium pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und ÜN kultiviert. Die Transfektion der Reporterplasmide und des Kontrollplasmides (siehe Tab. 20) erfolgte mit FugeneHD wie in Abschnitt 2.2.1.9 beschrieben. Die Reporterplasmide wurden dafür mit dem Kontrollplasmid pRL-CMV im Verhältnis 5:1 co-transfiziert.

48 h nach Transfektion wurden 5 ng/ml rhTGF- β 1 bzw. 50 ng/ml rhGDF-15 zugegeben und die Zellen 6 h lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 20 min bei RT mit 50 μ l Reporterlysepuffer pro Well behandelt und bei -20°C ÜN eingefroren. Zur Messung wurden 25 μ l der lysierten Zellen pro Well in eine weiße Luminometerplatte umgesetzt und die Lumineszenz nach Zugabe von je 50 μ l „Firefly“- bzw. „Renilla“-Substrat-Puffers am Luminometer gemessen.

2.2.3.4 Assays zur Bestimmung von zytotoxischen und proliferativen Eigenschaften von GDF-15

2.2.3.4.1 Bestimmung der Zytotoxizität mittels Kristallviolett-Assay

10^4 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden eingesetzt und 24 h oder 48 h lang mit Zytokinen wie im jeweiligen Versuch angegeben inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 200 μ l PBS pro Well gewaschen und trocken geklopft. Pro Well wurden 50 μ l Kristallviolettlösung in MetOH 20 min lang zugegeben. In dieser Zeit erfolgte die Färbung der Zellen. Überschüssiges Kristallviolett wurde unter fließendem Wasser oder im Wasserbad wegewaschen. Die Platten wurden ÜN getrocknet. Zur

Messung wurde 100 µl Na-Citrat in MetOH pro Well zugegeben, um das Kristallviolett zu lösen und nach 10 min Inkubation die Optische Dichte (OD) im ELISA-Reader bei 570 nm gemessen.

2.2.3.4.2 Bestimmung der Proliferation mittels BrdU-Assay (Roche)

Der Assay misst den Einbau von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in die DNA, was als Maß für die Zellproliferation dient (entsprechend dem ³H-Einbau in die DNA). Der Einbau von BrdU wird mittels anti-BrdU-Antikörper detektiert, der wiederum an eine Luziferase gekoppelt ist. Nach Zugabe des Substrates für die Luziferase kann dessen Umsatz (chemi-) luminometrisch bei 405 nm im ELISA-Reader nachgewiesen werden. Die Lumineszenz ist proportional zum BrdU-Einbau.

10⁴ Zellen in 100 µl Medium wurden pro Well einer (schwarzen) 96-Well-Platte eingesetzt und 24 bzw. 48 h inkubiert (wenn angegeben wurde zusätzlich 24 h lang mit entsprechenden Zytokinen vorbehandelt). 14 h vor Ablauf der 24 bzw. 48 h wurden 10 µl BrdU-Lösung pro 100 µl zugegeben und 14 h inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen in der Platte bei 60°C 1 h getrocknet. Zur Fixierung wurden 200 µl FixDenat-Lösung pro Well zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Die Fixierung wurde entfernt, 100 µl anti-BrdU-POD Antikörperlösung für 90 min pro Well zugegeben und bei RT inkubiert. Nach dreimal 5 min Waschen mit je 250 µl Waschlösung pro Well und Zugabe von 100 µl Substratlösung pro Well wurde der Assay am Luminometer gemessen.

2.2.3.4.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-Assay (Roche)

Prinzip des Assays ist die kolorimetrische Umsetzung des Tetrazoliumsalses WST, was einen Rückschluss auf die Viabilität der Zellen zulässt, da WST als Akzeptor in der Atmungskette fungieren kann. Die gemessene Färbung beruht auf der Reduktion von WST, die nur in metabolisch aktiven (=viablen) Zellen erfolgt. Es wurden 10⁴ Zellen in 100 µl Medium pro Well in eine 96-Well-Platte eingesät und 24 bzw. 48 h lang inkubiert (wenn angegeben wurde zusätzlich 24 h lang mit entsprechenden Zytokinen behandelt). Anschließend wurden 10 µl pro Well WST-Reagenz zugegeben und 1 h bei 37°C weiterinkubiert. Danach wurde die Umsetzung des Reagenzes bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt.

2.2.3.4.4 Lyseassay mit SKOV-3-fluc OvCA-Targetzellen

Für die Lyse wurden polyklonale NK-Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.7 beschrieben hergestellt, wenn angegeben mit Zytokinen vorbehandelt und für die Lyse als Effektoren am Tag 10 verwendet. Als Targets wurden 10⁴ SKOV-fluc OvCA-Zellen in 100 µl RPMI 1640-Medium mit 10% FCS/1% P/S/0,5% Na-Pyruvat in weiße 96-Well-Luminometerplatten eingesät und ÜN anwachsen gelassen. Die Effektoren wurden im jeweils angegebenen Verhältnis \underline{E} (ffektor): \underline{T} (arget) zu den Targetzellen im Endvolumen von 100 µl gegeben und 100 min lang bei 37°C inkubiert. 20 min vor der Messung

wurden 3,125 µl Luziferin (Stock 20 mM) in 21,875 µl PBS pro Well zugegeben und der Lyseansatz weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der emittierten Photonen, die durch die Umsetzung des Luziferins durch die auf dem fluc-Plasmid codierten Luziferase entstanden, erfolgte stündlich im Luminometer bis 8 h nach Zusammensetzen der Effektoren zu den Targets. Nur (noch) nicht lysierte Tumorzellen waren im Stande diese ATP-abhängige Reaktion durchzuführen. Als nicht lysierte Kontrollen wurden SKOV-3-fluc verwendet, die mit dem Zellkulturüberstand der NK-Zelllinie NKL behandelt wurden (Brown et al., 2005).

2.2.3.4.5 Lyseassay mit CFSE-gefärbten OvCA-Zellen und PKH26-gefärbten Effektoren

Für die Lyse wurden polyklonale NK-Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.7 beschrieben hergestellt, wenn angegeben mit Zytokinen vorbehandelt und für die Lyse als Effektoren am Tag 10 verwendet. Die OvCA-Target-Zellen wurden mit dem Farbstoff CFSE (**C**arboxy**f**luorescein**s**uccinimidylester) 3 min lang bei 37°C gefärbt, die Reaktion wurde dann 10 min bei 37°C mit FCS abgestoppt und die Zellen anschließend dreimal in RPMI 1640-Medium gewaschen. 10⁵ gefärbte Target-Zellen wurden pro Well einer 24-Well-Platte ÜN in 500 µl Medium eingesetzt. Die Effektoren wurden im jeweils angegebenen Verhältnis E:T zu den Targetzellen im Endvolumen von 500 µl gegeben und 4 h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht lysierten Target-Zellen mit Accutase abgelöst und zusammen mit den toten Target-Zellen aus dem Überstand im Kanal FI 1 im FACScan gemessen. Als Kontrollen dienten nicht lysierte CFSE-gefärbte OvCA-Zellen.

2.2.3.4.6 Apoptoseinduktion in Immunzellen

Immunzellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1.5 bzw. 2.2.1.6 beschrieben isoliert, gegebenenfalls 24 h mit IL-2 oder 2 µg/ml PHA voraktiviert und 24 oder 48 h lang mit rGDF-15 in angegebener Konzentration behandelt. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch die Behandlung der Immunzellen mit FasL bzw. TNF-α bzw. TRAIL in jeweils angegebener Konzentration 4 h lang. Die Zellen wurden anschließend 15 min in 50 µl Annexin-Puffer mit Annexin-V-FITC (1:50) und 7-AAD (1:40) bei RT im Dunkeln gefärbt und ohne weiteres Waschen in 200 µl Annexin-Puffer im FACS analysiert.

Für die Untersuchung von fratrizider Apoptose wurden PBL mit 20 µg/ml anti-TRAIL bzw. anti-FasL 1 h lang vorbehandelt, anschließend 24 h mit 5 µg/ml PHA aktiviert und zusätzlich mit oder ohne 200 ng/ml GDF-15 inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose anhand der Annexin V-Färbung wie oben beschrieben in der Durchflusszytometrie bestimmt.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Protein aus Zellkulturüberständen

Zellkulturüberstände wurden wie in Abschnitt 2.2.1.8 beschrieben serumfrei hergestellt und für Western Blot bzw. für Zellstimulationsversuche mit Vivaspin-5000MW-Zentrifugationsröhrchen bei 4000 rpm 20 min bei RT zentrifugiert. Die Proteinbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.3 angegeben.

2.2.4.2 Herstellung von Zelllysaten aus Tumorzellen und -gewebe

1-10 Mio PBL oder Tumorzellen wurden bei 1500 rpm zentrifugiert, einmal in PBS mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (2 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml PMSF, 50 mM NaF, 200 µM NaVO₅, jeweils Endkonzentration und 1 x Phospho-Stopp) gewaschen und in 1 ml Lysepuffer-P mit den o.g. Inhibitoren 20 min auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen wurden bei 13000 x g 15 min lang bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in neue Caps überführt. Im Anschluss wurde die Gesamtproteinmenge des Lysats im Bradford-Assay bestimmt.

Tumorgewebe, das bis zur Isolierung bei -80°C gelagert wurde, wurde mit Mörser und Pistill unter flüssigem N₂ zu einem feinen Pulver zerrieben und anschließend in 1 ml Lysepuffer-P mit den o.g. Inhibitoren aufgenommen. Die Proteinisolierung erfolgte analog zu den Tumorzellen.

2.2.4.3 Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in einem Zelllysate erfolgte mittels Bradford-Assay. Dabei nutzt man die Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G250, Komplexe mit Proteinen zu bilden und damit eine photometrisch detektierbare Farbreaktion hervorzurufen. In eine 96-Well-Platte wurde je 50 µl dH₂O pro Well vorgelegt und je 1 µl Proteinlösung bzw. Proteinstandard (HSA) in 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µg/ml im Triplikate aufgetragen. Das fertig angesetzte Bradford-Reagenz Rotiquant wurde 1:3,75 mit dH₂O verdünnt und je 200 µl pro Well zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Gesamtproteinmenge anhand des Proteinstandards im ELISA-Reader bei 595 nm bestimmt.

2.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Entsprechend der Größe der zu detektierenden Proteine wurde die Konzentration der Polyacrylamidgele gewählt (siehe Tab. 27):

Tab. 27: Proteine und ihre Polyacrylamidkonzentration in der SDS-PAGE.

Protein	Polyacrylamid-Konzentration	Block- bzw. Primär-Antikörper-Lösung
GDF-15, TGF- β 1, 2, 3	12 -15%	TS-TMBSA
pAKT, AKT	10%	5% M-TBS-T
Perforin	10%	TS-TMBSA
pERK1/2, ERK1/2	10%	5% M-TBS-T
pSMAD2/3, SMAD 2/3	10%	5% M-TBS-T
pJNK1/2, JNK1/2	10%	5% BSA-TBS-T
p38/MAPK	12%	5% M-TBS-T
pSTAT1/STAT1	10%	5% M-TBS-T
pSTAT3/STAT3	10%	5% M-TBS-T

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese („*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“, SDS-PAGE) wurden standardmäßig 20 μ g Gesamtprotein geladen. Dazu wurden die Proteinprobe mit 3 μ l reduzierendem 5 x-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend 3 min auf Eis abgeschreckt und abzentrifugiert. Die Proteinsuspension wurde mit Hilfe von Gel-Loading-Tips in die Taschen des Polyacrylamidgels geladen. Pro Gel wurde zur Größenbestimmung 8 μ l des vorgefärbten SeeBlue®2 Größenstandard aufgetragen. Der Proteinlauf erfolgte bei 100 V 20 min zum Sammeln der Proteinfront im Sammelgel, dann weitere 100 min bei 130 V und einem Widerstand von 150 Ω .

2.2.4.5 Western Blot

Für den Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden die SDS-PAGE-Gele nach abgeschlossener Proteinauftrennung 15 min in Transferpuffer äquilibriert und im Sandwich Blotter 80 - 90 min - je nach Proteingröße - bei 150 V und 150 Ω transferiert. Der Transfer erfolgte im Eisbad. Nach Abschluss des Transfers wurde die Qualität des Proteintransfers mittels Ponceau-Rot-Färbung kontrolliert. Ponceau-Rot lagert sich unspezifisch an Proteine an. Die Membranen wurden dafür 3 min in Ponceau-Lösung geschwenkt und anschließend 10 min lang in dH₂O und weiteren 10 min in TBS-T entfärbt. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese, abhängig vom verwendeten Antikörper, 2 h bei RT in TS-TMBSA, 5% BSA-TBS-T oder 5% M-TBS-T geblockt. Vor der Antikörperinkubation wurden die Membranen 10 min in TBS-T gewaschen. Die Antikörperinkubation erfolgte rollend bei 4°C ÜN in TS-TMBSA, 5% BSA-TBS-T oder 5% M-TBS-T (abhängig vom verwendeten Antikörper). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranen dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in 5% M-TBS-T 2 h lang bei RT. Nach der Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die Membranen dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion der HRP-Aktivität wurden pro Membran 1 ml ECL-Lösung A mit 100 μ l ECL-Lösung B

und 0,6 µl H₂O₂ gemischt und die Membranen damit 2 min inkubiert. Überschüssige ECL-Lösung wurde anschließend auf Zellstofftücher abgetropft und die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen. Röntgenfilme wurden in Entwicklerkassetten durch die Lumineszenz der Membranen belichtet. Die Filmentwicklung erfolgte im Entwicklungs- (1-5 min) und Fixierlösungsbad (1 min) im Dunkeln.

2.2.4.6 GDF-15-ELISA (R&D Systems)

Zur Detektion von GDF-15 im Zellkulturüberstand, Aszites oder Serum wurde der „*DuoSet ELISA Development System - human GDF-15-Kit*“ von R&D Systems verwendet. Eine Nunc-Maxi-Sorp-ELISA-Platte wurde mit 2 µg/ml Capture-Antikörper in 100 µl Volumen pro Well ÜN bei RT beladen. Nach Inkubation wurde die Platte mit 300 µl Waschpuffer pro Well dreimal gewaschen und ausgeklopft und zum Blocken mit 300 µl PBS/1% BSA pro Well 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten wieder drei Waschschrte. 100 µl der Proben bzw. Konzentrations-Standards (4 ng/ml – 0,03125 ng/ml) sowie der Leerkontrolle wurden in Duplikaten aufgetragen und 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit 50 ng/ml Detektionsantikörper 2 h bei RT und nach weiterem Waschen die Inkubation mit 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung 20 min lang bei RT. Zur Entwicklung wurden nach weiteren Waschschrten 100 µl TMB-Lösung mit H₂O₂ (1:5000) pro Well zugegeben und weitere 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 N H₂SO₄ pro Well abgestoppt und im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

2.2.4.7 „Human Phospho-Immuneceptor Array“ (R&D Systems)

Immunzellenzellen von drei gesunden Spendern wurden einmal mit PBS gewaschen und entsprechend den Herstellerangaben 10 Mio Zellen in 1 ml Lysepuffer-15 30 min lang bei 4-8°C lysiert. Das Zelllysat wurde 5 min bei 14000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Cap transferiert und auf 1,5 ml mit Arraypuffer 1 aufgefüllt. Eine Proteinbestimmung wurde durchgeführt und pro Donor je 166,67 µg Protein eingesetzt. Je eine Arraymembran (Rezeptor-Koordinaten siehe Tab. 28) wurde in 1 ml Arraypuffer 1 h lang unter Schwenken geblockt. Die Inkubation der Arraymembran mit der Lysatlösung erfolgte ÜN bei 4°C schwenkend. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Tyrosin-HRP erfolgte 2 h bei RT unter Schwenken. Nach dreimaligem Waschen wurde die Arraymembran mit ECL-Lösung entwickelt.

Tab. 28: Phospho-Immunozeptor-Array: Rezeptor-Koordinaten.

Koordinaten	Rezeptor	Koordinaten	Rezeptor	Koordinaten	Rezeptor
A 1, 2	*PY-Kontrolle	C 11, 12	FcRH2/IRTA4	E 13, 14	SHP-1
A 3, 4	**Bt Kontrolle	C 13, 14	FcRH4/IRTA1	E 15, 16	SHP-2
A 5, 6	2B4/SLAMF4	C 15, 16	FcRH5/IRTA2	E 17, 18	Siglec-2/CD22
A 7, 8	BLAME/ SLAMF8	C 17, 18	ILT2/CD85j	E 19, 20	Siglec-3/CD33
A 9, 10	BTLA4	C 19, 20	ILT3/CD85k	E 21, 22	Siglec-5
A 11, 12	CD3ε	C 21, 22	ILT4/CD85d	E 23, 24	Siglec-7
A 13, 14	CD5	C 23, 24	ILT5/CD85a	F 1, 2	Siglec-9
A 15, 16	CD6	D 1, 2	ILT6/CD85e	F 3, 4	Siglec-10
A 17, 18	CD28	D 3, 4	Integrinβ3/CD61	F 5, 6	SIRP-β1
A 19, 20	CD84/ SLAMF5	D 5, 6	KIR2DL4	F 7, 8	SLAM/CD150
A 21, 22	**Bt-Kontrolle	D 7, 8	LAIR-1	F 9, 10	TREM-1
A 23, 24	*PY-Kontrolle	D 9, 10	LAIR-2	F 11, 12	TREM-2
B 5, 6	CD229/ SLAMF3	D 11, 12	LMIR-1/CD300a	F 13, 14	TREML1/TLT1
B 7, 8	CEACAM-1	D 13, 14	LMIR2/CD300c	F 15, 16	Goat-IgG
B 9, 10	CLEC-1	D 15, 16	LMIR3/CD300f	F 17, 18	mouse-IgG ₁
B 11, 12	CLEC-2	D 17, 18	LMIR6/CD300le	F 19, 20	mouse-IgG _{2a}
B 13, 14	CRACC/ SLAMF7	D 19, 20	MDL-1/CLEC5a	F 21, 22	mouse-IgG _{2b}
B 15, 16	CTLA-4/ CD152	D 21, 22	NKp30/NCR3	F 23, 24	mouse-IgG ₃
B 17, 18	DCIR/CLEC- 4a	D 23, 24	NKp44/NCR2	G 1, 2	*PY-Kontrolle
B 19, 20	Dectin-1/ CLEC-7a	E 1, 2	NKp46/NCR1	G 3, 4	**Bt-Kontrolle
C 1, 2	DNAM-1	E 3, 4	NKp80/KLRF1	G 5, 6	rat-IgG ₁
C 3, 4	Fcε RII/CD23	E 5, 6	NTB-A/SLAMF6	G 7, 8	rat-IgG _{2a}
C 5, 6	FcγRIIa	E 7, 8	PD-1	G 9, 10	rat-IgG _{2b}
C 7, 8	FcγRIIIa/b	E 9, 10	PECAM/CD31	G 11, 12	PBS
C 9, 10	FcRH1/IRTa5	E 11, 12	SHIP-1		

*PY= Phospho-Tyrosin Positivkontrolle, **Bt= Biotinylierte Kontrolle

2.2.5 Methoden zur Analyse und Manipulation der Genexpression

2.2.5.1 Isolierung von RNA aus Tumor- und Immunzellen

Tumorzellen wurden nach dem Ablösen einmal mit PBS gewaschen. 1 -10 Mio Tumorzellen bzw. PBL wurden in 1 ml Trizol-Reagenz resuspendiert und 5 min bei 4°C inkubiert. 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol wurde zugegeben, 15 sec. geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt RNA, die weiße Interphase DNA und die untere organische Phase Protein. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Cap transferiert, mit gleichem Volumen Isopropanol aufgefüllt und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde bei 12000 x g 15 min lang bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 75% EtOH bei 7500 x g 5 min gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 45 µl DEPC-H₂O aufgenommen und evtl. vorhandene DNA mit DNase I verdaut.

2.2.5.2 DNA-Restriktion und RNA-Fällung

Nach RNA-Isolierung wurde evtl. vorhandene DNA mit DNase I für 20 min in Natrium-Acetat-Lösung mit MgCl₂ bei RT verdaut. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 8 und die RNA mit 250 µl 100% EtOH pro 100 µl Volumen gefällt. Anschließend wurde 15 min bei 13000 x g bei 4°C zentrifugiert und einmal mit 250 µl 70% EtOH gewaschen. Die gefällte RNA wurde nach dem Trocknen in 15 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Es folgte Konzentrationsbestimmung am Photometer und RNA-Qualitätskontrolle mittels RNA-Gelelektrophorese.

2.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die isolierte und gefällte RNA wurde 1:100 in DEPC-H₂O verdünnt und die Absorption im Photometer bei 260 und 280 nm gegen DEPC-H₂O gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$C [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Aus dem Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀nm konnte die Verunreinigung der Probe abgeschätzt werden.

2.2.5.4 RNA-Gelelektrophorese

Für ein 1%iges Agarosegel wurde Agarose mit DEPC-H₂O aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 70°C wurde 10% 10x MOPS, 27 ml Formaldehydlösung (37%) sowie GelRed 1:10000 zugegeben und das Gel gegossen. Nach Aushärtung wurden 0,5 µg RNA in 12 µl Formaldehyd/Formamid-Mix und 6 x Ladepuffer 5 min lang bei 70°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und dann auf das Gel geladen. Die

Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V 45 min lang. Die Qualität der RNA konnte anhand der Visualisierung der 28s- und 18s-rRNA- Banden unter UV-Licht beurteilt werden.

2.2.5.5 Synthese von cDNA aus RNA (BioRad)

Für die Synthese von cDNA aus RNA wurde der „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ verwendet. Die Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt.

Tab. 29: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Ansatzes und Reaktionsablauf.

Komponente	Volumen
5 x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
RNA Template	1 µg
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl

Reaktionsablauf cDNA-Synthese:

Temperatur	Inkubationszeit
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min

2.2.5.6 „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

Die Synthese der cDNA wurde mittels GAPDH- und β-Aktin-PCR überprüft. Dafür wurde die cDNA als Template in der PCR eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit dem AmpliTaq-PCR-Kit im Thermocycler durchgeführt.

Tab. 30: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und Reaktionsablauf.

Komponente	Volumen
10 x AmpliTaq Puffer	2,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
100 µM Primer forward	0,125 µl
100 µM Primer reverse	0,125 µl
cDNA	0,25 µl

AmpliTaq (als letztes zugegeben)	0,125 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Reaktionsablauf der PCR:

Temperatur	Inkubationszeit	
94 °C	3 min	35 Zyklen
94 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	45 sec	
72 °C	10 min	
4 °C	hold	

2.2.5.7 DNA-Gelelektrophorese

Für die Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1%iges mit GelRed gefärbtes Gel mit 10 µl des PCR-Ansatzes und 2 µl 6 x DNA-Ladepuffer beladen und in 0,5 x TAE-Puffer ca. 45 min bei 80 V laufen gelassen. Zur Größenbestimmung wurde der TrackIt 100 bp Größenstandard von Invitrogen verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung wurde unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

2.2.5.8 Semi-quantitative Real Time PCR

Für die semiquantitative Real Time PCR (qRT-PCR) wurde der ABI Power SybrGreen Kit mit dem internen Standard Rox verwendet.

Tab. 31: Zusammensetzung des qRT-PCR-Ansatzes und Reaktionsablauf.

Komponente	Volumen
2 x Power SybrGreen-Mix	7,5 µl
Primer forward (5 µM bzw. 2 µM 18srRNA)	0,9 µl
Primer reverse (5 µM bzw. 2 µM 18srRNA)	0,9 µl
Aqua ad iniectionabilia	0,7 µl
cDNA (1:20 in Aqua ad iniectionabilia)	5 µl

Die qRT-PCR wurde im ABI TaqMan 7500 nach folgendem Schema durchgeführt:

Temperatur	Inkubationszeit
50 °C	2 min
95 °C	10 min

95°C	15 sec		40 Zyklen
60°C	1 min		
95°C	15 sec		Dissoziationskurve
60°C	1 min		
95°C	15 sec		

Die Reinheit der PCR-Produkte wurde mittels Dissoziationskurve überprüft. Für die Auswertung wurden nur die Duplikate verwendet, bei denen die Abweichung der C_t -Werte $\leq 0,5$ Zyklen war. Die relative Expression wurde mit der Expression der 18s-rRNA und mit der Expression der unbehandelten Kontrolle bei PBL bzw. der Expression von gesundem Ovar abgeglichen und nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet.

2.2.5.9 Analyse der Genexpression von GDF-15-behandelten NK-Zellen

NK-Zellen von 6 gesunden Donoren wurden mit dem „NK Cell Isolation Kit II“ von Miltenyi wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben isoliert, mit 30 U/ml IL-2 16 h stimuliert und anschließend weitere 6 h bzw. 24 h lang mit oder ohne 50 ng/ml GDF-15 (R&D Systems) behandelt. Zusätzlich wurden NK-Zellen 24 h lang mit 5 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Analog zu den NK-Zellen wurden CD8⁺-T-Zellen mit dem „CD8 T Cell Isolation Kit II“ von Miltenyi isoliert, mit IL-2 vorstimuliert und 24 h lang mit 5 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Aliquots der Zellen wurden für Kontrollexperimente (NKG2D-Regulation durch GDF-15 bzw. TGF- β 1, pSMAD2-Western Blot) entnommen, um die Aktivität der verwendeten Zytokine zu überprüfen. Nach der Behandlung wurden die Zellen pelletiert, in 100 μ l PrepProtect aufgenommen und die verschiedenen Donor-NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen gepoolt. Diese Proben wurden bei 4°C an Miltenyi geschickt, wo zunächst die RNA isoliert, umgeschrieben, fluoreszenzmarkiert und dann auf Agilent „whole genome arrays“ hybridisiert wurde.

2.2.5.10 Analyse der Genexpression im „Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray“ (Miltenyi)

Alle Arbeiten zur Hybridisierung und Messung der Genexpression im Oligo Microarray wurden von der Firma Miltenyi durchgeführt. Wir erhielten die vollständigen Rohdaten sowie eine Auswahl regulierter Kandidatengene.

Die RNA wurde mit NucleoSpin® RNA II, Macherey-Nagel isoliert, die Qualität der RNA mittels Agilent 2100 Bioanalyzer geprüft, bevor Cy3 bzw. Cy5 gelabelte cRNA mittels Agilent „Low RNA Input Linear Amp Kit“ (Agilent Technologies) synthetisiert wurde. GDF-15 behandelte NK-Zell-cRNA wurde mit der cRNA der unbehandelten Kontroll-NK-Zellen mit dem „Agilent Gene Expression Hybridization Kit“ (Agilent Technologies) auf den „Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray 4x44K“ ÜN hybridisiert. Fluoreszenzsignale wurden mittels DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies)

detektiert. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der „*Agilent Feature Extraction Software*“ (FES) und der „*Rosetta Resolver® gene expression data analysis system*“ (Rosetta Biosoftware).

2.2.6 Methoden für das Arbeiten mit Bakterien

2.2.6.1 Transformation von kompetenten Bakterien

Um die zur Transfektion benötigten Plasmide zu vervielfältigen wurden diese in NEB 5- α Bakterien amplifiziert.

Aliquots der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 0,5 μ g von dem zu amplifizierenden Plasmid wurde steril zu den Bakterien gegeben, gemixt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Plasmide wurden die Bakterien 2 min bei 42°C geschockt, dann 3 min auf Eis abgeschreckt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 1 h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 100 μ l der Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

Angewachsene Klone wurden zunächst in einer Vorkultur (3 ml LB-Medium inklusive Selektionsantibiotikum) 6 h bei 37°C bei 300 rpm geschüttelt bevor diese Kultur 1:100 in 200 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum ÜN weiter geschüttelt wurde.

2.2.6.2 Endotoxinfreie Plasmidpräparation

Von der angewachsenen Hauptkultur wurde zunächst ein 1 ml Glycerolstock (1:2 in 80% Glycerol) zur Konservierung bei -80°C angelegt. Die Bakterien aus der kompletten Hauptkultur wurden bei 3000 x g 20 min lang bei 4°C zentrifugiert und geerntet. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem „*EndoFree Plasmid Midi-Kit*“ entsprechend der Angaben des Herstellers Qiagen. Die Bakterien wurden in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, dann mit 10 ml Puffer P2 5 min lysiert und schließlich mit 10 ml Puffer P3 gefällt. Das Lysat wurde auf die 1. Säule aufgetragen und durch Filtration vorgereinigt, dann mit 2,5 ml Puffer ER 30 min auf Eis inkubiert. Nach Äquilibrierung der 2. Säule mit 10 ml QBT-Puffer wurde das Bakterien-Lysat auf die 2. Säule geladen und 2 x mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Abschließend wurde die DNA mit 15 ml QN-Puffer von der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA wurde in 0,7 Vol Isopropanol präzipitiert und bei 5000 x g 45 min bei 4°C zentrifugiert, dann einmal mit 70% EtOH gewaschen und das DNA-Pellet 10 min bei RT getrocknet, bevor es in 500 μ l TE Puffer aufgenommen wurde. Die Quantifizierung des aufgereinigten Plasmids erfolgte am Photometer bei 260 nm; die Qualität der Aufreinigung wurde anhand der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt, sowie anhand einer Kontroll-Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und anschließenden DNA-Gels überprüft.

2.2.6.3 DNA-Restriktion

Zur Überprüfung der Sequenz wurde das Plasmid mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten und die Größe der Fragmente auf einem Agarosegel überprüft.

Tab. 32: Restriktionsverdau von Plasmiden.

Komponente	Menge	
Plasmid	0,5 µg	1 h, ** °C
Restriktionsenzym(e)*	5 U	
Restriktionspuffer 10 x	2,5 µl	
dH ₂ O	ad 25 µl	

* entsprechend der Restriktionsschnittstellen im Plasmid

** entsprechend der verwendeten Restriktionsenzyme

2.2.7 Statistische Analyse

Soweit nicht anders angegeben wurden die Experimente mindestens dreimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. Zur Bestimmung, eines signifikanten Unterschiedes zwischen zwei Gruppen wurde der t-test (Excel) herangezogen. Dieser bestimmt unter Annahme der Normalverteilung in wie weit die Mittelwerte zweier Gruppen relativ zu ihrer Variabilität statistisch signifikant unterschiedlich sind. Soweit nicht anders angegeben wurde der einseitig gepaarte t-test angewandt. Als statistisch signifikant wurde angesehen, wenn die statistische Analyse $p \leq 0,05$ ergab (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html>).

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression von GDF-15 im Ovarialkarzinom

GDF-15 ist, anders als andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, unter physiologischen Bedingungen wenig verbreitet exprimiert. Außer in der Plazenta wurden nur geringe Konzentrationen von GDF-15 in gesundem Gewebe nachgewiesen (Li et al., 2005; Marjono et al., 2003). Anders dagegen bei onkogener Transformation: hier wird GDF-15 u.a. in Tumoren der Brust, der Prostata und des Kolons sowie bei gastrointestinalen Tumoren erhöht exprimiert, nicht aber im entsprechenden gesunden Gewebe (Brown et al., 2006; Lee et al., 2003; Schober et al., 2001; Welsh et al., 2003). Die Studie von Welsh et al. zeigte zudem, dass GDF-15 das am stärksten überexprimierte Zytokin in den dort untersuchten Tumorgeweben war, was von Nakamura et al. bestätigt wurde (Nakamura et al., 2003). Bislang lagen keine Daten zur GDF-15-Expression im Ovarialkarzinom (OvCA) vor. Daher sollte im Folgenden die Expression von GDF-15 im OvCA-Gewebe, in primären, aus OvCA-Aszites isolierten Tumorzellen und in OvCA-Zelllinien untersucht werden.

3.1.1 Genexpression von GDF-15 und TGF- β im Ovarialkarzinom

TGF- β ist an wichtigen physiologischen Vorgängen wie der Wachstumsregulation und der Zelldifferenzierung beteiligt. Aber auch pathogene Prozesse, insbesondere die Tumorgenese, werden durch TGF- β beeinflusst (Massague, 2008). Im OvCA sind Komponenten des TGF- β -Signalwegs häufig mutiert, was eine autokrine Inhibition des Tumorwachstums durch TGF- β praktisch ausschließt (Wang et al., 2000; Yamada et al., 1999). Es sollte die Frage geklärt werden, ob TGF- β und andere TGF- β -Familienmitglieder im OvCA transkriptionell exprimiert sind und dadurch einen Einfluss auf die Tumorprogression haben könnten.

Dazu wurde RNA aus OvCA-Gewebe bzw. gesundem Ovar als Referenz isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels semi-quantitativer Real Time (qRT)-PCR untersucht. Die Expressionsänderung von TGF- β 1, 2 und 3 wurde auf ihre Expression im gesunden Ovar bezogen und mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Scheffe et al., 2006).

Während die Transkriptionsaktivitäten von TGF- β 2 und 3 im OvCA im Vergleich zu gesundem Ovar kaum verändert waren (relative Expressionsänderung TGF- β 2: +5,2; C_T -Werte: 19 - 30 bzw. TGF- β 3: +1,7; C_T -Werte: 21 - 30), wurde für TGF- β 1 eine fast 200fache Erhöhung der Transkriptionsaktivität im Vergleich zu gesundem Ovar gemessen (relative Expressionsänderung TGF- β 1: +191, C_T -Werte: 6 - 29) (Abb. 20: Genexpression von TGF- β -Familienmitgliedern im OvCA-Gewebe). Die Expressionsänderung von TGF- β 1 schwankte von +5 bis über $+2,4 \cdot 10^7$ im OvCA gegenüber normalem Ovar. Da Tumore heterogene Zellhaufen sind und in jedem Patienten individuelle Unterschiede auftreten, war die Schwankung nicht ungewöhnlich. TGF- β 1 war von den drei TGF- β Isoformen somit das Gen mit der am stärksten veränderten Transkriptionsaktivität.

Die Expression von GDF-15 wurde erst kürzlich in verschiedenen Tumoren, z.B. im Kolon-CA, im Prostata-CA, im Mamma-CA, im Melanom und im Magen-CA beschrieben (Baek et al., 2009; Boyle et al., 2009; Welsh et al., 2003). Daher ist zu vermuten, dass GDF-15 auch in weiteren Tumoren wie beispielsweise dem OvCA exprimiert sein könnte. Die Expression von GDF-15 wurde im OvCA analog zu TGF- β untersucht. GDF-15 war im OvCA-Gewebe um mehr als 2500fach stärker transkribiert als im gesunden Ovar (relative Expressionsänderung GDF-15: +2629, C_t -Werte: 6 - 35). Die Werte der Expressionsänderung schwankten von +2 bis zu $6,4 \cdot 10^9$. Dabei fiel auf, dass die Tumore, die GDF-15 hoch exprimierten, auch eine hohe TGF- β 1-Expression hatten, die jedoch immer unter derjenigen von GDF-15 lag. Diese direkte Korrelation von GDF-15 und TGF- β 1 im OvCA spiegelte sich auch im Korrelationskoeffizienten von 0,999 wieder. Zudem ist diese Korrelation spezifisch für GDF-15 und TGF- β 1; gegenüber den anderen TGF- β -Isoformen ergab sich keine Korrelation.

Verglichen mit der Expressionsänderung der drei TGF- β Isoformen war GDF-15 somit das am stärksten überexprimierte Gen der hier untersuchten TGF- β -Familienmitglieder im OvCA und damit fast 13 Mal stärker überexprimiert als TGF- β 1, das als Prototyp-Zytokin der TGF- β -Familie gilt (Abb. 20: Genexpression von TGF- β -Familienmitgliedern im OvCA-Gewebe).

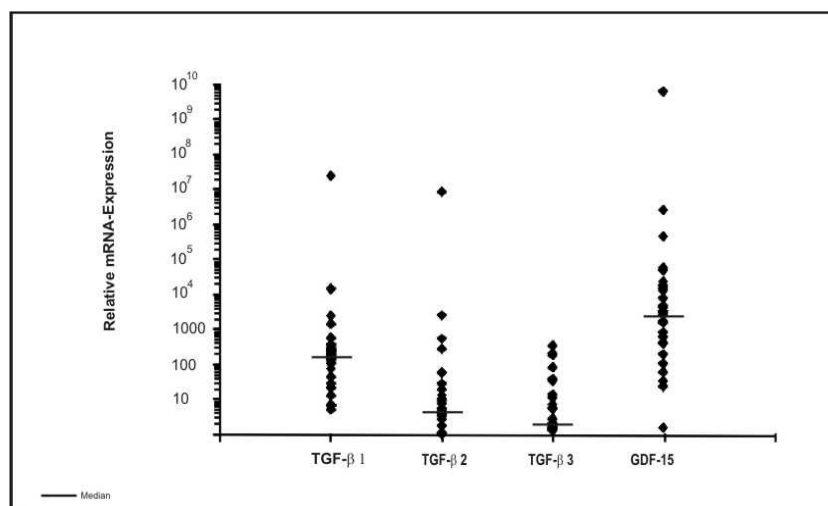


Abb. 20: Genexpression von TGF- β -Familienmitgliedern im OvCA-Gewebe. Die Genexpression von TGF- β 1, 2 und 3 sowie von GDF-15 wurde mittels quantitativer Real Time (qRT)-PCR im OvCA-Gewebe und im gesunden Ovar gemessen und die relative Expression im Tumor bzgl. gesundem Ovar mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Dargestellt ist der Median der relativen Genexpression des jeweiligen Gens. Diese Darstellung wurde gewählt, weil der Median einzelne Ausreißer, verursacht durch individuelle Schwankungen, weniger stark bewertet als der Mittelwert. TGF- β 1 hatte eine mediane Expressionsänderung im OvCA von +197 (C_t -Werte: 6 - 29), TGF- β 2 von +5,2 (C_t -Werte: 19 - 30) und TGF- β 3 von +1,7 (C_t -Werte: 21 - 30) bzgl. gesundem Ovar. Die mediane Expressionsänderung von GDF-15 im OvCA bzgl. gesundem Ovar betrug +2629 (C_t -Werte: 6 - 35) ($n=31$).

Tumorzellen lösen sich im Zuge der Metastasierung vom Haupttumor ab und wandern zunächst zu Organen des Bauchraums, später auch zu weiter entfernten Organen wie der Lunge. Besonders durch die Bildung von Aszites (Bauchwasser) sammeln sich zahlreiche Tumorzellen im Bauchraum, die leicht isoliert werden können. Für die Isolierung von primären OvCA-Tumorzellen wurden diese aus Aszites von OvCA-Patientinnen wie im Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben isoliert und in speziell für

diesen Zweck geeignetem „M+M“-Medium kultiviert. Da primäre Zellen nur kurzfristig in Kultur gehalten werden können, bevor sie ausdifferenzieren bzw. absterben, wurden die Tumorzellen zwischen Passage 1 und 4 geerntet und die Genexpressionen von TGF- β 1, 2, 3 und GDF-15 wie oben beschrieben bestimmt.

Das Expressionsmuster von GDF-15 und TGF- β aus OvCA-Geweben spiegelte sich im Expressionsmuster der primären OvCA-Zellen wieder. Auch hier war GDF-15 mit einer Expressionsänderung von mehr als 7000 das Gen mit der am meisten gesteigerten Transkriptionsaktivität der hier untersuchten TGF- β -Familienmitglieder (Median Expressionsänderung GDF-15: +7078 bzgl. gesundem Ovar, C_t -Werte: 21 - 30) (Abb. 21: Genexpression von TGF- β -Familienmitgliedern in primären OvCA-Zellen). TGF- β 1 war wieder das am stärksten überexprimierte Gen der drei TGF- β -Isoformen (Median Expressionsänderung bzgl. gesundem Ovar: TGF- β 1: +236, C_t -Werte: 17 - 25), da TGF- β 2 und 3 transkriptionell kaum induziert waren (Median Expressionsänderung bzgl. gesundem Ovar: TGF- β 2: +12, TGF- β 3: +2). Auch bei den primären OvCA-Zellen korrelierte die Expression von TGF- β 1 und GDF-15 (Korrelationskoeffizient 0,824).

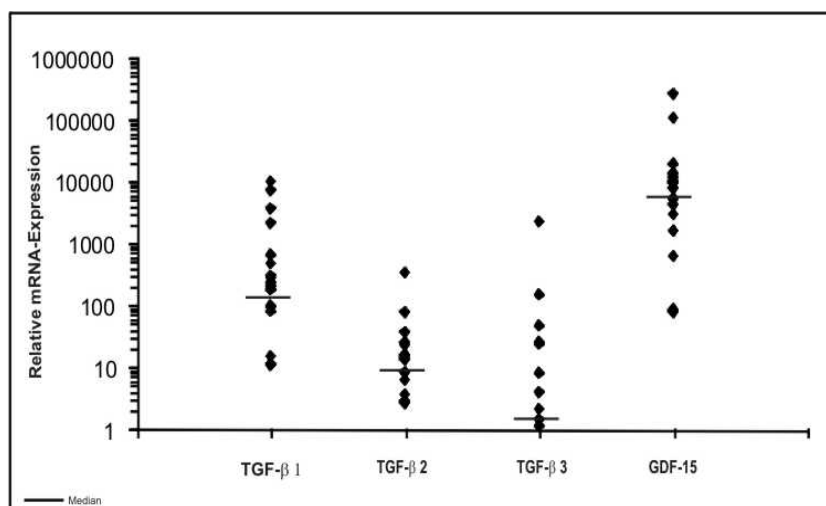


Abb. 21: Genexpression von TGF- β -Familienmitgliedern in primären OvCA-Zellen. Die Genexpression von TGF- β 1, 2 und 3 sowie von GDF-15 in primären, aus Aszites isolierten OvCA-Zellen wurde relativ zu gesundem Ovar wie in Abb. 20 beschrieben untersucht. Die relative Überexpression von TGF- β 1 betrug +236 (C_t -Werte: 17 - 25), von TGF- β 2: +12 (C_t -Werte: 20 - 28) und von TGF- β 3: +2 (C_t -Werte: 23 - 29). Die Überexpression von GDF-15 war im Vergleich dazu mit +7078 (C_t -Werte: 21 - 30) die höchste der untersuchten TGF- β -Familienmitglieder in primären OvCA-Zellen (n=18).

Etablierte Zelllinien werden aufgrund ihrer Verfügbarkeit und leichten Handhabung häufig für funktionale Studien herangezogen. Analog zu den primären OvCA-Zellen wurde das Expressionsprofil von GDF-15 und TGF- β in den verwendeten OvCA-Zelllinien bestimmt, um zu klären, wie nah diese als *in vitro*-Modelle am tatsächlichen Zustand im OvCA sind.

Auch hier wurden die Genexpressionen der OvCA-Zelllinien auf gesundes Ovar bezogen, da gesunde Ovar epithelzellen nicht dauerhaft kultiviert werden können.

Die Expression von GDF-15 in den untersuchten OvCA-Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, OaW-42 sowie der Teratom-Zelllinie PA-1 war sehr heterogen. Das Expressionsmuster war jedoch insgesamt ähnlich zu dem von primären OvCA-Zellen und dem von OvCA-Gewebe (Abb. 22: Genexpression von TGF- β -Familienmitgliedern in OvCA-Zelllinien). Im Median war GDF-15 um +50.124 erhöht, gegenüber einer relativen Expressionsänderung von +1026 bei TGF- β 1. TGF- β 2 und 3 waren wieder nur geringfügig erhöht (Median Expression TGF- β 2: +1,2 bzw. TGF- β 3: +11,5). Von den einzelnen Zelllinien wies OaW-42 die stärkste GDF-15-Transkriptionsaktivität auf (+638.000), während die Expression von GDF-15 in SKOV-3 und PA-1 im mittleren Bereich lag (+31.000 bzw. +69.000) und die Transkriptionsaktivität in OVCAR-3 mit einer relativen Expression von +23 gegenüber der Kontrolle nur geringfügig erhöht war. Auch die Expression der TGF- β -Isoformen war in den untersuchten Zelllinien sehr heterogen. Generell zeigten OVCAR-3 und OaW-42 die geringsten Expressionsänderungen (Median Expressionsänderung TGF- β 1: +1 bzw. +4, TGF- β 2: +1, TGF- β 3: +2 bzw. +10) und SKOV-3 und PA-1 die größten Expressionsänderungen im Vergleich zum Kontrollgewebe (Median Expressionsänderung TGF- β 1: +2048 bzw. +5997, TGF- β 2: +5 bzw. +1, TGF- β 3: +13 bzw. +127).

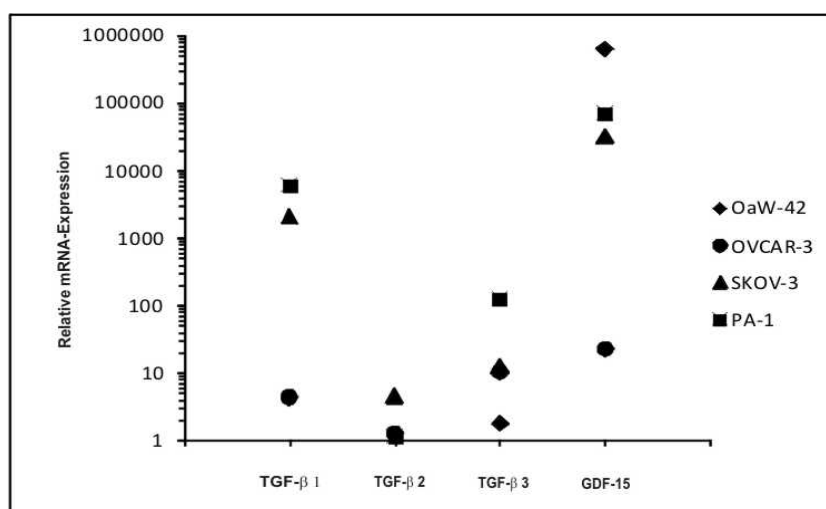


Abb. 22: Genexpression von TGF- β -Familienmitgliedern in OvCA-Zelllinien. Die relative Expression von GDF-15 und von den TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 bzgl. gesundem Ovar wurde wie in Abb. 20 beschrieben mittels qRT-PCR in den OvCA-Zelllinien OaW-42, OVCAR-3 und SKOV-3 sowie in der Teratom-Zelllinie PA-1 ermittelt. Die mediane Überexpression betrug bei GDF-15 +50.124 (C_t -Werte: 17 - 31), bei TGF- β 1 +236 (C_t -Werte: 20 - 29), bei TGF- β 2 +12 (C_t -Werte: 24 - 30) und bei TGF- β 3 +2 (C_t -Werte: 23 - 26).

Vergleicht man in allen analysierten OvCA-Probenmaterialien die relative Überexpression von TGF- β 1, 2, 3 und GDF-15, zeigt sich ein homogenes Expressionsmuster, in dem TGF- β 2 und TGF- β 3 die niedrigste Überexpression aufweisen und GDF-15 die höchste (Abb. 23: Expressionsmuster der untersuchten TGF- β -Familienmitglieder aus allen analysierten OvCA-Probenmaterialien).

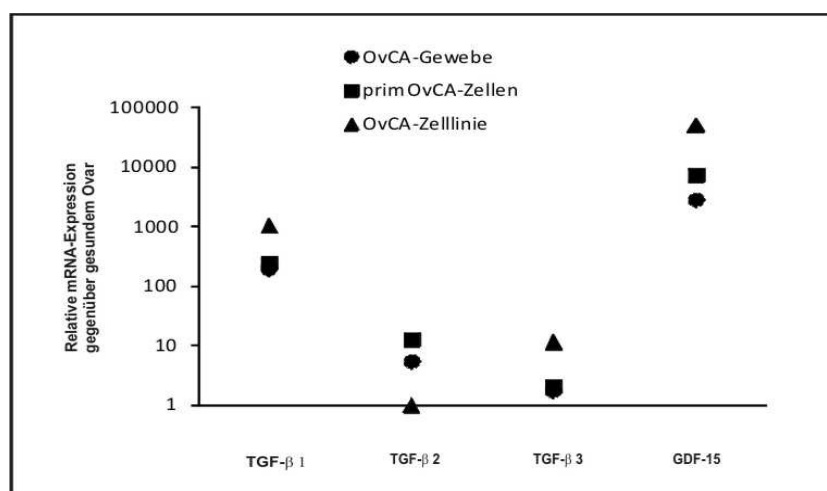


Abb. 23: Expressionsmuster der untersuchten TGF- β -Familienmitglieder aus allen analysierten OvCA-Probenmaterialien. Die Darstellung der medianen Überexpressionen in allen durch qRT-PCR analysierten OvCA-Probenmaterialien (OvCA-Gewebe, primäre (=prim) OvCA-Zellen aus Aszites-Kultur und OvCA-Zelllinien) ergab ein homogenes Expressionsmuster der untersuchten Gene der TGF- β -Familie mit der höchsten Expressionsänderung bei GDF-15.

3.1.2 *In vivo*- und *in vitro*-Proteinexpression von GDF-15 im Ovarialkarzinom

In verschiedenen pathogenen Situationen wie dem Prostata-CA, dem metastasierendem Mamma-CA oder dem Kolon-CA, aber auch im Vorfeld kardiovaskulärer Ereignisse wurden erhöhte GDF-15-Spiegel im Serum der betroffenen Patienten beschrieben (Brown et al., 2002b; Welsh et al., 2003). In den genannten Tumorentitäten wurde GDF-15 jeweils auch transkriptionell überexprimiert. Eine erhöhte Transkription eines Genes muss jedoch nicht gleichbedeutend sein mit einer Erhöhung der Proteinkonzentration, da Faktoren wie die Stabilität der mRNA ebenfalls einen Einfluss auf die Translationsrate haben. Da die Untersuchung der GDF-15-Genexpression im OvCA-Gewebe und in primären OvCA-Zellen zeigte, dass das GDF-15-Gen unter den untersuchten TGF- β -Familienmitgliedern das am stärksten aktivierte war, sollte im Folgenden seine Proteinexpression im OvCA *in vivo* und *in vitro* analysiert werden.

Dazu wurde aus OvCA-Gewebe sowie aus OvCA-Zelllysaten Protein gewonnen und im Western Blot analysiert. Mittels ELISA wurde die Konzentration von GDF-15 im Aszites und im Serum von OvCA-Patientinnen bestimmt. Sofern eine Kultivierung möglich war, wurde auch die Konzentration von sezerniertem GDF-15 im Zellkulturüberstand von kultivierten primären OvCA-Zellen bestimmt.

GDF-15 wird, wie andere TGF- β -Familienmitglieder, intrazellulär als Vorläuferpeptid von ca. 62 kDa gebildet. Nach Dimerisierung im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird es schließlich unter Abspaltung seines Propeptids zu einem reifen 25 kDa großen dimeren Protein prozessiert (Bauskin et al., 2000; Fairlie et al., 1999). Diesen intrazellulären Prozess kann man im Western Blot nachverfolgen. Dazu wurde OvCA-Gewebe in einem Mörser unter Flüssig-Stickstoff zerkleinert und in Lysepuffer-P lysiert. 20 μ g Gesamtprotein wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen und in der SDS-

PAGE der Größe nach aufgetrennt. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde GDF-15 mittels spezifischem Antikörper detektiert.

Die Expression von GDF-15 in den einzelnen OvCA-Geweben war unterschiedlich stark ausgeprägt. GDF-15 war in vielen, aber nicht in allen untersuchten Tumoren detektierbar. Neben der aktiven dimeren, 25 kDa großen Form wurden auch Proformen bei 40 und 62 kDa sowie Zwischenformen und das Monomer bei 12,5 kDa detektiert. Dieses resultierte aus der denaturierenden Behandlung beim Gellauf. In Plazentagewebe, das GDF-15 exprimieren sollte, war nur das Monomer und eine Proform bei 40 kDa nachweisbar. Überraschenderweise ließ sich im gesunden Ovar ebenfalls GDF-15 in allen Formen detektieren (Abb. 24: GDF-15-Expression im OvCA-Gewebe).

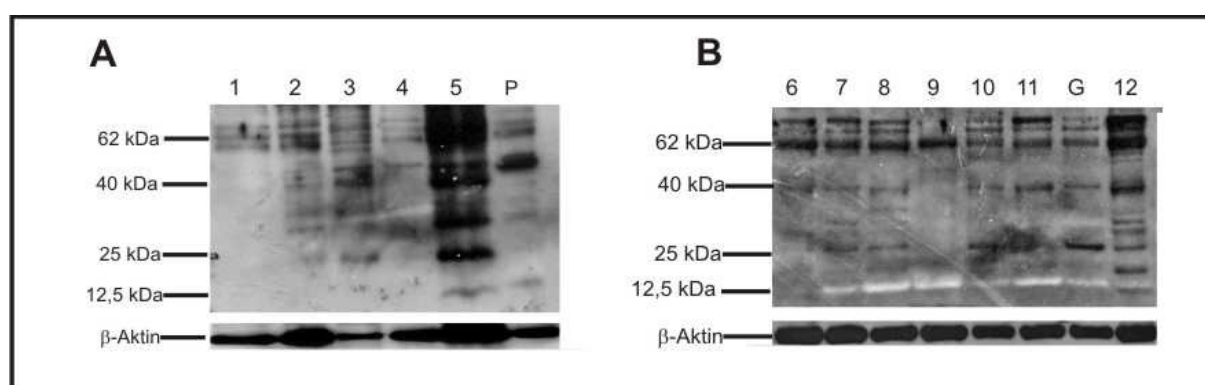


Abb. 24: GDF-15-Expression im OvCA-Gewebe. 20 µg Proteinlysate aus Tumorgewebe bzw. gesundem Ovar bzw. Plazenta wurden auf ein 15%iges Polyacrylamidgel geladen, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. GDF-15-Expression wurde mittels spezifischem anti-GDF-15-Antikörper (R&D Systems) nachgewiesen. Die Membran wurde „gestrippt“ (=Entfernen der Antikörper von der Membran) und für die Ladekontrolle mit anti-β-Aktin-Antikörper (Abcam) behandelt. Expression von GDF-15 im Tumorgewebe verschiedener OvCA-Patientinnen (1-12), in der Plazenta (=P) und im gesunden Ovar (=G) (**A, B**).

Ausgehend von der Expressionsuntersuchung im Western Blot lässt sich demnach nur eingeschränkt eine quantitative und qualitative Aussage über die GDF-15-Expression auf Proteinebene im OvCA versus (vs) gesundes Ovar treffen.

GDF-15 ist im Serum von Schwangeren hoch exprimiert. Bereits lange vor natürlichen Aborten sinkt der Serumspiegel rapide ab, was GDF-15 als einen prognostischen Marker des Schwangerschaftsverlaufs prädestiniert (Moore et al., 2000; Tong et al., 2004). Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen dient GDF-15 als prognostischer Marker im Serum (Brown et al., 2002b). Neben der Expression von GDF-15 im OvCA-Gewebe sollte daher auch seine sezernierte Form *in vivo* untersucht werden.

Im ELISA von R&D Systems wurde die Konzentration von GDF-15 anhand von mitgeführten rekombinanten Standardkonzentrationen in flüssigen Probenmaterialien von OvCA-Patientinnen und Gesunden bestimmt.

GDF-15 war im Serum von OvCA-Patientinnen signifikant erhöht gegenüber dem Serum gesunder Spender ($C_{\text{Median[Gesund]}}=260$ pg/ml; $C_{\text{Median[OvCA]}}=616$ pg/ml, $p=0,015$, t-test, Excel) (Abb. 25: GDF-15 im

Serum von OvCA-Patientinnen). Die Konzentrationen schwankten dabei von 73 bis 1046 pg/ml bei OvCA-Patientinnen und von 116 bis 880 pg/ml bei Gesunden.

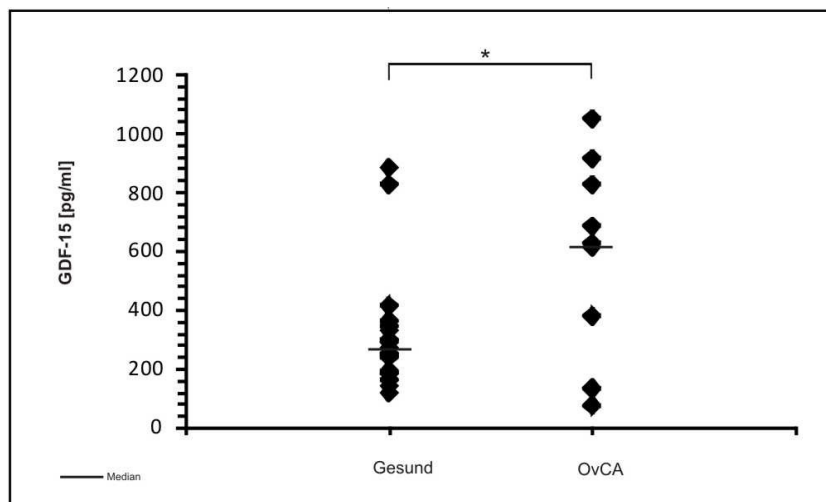


Abb. 25: GDF-15 im Serum von OvCA-Patientinnen. Mittels ELISA (R&D Systems) wurden die GDF-15-Serumkonzentrationen von gesunden Probanden und OvCA-Patientinnen bestimmt. Der GDF-15-Serumspiegel von OvCA-Patientinnen ($c_{\text{Median}}=616$ pg/ml, $n=10$) war signifikant höher als der von Gesunden ($c_{\text{Median}}=260$ pg/ml, $n=20$) ($p=0,015$, t-test, Excel).

Einige Studien postulieren GDF-15 als geeigneten prognostischen Tumormarker (Brown et al., 2003; Koopmann et al., 2006; Welsh et al., 2003). Daher sollte untersucht werden, ob sich die GDF-15-Expression im Serum von OvCA-Patientinnen von der im Serum von prä-maligen Stadien und nicht malignen Erkrankungen unterscheidet.

GDF-15 war im Serum von OvCA-Patientinnen erhöht, nicht jedoch bei benignen Borderline-Tumoren ($n=2$, $c_{\text{Median}}=333$ pg/ml) oder bei nicht malignen Ovarialzysten ($n=5$, $c_{\text{Median}}=129$ pg/ml) (Abb. 26: GDF-15 im Serum von Patientinnen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen). Der GDF-15-Konzentrationsunterschied erwies sich als signifikant zwischen OvCA-Serum und Serum von Patientinnen mit benignen Ovarialzysten ($p=0,014$, t-test, Excel).

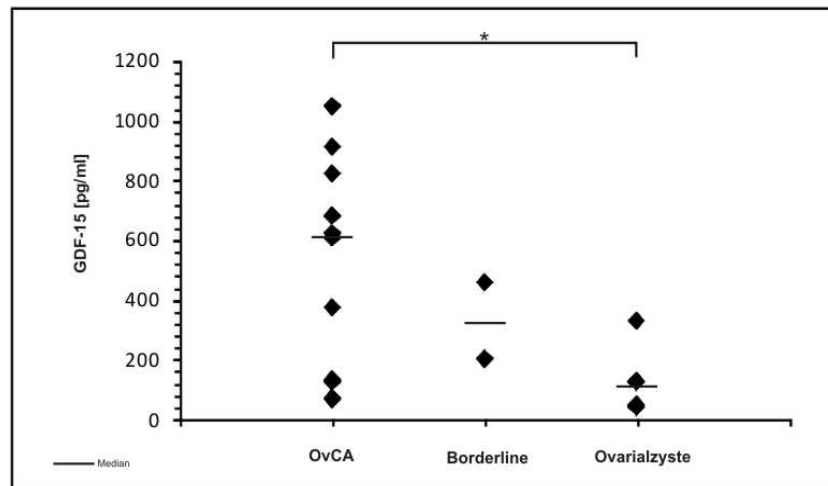


Abb. 26: GDF-15 im Serum von Patientinnen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen. Die Konzentration von GDF-15 im Serum von Patientinnen mit malignem OvCA, benignem Borderline-Tumor und nicht malignen Ovarialzysten wurde im ELISA bestimmt. Unter den gynäkologischen Erkrankungen war die Serumkonzentration von GDF-15 mit $c_{\text{Median}}=610$ pg/ml im OvCA am höchsten ($n=10$). In benignen Borderline-Tumoren ($c_{\text{Median}}=333$ pg/ml, $n=2$) und bei Ovarialzysten war die GDF-15-Serumkonzentration nicht erhöht ($c_{\text{Median}}=129$ pg/ml, $n=5$, $*p=0,014$, t-test, Excel).

Bei fortgeschrittener OvCA-Erkrankung sammelt sich im Bauchraum häufig Aszites. Neben Tumor-, Bindegewebs- und Immunzellen enthält der Aszites auch vom Tumor sezernierte Faktoren wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und andere Proteine (Bapat et al., 2005; Gordon and Freedman, 2006). Durch Zentrifugation wurden die Zellen abgetrennt und der Aszitesüberstand im GDF-15-ELISA untersucht. Die Konzentrationen von GDF-15 waren im Aszites, vermutlich aufgrund der Tumornähe, deutlich höher als im Serum ($c_{\text{Median}}=1979$ pg/ml). Die einzelnen Konzentrationen schwankten zwischen 457 und 10.299 pg/ml (Abb. 27: GDF-15 im Aszites von OvCA-Patientinnen).

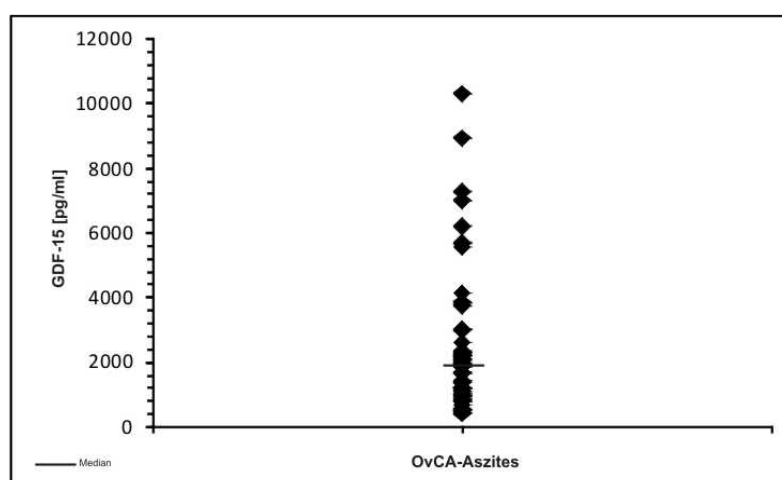


Abb. 27: GDF-15 im Aszites von OvCA-Patientinnen. Die GDF-15-Konzentration im zellfreien OvCA-Aszitesüberstand wurde im ELISA bestimmt. Der Median der GDF-15-Konzentration betrug 1979 pg/ml ($n=49$).

In primären, aus Aszites gewonnenen OvCA-Zellen und in OvCA-Zelllinien wurde GDF-15 stark exprimiert. Daher sollte auch die *in vitro*-GDF-15-Proteinexpression überprüft und die GDF-15-

Konzentration in diesen Zellen bestimmt werden. Dazu wurden 0,2 - 1 Mio primäre Tumorzellen zwischen Passage 1 und 4 lysiert und 20 µg Gesamtprotein in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde GDF-15 detektiert (Abb. 28: GDF-15-Expression in primären OvCA-Zellen aus Asziteskultur).

Primäre OvCA-Zellen aus Asziteskultur exprimierten das aktive 25 kDa große GDF-15-Dimer unterschiedlich stark. Teilweise wurde auch das 12,5 kDa große Monomer detektiert. In allen Proben waren zudem die inaktiven Proformen von 40 und 62 kDa exprimiert.

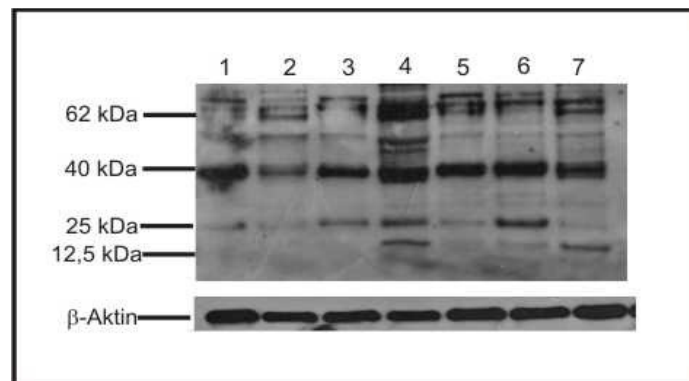


Abb. 28: GDF-15-Expression in primären OvCA-Zellen aus Asziteskultur. Primäre OvCA-Zellen aus Asziteskultur (1-7) wurden wie in Abb. 24 beschrieben im Western Blot analysiert. Expression von GDF-15 und seinen Proformen konnte im Lysat nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Analog zu den primären OvCA-Zellen aus Asziteskultur wurde die GDF-15-Expression in Lysaten der OvCA-Zelllinien SKOV-3, OaW-42 und OVCAR-3 sowie der Teratom-Zelllinie PA-1 untersucht. Bei den OvCA-Zelllinien zeigten nur OaW-42 und SKOV-3 die 25 kDa große Bande des aktiven Dimers, SKOV-3 wies zusätzlich die Monomer-Bande auf. Bei diesen beiden waren die Proformen bei 40 und 62 kDa zudem am stärksten exprimiert. Bei der Teratom-Zelllinie PA-1 konnte nur die 62 kDa große Proform eindeutig zugeordnet werden, während bei OVCAR-3 nur die Proformen detektierbar waren, nicht aber das aktive GDF-15-Dimer (Abb. 29: GDF-15-Expression in den OvCA-Zelllinien SKOV-3, OaW-42, OVCAR-3 und PA-1, A). Dass intrazellulär hauptsächlich Proformen von GDF-15 detektiert wurden, liegt wahrscheinlich daran, dass GDF-15 überwiegend sezerniert wird. Daher wurde GDF-15 zusätzlich im konzentrierten Überstand der OvCA-Zelllinien nach 48 h Kultur untersucht (Abb. 29 B). PA-1, OaW-42 und OVCAR-3 sezernierten die 62 kDa- und 40 kDa-Proformen von GDF-15 sowie das aktive 25 kDa-Dimer in den Überstand. Auch das Monomer war in diesen Zelllinien nachweisbar. Lediglich SKOV-3, die zwar intrazellulär eine hohe GDF-15-Expression aufwiesen, sezernierten mit Ausnahme der 62 kDa großen Proform kein im Western Blot detektierbares GDF-15.

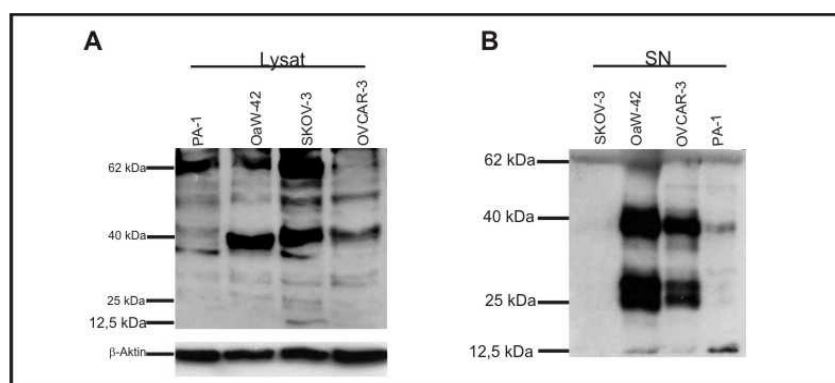


Abb. 29: GDF-15-Expression in den OvCA-Zelllinien SKOV-3, OaW-42, OVCAR-3 und PA-1. 20 μ g Lysat (A) sowie 10 μ g konzentrierter Zellkulturüberstand (SN) (B) der OvCA-Zelllinien SKOV-3, OaW-42, OVCAR-3 und PA-1 wurden auf ein 15%iges (Lysat, A) bzw. 12%iges (SN, B) Polyacrylamidgel geladen und wie in Abb. 24 beschrieben im Western Blot untersucht.

Zur quantitativen Bestimmung von sezerniertem GDF-15 von Zelllinien und primären Zellen wurde deren Zellkulturüberstand im GDF-15-ELISA untersucht. Dazu wurden 2×10^5 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte eingesät, für 72 h kultiviert und der Überstand, nach Abtrennung der Zellbestandteile, analysiert.

Im Gegensatz zur *in vivo*-Situation war im Zellkulturüberstand die Konzentration von GDF-15 deutlich geringer. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen etablierten OvCA-Zelllinien und primären OvCA-Zellen ($c_{\text{Median[Zelllinien]}}=64$ pg/ml bzw. $c_{\text{Median[primäre Zellen]}}=40$ pg/ml, $p=0,27$, t-test, Excel) (Abb. 30: GDF-15 im Zellkulturüberstand von OvCA-Zelllinien und primären OvCA-Zellen). Bei den OvCA-Zelllinien war OaW-42 diejenige mit der höchsten GDF-15 Konzentration im Überstand (5590 pg/ml) und SKOV-3 bzw. PA-1 diejenigen mit der niedrigsten (25 bzw. 17 pg/ml), OVCAR-3 lag im unteren mittleren Bereich (80 pg/ml), was weitgehend den Daten des Western Blots entsprach (Abb. 29, B).

Bei den primären OvCA-Zellen schwankten die Konzentrationen zwischen 40 und 4645 pg/ml GDF-15, mit einem Medianwert von 40 pg/ml (Mittelwert 440 pg/ml). Die primären Tumorzellen, die im Western Blot eine schwache GDF-15-Expression aufwiesen, sezernierten auch wenig GDF-15. Analog dazu hatten primäre Zellen, die eine hohe GDF-15-Konzentration im ELISA aufwiesen, zumeist auch eine ausgeprägte intrazelluläre GDF-15-Expression.

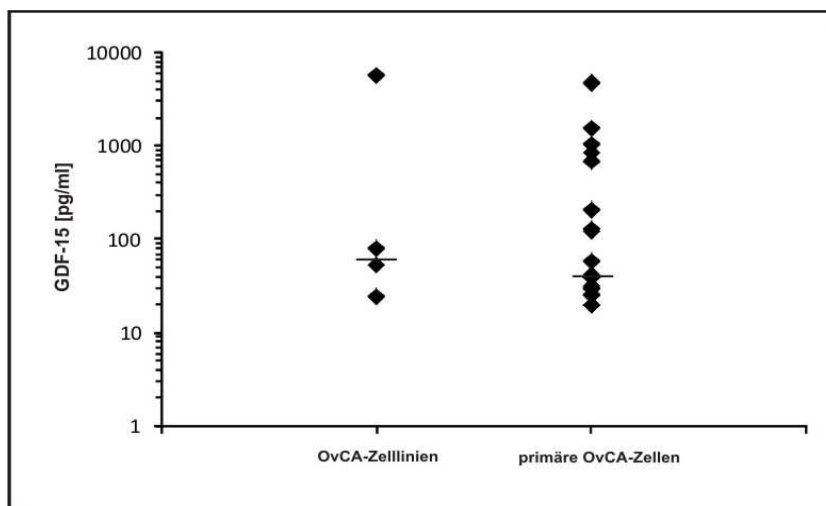


Abb. 30: GDF-15 im Zellkulturüberstand von OvCA-Zelllinien und primären OvCA-Zellen. 2×10^5 OvCA-Zellen (Asziteskultur bzw. Zelllinie) wurden pro Well einer 6-Well-Platte eingesät und 72 h inkubiert. Aus dem zellfreien Überstand wurde die GDF-15-Konzentration im ELISA bestimmt. Der Unterschied von etablierten Zelllinien zu primären OvCA-Zellen war mit $C_{\text{Median[Zelllinien]}}=64$ pg/ml bzw. $C_{\text{Median[primäre Zellen]}}=40$ pg/ml minimal und nicht signifikant (t-test, Excel).

3.1.3 Zusammenfassung: GDF-15-Expression im Ovarialkarzinom

Die Expressionsuntersuchungen auf RNA- und Proteinebene ergaben, dass GDF-15 ein hoch exprimiertes Zytokin der TGF- β -Superfamilie im OvCA ist und weit stärker exprimiert ist als TGF- β selbst.

In vivo ist GDF-15 im Serum von OvCA-Patientinnen signifikant höher exprimiert als im Serum von Gesunden bzw. im Serum von Patientinnen mit nicht malignen Erkrankungen. Im Aszites von OvCA-Patientinnen ist GDF-15 ebenfalls stark konzentriert. Kultivierte primäre OvCA-Zellen exprimieren GDF-15 einerseits intrazellulär, GDF-15 wird aber auch in geringen Konzentrationen in den Zellkulturüberstand sezerniert. Die hier untersuchten etablierten OvCA-Zelllinien SKOV-3, OaW-42, OVCAR-3 und PA-1 exprimieren und sezernieren GDF-15 in ähnlichem Umfang wie die primären, aus Aszites isolierten OvCA-Zellen.

Aufgrund der Expression ist es naheliegend, dass GDF-15 eine wichtige Rolle in der OvCA-Genese und/oder -proliferation spielt. Zu der Funktion von GDF-15 gibt es unterschiedliche Beobachtungen. Einerseits wirkt es als pro-apoptotischer Faktor, der Tumorzellwachstum stoppt (Baek et al., 2006; Jang et al., 2006; Martinez et al., 2006; Tan et al., 2000), andererseits wurde GDF-15 eine pro-tumorigene Wirkung zugeschrieben (Karan et al., 2003; Lee et al., 2003). Welche Funktion GDF-15 im Falle des OvCA ausübt, sollte im Folgenden geklärt werden.

3.2 Autokrine Funktion von GDF-15 im Ovarialkarzinom - Funktionalitätsstudien in OvCA-Zellen -

Im Abschnitt 3.1 wurde gezeigt, dass GDF-15 im OvCA überexprimiert wird. Dies führte zu der Überlegung, dass GDF-15 dem Tumor durch die Überexpression einen entscheidenden Vorteil verschafft, entweder autokrin aufgrund proliferativer Eigenschaften oder parakrin bei der Unterstützung des „*immune escape*“.

Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, welchen autokrinen Einfluss die GDF-15-Expression auf OvCA-Zellen hat.

3.2.1 Herstellung von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien

Um die autokrine Funktionsweise von GDF-15 auf OvCA-Zellen zu entschlüsseln, wurden stabile und transiente GDF-15-transfizierte OvCA-Zelllinien hergestellt. Anschließend sollte der Einfluss von GDF-15 in GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen auf zelluläre Prozesse analysiert werden.

3.2.1.1 GDF-15-Überexpression in der OvCA-Zelllinie OVCAR-3

Die OvCA-Zelllinie OVCAR-3 wurde für die Überexpression von GDF-15 ausgewählt, da diese eine geringe endogene GDF-15-Expression aufweist (Abschnitt 3.1, Abb. 22). Zur Überexpression von GDF-15 wurde in diese Zelllinie das Plasmid pCDNA3.1, das die GDF-15-codierende Sequenz trägt, mittels liposomaler Transfektion eingebracht („pCDNA3.1-GDF-15“). Im Plasmid steht die GDF-15-Sequenz unter dem Einfluss des Cytomegalievirus (CMV) „*immediate-early*“-Promotors. Dieser Promotor bewirkt, dass die GDF-15-Sequenz in der Zelle von der Polymerase präferenziell abgelesen, entsprechend stark translatiert und GDF-15 dementsprechend überexprimiert wird. Neben GDF-15 codiert das Plasmid auch für eine Neomycin-Resistenz (Neomycin-Phosphotransferase). Durch Selektion mit dem Antibiotikum G418 (Geneticin) wurden 48-72 h nach Transfektion diejenigen Zellen selektioniert, die durch Expression des Plasmids neben GDF-15 auch die Antibiotikaresistenz ausbildeten. Auf diese Weise wurden über mehrere Selektionszyklen stabile, GDF-15-überexprimierende OVCAR-3-Transfektanten hergestellt, die für funktionale Studien eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde GDF-15 in OVCAR-3 mit dem pIRESeGFP-Plasmidsystem überexprimiert. In diesem Plasmid steht die GDF-15-Sequenz ebenfalls unter dem Einfluss des CMV-Promotors und wird durch die „*internal ribosomal entry site*“ (IRES) zusammen mit dem „*enhanced green fluorescent protein*“ (eGFP) exprimiert und aus einer mRNA translatiert („pIRESeGFP-GDF-15“).

Auf die gleiche Weise wie oben beschrieben wurden OVCAR-3-Zellen hergestellt, die das Plasmid pCDNA3.1 bzw. pIRESeGFP ohne die GDF-15-codierende Sequenz enthielten. Diese dienten als

Kontrolle zum Ausschluss transfektionsbedingter Nebeneffekte in funktionalen Studien. Alle Resultate wurden auf diese Kontrollen bezogen.

Um die Effizienz der stabilen Transfektion zu überprüfen, wurde die Expression von GDF-15 im ELISA im Vergleich zur kontrolltransfizierten Zelllinie ermittelt (Abb. 31: Überexpression von GDF-15 in der OvCA-Zelllinie OVCAR-3). Mit beiden Plasmidsystemen konnte GDF-15 in OVCAR-3 überexprimiert werden, die höhere Effizienz wies jedoch das pIRESeGFP-GDF-15-Plasmidsystem auf.

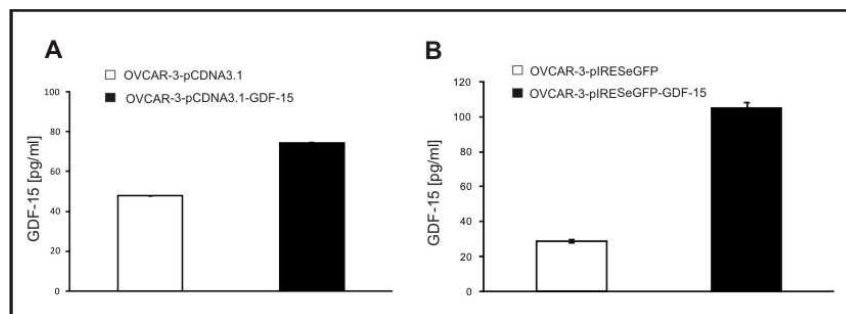


Abb. 31: Überexpression von GDF-15 in der OvCA-Zelllinie OVCAR-3. Die Konzentration von GDF-15, das in den Überstand der OvCA-Zelllinie OVCAR-3-pCDNA3.1 und OVCAR-3-pCDNA3.1-GDF-15 (A) bzw. OVCAR-3-pIRESeGFP und OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 (B) sezerniert wurde, wurde im GDF-15-ELISA (R&D Systems) bestimmt.

Aufgrund der besseren GDF-15-Induktion wurde die GDF-15-Expression von OVCAR-pIRESeGFP und OVCAR-pIRESeGFP-GDF-15 zusätzlich im Western Blot bestätigt. Dazu wurde der Überstand (SN) nach 48 h Kultur geerntet, mittels Vivaspin-Säulen konzentriert und 20 µg Protein auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Analog dazu wurden die Zelllysate wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben in Lysepuffer-P hergestellt und 20 µg Protein eingesetzt (Abb. 32: Überexpression von GDF-15 in der OvCA-Zelllinie OVCAR-3 und GDF-15-„knock-down“ in der OvCA-Zelllinie OaW-42, A).

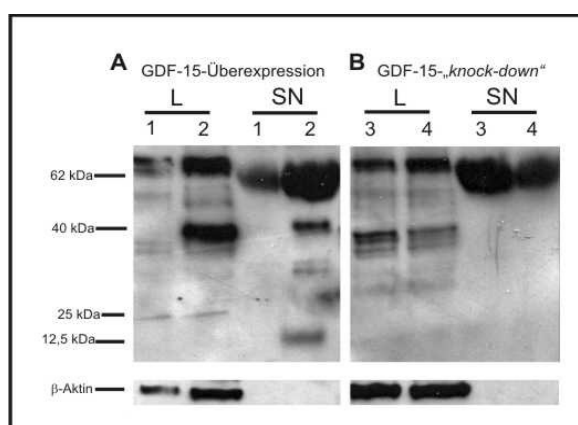


Abb. 32: Überexpression von GDF-15 in der OvCA-Zelllinie OVCAR-3 und GDF-15-„knock-down“ in der OvCA-Zelllinie OaW-42. Zellkulturüberstand (SN) der GDF-15-überexprimierenden (A) bzw. der GDF-15-defizienten Zelllinien (B) wurde nach 48 h Kultur mit Vivaspin-Säulen durch Zentrifugation konzentriert, zusammen mit dem Zelllysate (L) auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen (20 µg Gesamtprotein) und im Western Blot mit anti-GDF-15-Antikörper (R&D Systems) analysiert. Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und für die Ladekontrolle mit anti-β-Aktin-Antikörper (Abcam) behandelt (1=OVCAR-3-pIRESeGFP, 2=OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15, 3=OaW-42-pSUPERpuro, 4=OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15).

Der Western Blot zeigte im Lysat von OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15, aber auch in dem von OVCAR-3-pIRESeGFP eine Bande auf Höhe des GDF-15-Dimers (25 kDa). Die Proformen von 40 und 62 kDa waren bei OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 sehr viel stärker exprimiert als bei den Kontrollzellen. Gleiches wurde für den Überstand (SN) beobachtet. Zusätzlich wurde im SN von OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 eine Bande bei 12,5 kDa detektiert, die dem GDF-15-Monomer entsprach. Die GDF-15-Überexpression in OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 wurde somit auch im Western Blot bestätigt.

Da diese Zelllinie im Vergleich zu OVCAR-3-pCDNA3.1-GDF-15 mehr GDF-15 exprimierte, wurde sie präferentiell zur Untersuchung der GDF-15-Überexpression herangezogen.

3.2.1.2 GDF-15-„knock-down“ in der OvCA-Zelllinie OaW-42

Durch den „knock-out“ (=Deletion eines Gens auf DNA-Ebene) bzw. den „knock-down“ (=transkriptionelle Hemmung der Genexpression) eines Gens in einer Zelllinie kann man anhand der Veränderung des Phänotyps Rückschlüsse auf die Funktion des herunterregulierten Gens ziehen. Bei der Überexpression eines Gens können Expressionsniveaus erreicht werden, die sehr unphysiologisch sind und daher zu Artefakten führen, die wenig über die Funktion des Gens bei physiologischer (Über-)Expression aussagen. Der Gen-„knock-out“ bzw. -„knock-down“ ist insofern aufschlussreicher, da die physiologische Expression eines einzelnen Gens herunterreguliert wird, was der genauere Weg zur Untersuchung der Genfunktion ist.

OaW-42 wurde für den „knock-down“ von GDF-15 ausgewählt, weil diese Zelllinie auf RNA- und Proteinebene die höchste GDF-15-Expression aufwies (Abschnitt 3.1, Abb. 22). Zum stabilen GDF-15-„knock-down“ wurde das Plasmid „pSUPERpuro-GDF-15“ in OaW-42 Zellen eingebracht. Das Plasmid enthielt zusätzlich eine Antibiotikaresistenz (Puromycin), so dass die Zellen, die das Plasmid exprimierten, im antibiotikahaltigen Medium überlebten. pSUPERpuro-GDF-15 codiert für eine shRNA-Sequenz, deren Transkription zu einer GDF-15-siRNA führt, welche an die endogene GDF-15-mRNA bindet und somit deren Translation verhindert (Brummelkamp et al., 2002). Die stabile Herunterregulation von GDF-15 in der Zelllinie wurde im Western Blot und im ELISA aus Zellkulturüberstand nachgewiesen. Analog dazu wurde als Referenz eine stabile OaW-42-Zelllinie mit dem „Leervektor“ pSUPERpuro hergestellt.

Im Western Blot wurden intrazellulär nur Proformen von GDF-15 detektiert. Die 40 kDa große Proform war in OaW-42-pSUPERpuro dominanter, während die 62 kDa große Proform bei OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 stärker exprimiert war. Im Überstand wurde bei keiner der beiden Zelllinien GDF-15 nachgewiesen, lediglich eine starke Bande bei 62 kDa wurde detektiert (Abb. 31: Überexpression von GDF-15 in der OvCA-Zelllinie OVCAR-3 und GDF-15-„knock-down“ in der OvCA-Zelllinie OaW-42, B). Im Western Blot, der nur inaktives GDF-15 zeigt, konnte die Herunterregulation von GDF-15 in OaW-42-Zellen daher nicht nachgewiesen werden, weshalb die GDF-15-Expression zusätzlich im ELISA aus dem Zellkulturüberstand überprüft wurde.

In der „*knock-down*“-Zelllinie OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 wurde im Vergleich zur Referenzzelllinie OaW-42-pSUPERpuro die Sekretion von aktivem GDF-15 stabil um mehr als 85% herunterreguliert (Abb. 33: Herunterregulation von GDF-15 in der OvCA-Zelllinie OaW-42).

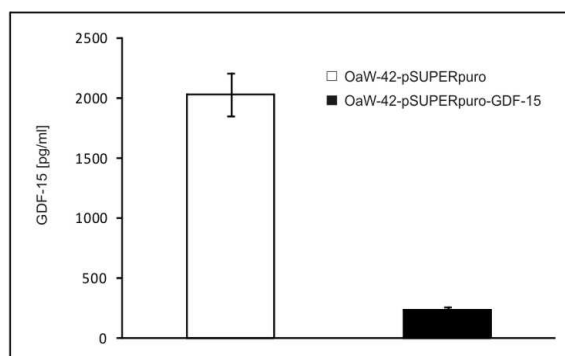


Abb. 33: Herunterregulation von GDF-15 in der OvCA-Zelllinie OaW-42. Bestimmung von GDF-15 im Zellkulturüberstand von OaW-42-pSUPERpuro und OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 nach 48 h Kultur mittels GDF-15-ELISA (R&D Systems). Die GDF-15-Expression wurde durch die spezifische siRNA, die von dem shRNA-Plasmid pSUPERpuro-GDF-15 kodiert wurde, in OaW-42 stabil herunterreguliert.

3.2.2 Untersuchung des Phänotyps von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien

Die stabilen GDF-15-defizienten und GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zelllinien wurden funktional charakterisiert, um den autokrinen Einfluss von GDF-15 auf den Phänotyp der jeweiligen Zelllinie zu bestimmen. Ergänzend wurden Untersuchungen mit transienten GDF-15-„*knock-down*“-Zellen sowie mit OvCA-Zellen, die exogen mit rekombinantem GDF-15 (rhGDF-15) behandelt wurden, durchgeführt.

3.2.2.1 Proliferation

Tumorzellen sezernieren autokrine Wachstumsfaktoren, die ihrer Proliferation dienen. Von GDF-15 wurde berichtet, dass es ähnlich wie TGF- β pro-proliferative Funktionen bei der Embryogenese ausübt (Schober et al., 2001; Strelau et al., 2000a). In Tumoren wurde GDF-15 ebenfalls als Wachstumsfaktor beschrieben (Strelau et al., 2008).

Hier sollte der Einfluss von autokrinem GDF-15 auf das Wachstum von OvCA-Zellen anhand von GDF-15-überexprimierenden bzw. GDF-15-„*knock-down*“ OvCA-Zelllinien untersucht werden. Dazu wurden die oben genannten Zelllinien 24 h lang in 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)-haltigem Medium kultiviert. In dieser Zeit konnte während der DNA-Synthese BrdU in die DNA eingebaut werden. Über einen BrdU-spezifischen Antikörper und Chemilumineszenz wurde der Einbau von BrdU in die DNA gemessen und die relative Proliferationsrate bzgl. der Kontrolle ermittelt.

Die Überexpression von GDF-15 durch das Plasmid pIRESeGFP-GDF15 reduzierte die Zellteilungsrate von OVCAR-3 im Vergleich zur Zelllinie mit Kontrollplasmid um mehr als 25%. Der „knock-down“ von GDF-15 durch das Plasmid pSUPERpuro-GDF-15 verminderte die Proliferation nur um 10% im Vergleich zur Zelllinie mit Kontrollplasmid (Abb. 34: Relative Proliferation von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen).

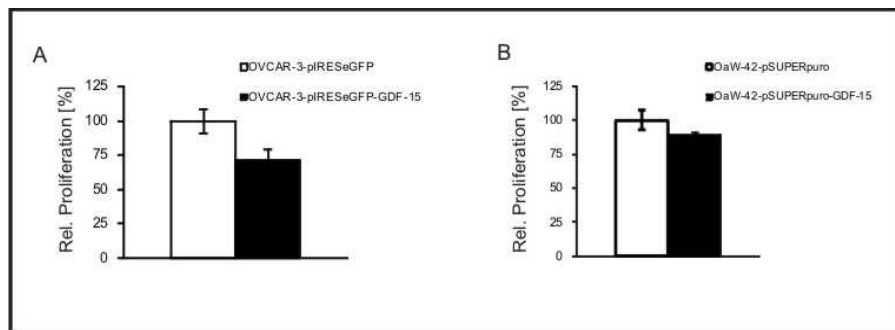


Abb. 34: Relative Proliferation von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen. Die Proliferation von Kontroll- und GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 (A) sowie Kontroll- und GDF-15-„knock-down“-OaW-42 (B) wurde anhand des Einbaus von BrdU in die DNA ermittelt. Die durch das Enzym Luziferase, das an einen BrdU-spezifischen Antikörper gekoppelt ist, freigesetzte Lumineszenz war proportional zum BrdU-Einbau in die DNA und damit zur Teilungs- bzw. Proliferationsrate (Standardabweichung der Triplikate, repräsentatives Beispiel) (n=3).

Die Proliferationsunterschiede waren jedoch weder bei der GDF-15-Überexpression noch bei der GDF-15-Defizienz gegenüber den Kontrollen signifikant. Somit war anhand des BrdU-Einbaus kein Unterschied im Wachstumsverhalten lediglich eine tendenzielle Wachstumsverzögerung zu beobachten.

Um den autokrinen Einfluss von GDF-15 auf OvCA-Zellen auf breiterer Ebene zu untersuchen, wurde die GDF-15-Expression in weiteren OvCA-Zellen transient mittels siRNA herunterreguliert und der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen gemessen. Zur Kontrolle wurden die gleichen Zellen mit einer unspezifischen „scrambled“-siRNA transfiziert.

OVCAR-3 hatte von den untersuchten Zelllinien, wie schon zuvor beobachtet, die geringste GDF-15-Expression; diese ohnehin schon geringe GDF-15-Expression konnte in dieser Zelllinie mit GDF-15-siRNA noch um weitere 80% herunterreguliert werden. OaW-42 wies die höchste GDF-15-Expression auf; hier konnte GDF-15 transient auf bis zu 16% der ursprünglichen Expression herunterreguliert werden, was ungefähr der stabilen Herunterregulation mit dem shRNA-Plasmid pSUPERpuro-GDF-15 entsprach. In SKOV-3 und PA-1, die nativ wenig GDF-15 sezernierten, konnte die GDF-15-Expression um 70 bzw. 75% reduziert werden (Abb. 35: Einfluss von GDF-15-Defizienz auf die Proliferation verschiedener OvCA-Zelllinien, A).

Um die Wachstumseigenschaften der GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien zu testen, wurden diese 48 h nach siRNA-Transfektion 24 h lang in BrdU-haltigem Medium kultiviert und anschließend die Proliferation anhand des BrdU-Einbaus bestimmt.

Sämtliche transient GDF-15-defiziente Zelllinien hatten im beobachteten Zeitraum weniger BrdU eingebaut als die Kontrollen. Der Proliferationsunterschied zur Kontrolle betrug weniger als 20% bei OVCAR-3 bzw. OaW-42 und nur 5% bei SKOV-3 bzw. PA-1 (Abb. 35: Einfluss von GDF-15-Defizienz auf die Proliferation verschiedener OvCA-Zelllinien, B). Dies bestätigt die Beobachtungen der stabilen GDF-15-„knock-down“-Zellen, bei denen kein bzw. nur ein minimaler autokriner Einfluss von GDF-15 auf die Proliferation festzustellen war.

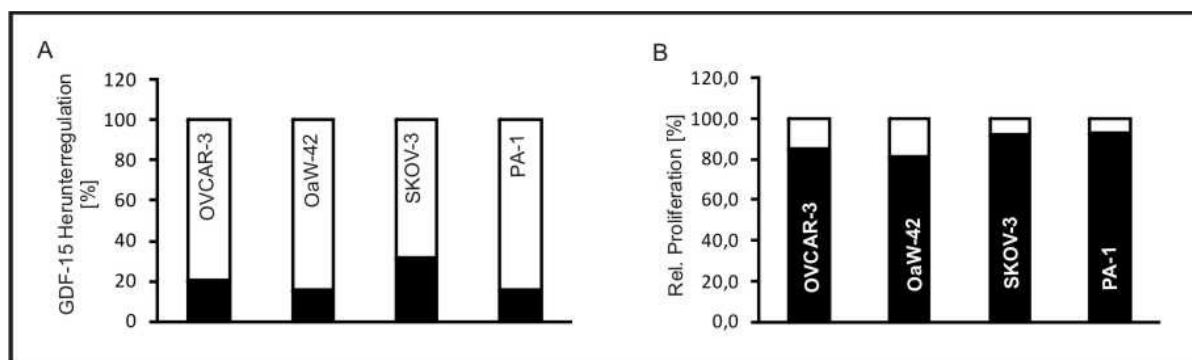


Abb. 35: Einfluss von GDF-15-Defizienz auf die Proliferation verschiedener OvCA-Zelllinien. Mittels ELISA wurde die GDF-15-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 48 h Kultur in durch siRNA-Transfektion hergestellten GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien bestimmt (schwarzer Balken) und relativ zur Kontrolle mit unspezifischer siRNA (=100%, weißer Balken) in % GDF-15-Herunterregulation berechnet (A) (repräsentatives Beispiel). Die relative Proliferation der GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien (schwarzer Balken) wurde gemessen anhand des BrdU-Einbaus in die DNA über 24 h und in Relation gesetzt zur Proliferation der entsprechenden Kontrollzellen, die mit unspezifischer siRNA behandelt wurden (=100%, weißer Balken) (B) (repräsentatives Beispiel) (n=2).

3.2.2.2 Viabilität

Die Viabilität der GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien sollte im WST-Assay bestimmt werden. Hierfür wurde die kolorimetrische Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST 1 h nach Zugabe zu den Zellen im Photometer gemessen. Die Farbreaktion beruht auf der Reduktion von WST, die nur in metabolisch aktiven (=viablen) Zellen erfolgen kann und ein Maß für die Stoffwechselaktivität und damit indirekt für die Viabilität der Zellen ist.

Verglichen mit der Transfektionskontrolle war der WST-Umsatz in den GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 um fast 40% erhöht, in den GDF-15-defizienten OaW-42 dagegen um die Hälfte reduziert (Abb. 36: WST-Umsatz von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien).

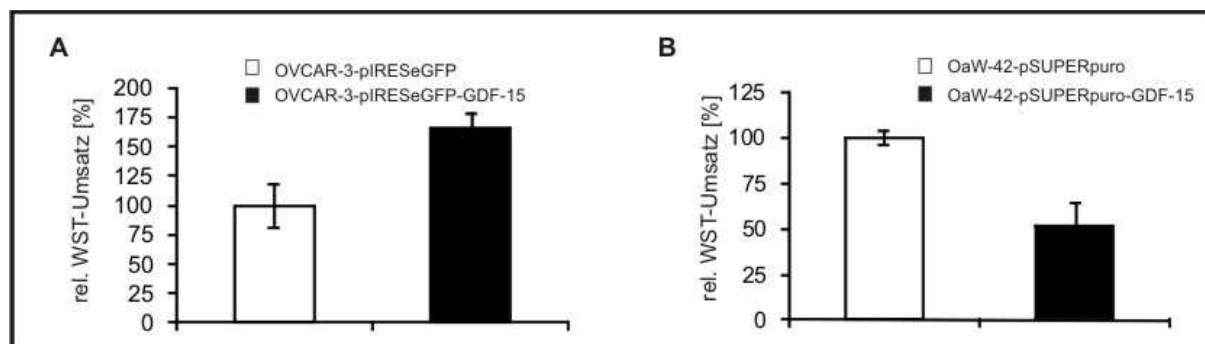


Abb. 36: WST-Umsatz von GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien. Die Viabilität von GDF-15-überexprimierenden bzw. GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien wurde anhand der kolorimetrischen Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST nach 1 h Inkubation bei einer OD von 450 nm gemessen. Der ermittelte WST-Umsatz in GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 (A) sowie in GDF-15-defizienten OaW-42 (B) bzgl. ihrer Kontrollen (Standardabweichung der Triplikate, repräsentatives Beispiel) (n=3).

3.2.2.3 Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit

Die Zelldichte, gemessen über einen definierten Zeitraum, korreliert mit der Zellzahl und ist daher auch ein Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit.

Um einen Einblick in die Zelldichte und die Wachstumsgeschwindigkeit der GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien relativ zu ihrer Ausgangszelllinie zu bekommen, wurden die entsprechenden Zellen nach Aussaat in einer 96-Well-Platte 24 h lang bei 37°C inkubiert und anschließend mit Kristallviolett-Lösung 20 min lang gefärbt. Die lebenden Zellen haften am Plattenboden und werden durch den Farbstoff Kristallviolett (KV) blau angefärbt. Tote Zellen lösen sich bereits während der Inkubation oder während des Waschvorgangs ab und werden daher nicht angefärbt. Die Färbung der Zellen wird optisch bei 570 nm in Methanol-Citratpuffer gemessen. Die Farbintensität ist proportional zur Zelldichte und gibt einen Einblick in die Verdopplung der Zellen im beobachteten Zeitraum.

Nach 24 h Inkubation war die Zelldichte von GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 um ca. 20% geringer, die von GDF-15-defizienten OaW-42 dagegen um ca. 40% höher als bei den jeweiligen Kontrollzellen (Abb. 37: Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit der GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien).

Unter der Annahme, dass die relative Zelldichte nach einem definierten Zeitraum proportional zur Wachstumsgeschwindigkeit ist, zeigte der Kristallviolettassay, dass GDF-15-überexprimierende OVCAR-3 weniger schnell als kontrolltransfizierte OVCAR-3 proliferierten. Diese Ergebnisse bestätigen die BrdU-Analyse, in der die Kontrollzellen ebenfalls tendenziell stärker proliferierten als GDF-15-überexprimierende OVCAR-3.

Im Fall der GDF-15-defizienten OaW-42 divergierten die im Kristallviolettassay ermittelten Ergebnisse von denen der BrdU-Analyse: während im Kristallviolettassay GDF-15-defiziente OaW-42 schneller proliferierten als transfizierte Kontrollzellen, zeigte der BrdU-Assay keinen Unterschied. Der spezifischere Assay zur Bestimmung von Proliferationseigenschaften ist die Messung des BrdU-

Einbaus in die DNA. Denkbar wäre, dass sich die Größe der transfizierten Zellen unterscheidet, was sich nur auf die Zelldichte, nicht jedoch auf den BrdU-Einbau auswirken würde. Alternativ könnte GDF-15 auch einen Einfluss auf die Adhärenz der Zellen haben.

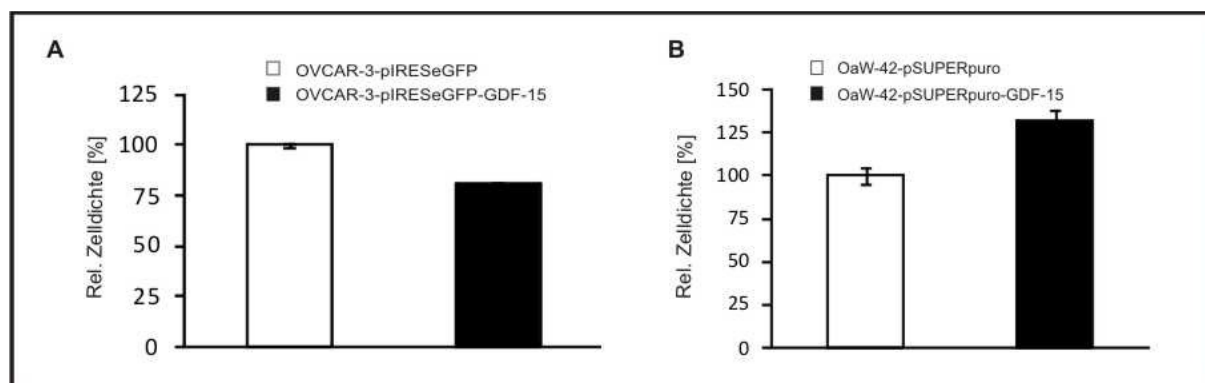


Abb. 37: Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit der GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen. GDF-15-überexprimierende OVCAR-3 (A) und GDF-15-defiziente OaW-42 (B) wurden in einer 96-Well-Platte (10^4 Zellen/Well) 24 h lang bei 37°C kultiviert, anschließend mit Kristallviolett gefärbt und die OD der gefärbten Zellen bei 570 nm gemessen. Durch die Zunahme der Zelldichte während der Inkubationszeit konnte indirekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit geschlossen werden (Standardabweichung der Triplikate, repräsentatives Beispiel) (n=3).

Die Überexpression von GDF-15 hemmte die Proliferation in OVCAR-3, während für GDF-15-Defizienz in OaW-42 sowohl pro- als auch anti-proliferative Effekte beobachtet wurden. Die proliferative Wirkung von endogenem GDF-15 auf OvCA-Zellen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Wirkung von rekombinantem GDF-15 auf die Proliferation der OvCA-Zelllinien sollte daher im Folgenden genaueren Aufschluss bringen. Die Zelldichte wurde unter dem Einfluss von rekombinantem GDF-15 (rhGDF-15), das exogen 24 h lang zu OvCA-Zellen gegeben wurde, mittels Kristallviolett färbung untersucht.

Die mit rhGDF-15 behandelten OvCA-Zellen proliferierten tendenziell langsamer als unbehandelte OvCA-Zellen. Die Abnahme der Zelldichte korrelierte annähernd mit der GDF-15-Konzentration. Den stärksten Effekt nach rhGDF-15-Behandlung zeigten OVCAR-3: hier waren die mit rhGDF-15 behandelten OVCAR-3 um 25% weniger dicht gewachsen als unbehandelte OVCAR-3. Diese Daten bestätigten die Beobachtungen bei GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3, die ebenfalls langsamer proliferierten als die entsprechenden Kontrollen. Den schwächsten Effekt zeigten SKOV-3 und PA-1, bei denen die Anwesenheit von rhGDF-15 die Proliferation nur um etwa 10% verringerte (Abb. 38: Einfluss von rekombinantem GDF-15 auf die Zelldichte von OvCA-Zelllinien).

Diese Ergebnisse zeigen, dass OvCA-Zellen unterschiedlich auf die Anwesenheit von GDF-15 reagieren. Möglicherweise gibt es eine zellartspezifische optimale GDF-15-Konzentration, bei der sich die Zellen am wohlsten fühlen und auf die sie sich normalerweise einstellen.

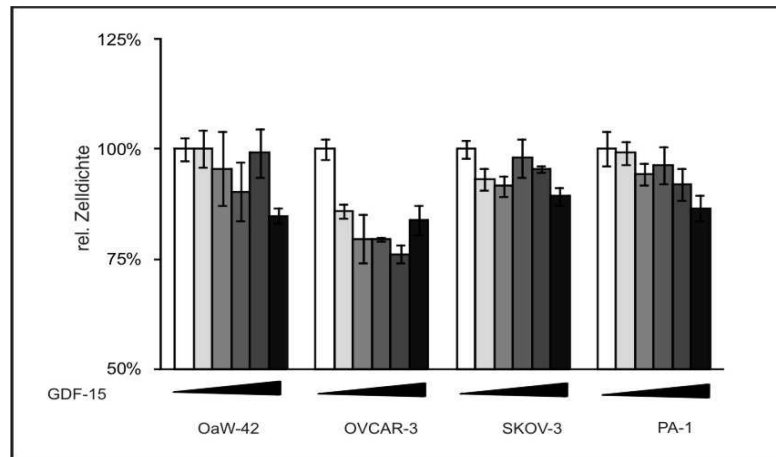


Abb. 38: Einfluss von rekombinantem GDF-15 auf die Zelldichte von OvCA-Zelllinien. 10^4 OvCA-Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden 24 h lang mit (=graue Balken) oder ohne (=weißer Balken) rhGDF-15 in aufsteigender Konzentration ($C_{\text{GDF-15}} = 0/ 6,25/ 12,5/ 25/ 50/ 100/ 200$ ng/ml) inkubiert und anschließend mit Kristallviolettlösung gefärbt. Die relative Zelldichte wurde anhand der Farbintensität der Kristallvioletteinlagerung in lebenden Zellen am Photometer bei 570 nm bestimmt. Die Zelldichte der GDF-15 behandelten Zellen wurde relativ zur Zelldichte unbehandelter Kontrollen dargestellt (repräsentatives Beispiel) (n=3).

3.2.2.4 Expression von Oberflächenmarkern

Tumorzellen weisen häufig ein gegenüber ihren Ursprungszellen verändertes Muster an Oberflächenmolekülen auf. Beispielsweise wird MHC-I häufig von der Zelloberfläche von Tumorzellen herunterreguliert, um der T-Zell-Immunität zu entgehen (Seliger et al., 2006). Dagegen werden Liganden für aktivierende Immunzellrezeptoren bei viraler oder onkogener Transformation auf der Zelloberfläche exprimiert (Bubenik, 2004; Cerwenka and Lanier, 2001, 2003; Groh et al., 1996; Koh et al., 2001). Im folgenden Abschnitt sollte der Einfluss von autokrinem GDF-15 auf die Expression immunrelevanter Oberflächenmoleküle untersucht werden.

3.2.2.4.1 Expression von MHC-I-Molekülen

MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Die „*killer cell immunoglobulin-like receptors*“ (KIR) sind auf NK-Zellen exprimiert und erkennen MHC-I auf der Zelloberfläche von Zielzellen. Werden bestimmte MHC-I-Allele nicht oder in zu geringer Anzahl exprimiert, wird die Inhibition dieser Rezeptoren aufgehoben und die antigenunabhängige Lyse durch NK-Zellen initiiert (Bubenik, 2004; Koh et al., 2001; Long, 2002; Restifo et al., 1993; Seliger et al., 2006). Die Expression von MHC-I-Molekülen auf OvCA-Zellen allgemein und bei GDF-15-Überexpression bzw. -Defizienz im Besonderen sollte untersucht werden.

Dazu wurden die Zellen mit einem anti-MHC-I-Antikörper (panMHC-I, Klon W6/32, Prof. S. Stevanovic, Tübingen), behandelt. Über einen fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Zweitantikörper wurde die Expression von MHC auf den Zelllinien durchflusszytometrisch ermittelt und als „*specific*

fluorescence intensity“ (SFI = $\text{Expression}_{\text{spezifisch}}/\text{Expression}_{\text{unspezifisch}}$) unter Einbezug unspezifischer Bindungen berechnet.

Alle OvCA-Zelllinien exprimierten MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche, was sie potentiell sensitiv gegenüber antigenvermittelter Lyse durch zytotoxische T-Zellen macht. Die höchste Expression war auf SKOV-3 und OVCAR-3 zu beobachten, während OaW-42 eine mittelstarke und PA-1 eine geringe MHC-I-Expression aufwiesen (Abb. 39: MHC-I-Expression auf OvCA-Zelllinien).

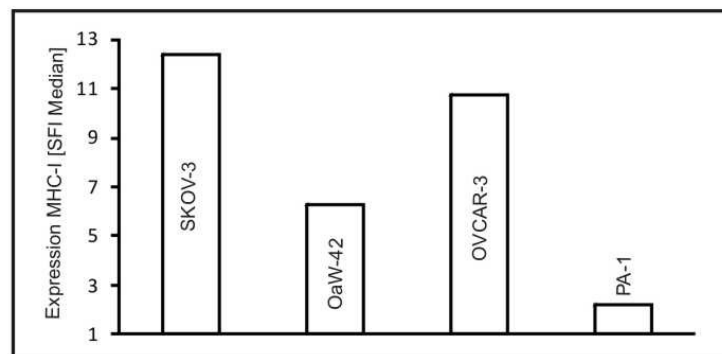


Abb. 39: MHC-I-Expression auf OvCA-Zelllinien. Die MHC-I-Expression auf den OvCA-Zelllinien SKOV-3, OaW-42, OVCAR-3 und PA-1 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Maus-Hybridom-Überstand, dessen Antikörper spezifisch gegen alle MHC-I-Subtypen (panMHC-I) war, inkubiert und deren spezifische Bindung mittels fluoreszenzmarkiertem anti-Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Expression wurde als „*specific fluorescence intensity*“ (SFI = $\text{Expression}_{\text{spezifisch}}/\text{Expression}_{\text{unspezifisch}}$) des Medians der Fluoreszenzintensität, unter Einbezug unspezifischer Bindungen, dargestellt (Messung von $>2 \times 10^4$ Zellen pro Ansatz, repräsentatives Beispiel).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die autokrine GDF-15-Überexpression bzw. die GDF-15-Defizienz in OvCA-Zellen zu einer Veränderung der MHC-I-Expression führt. Die Zelllinien OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 und OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 und ihre entsprechenden Kontrollen wurden dafür durchflusszytometrisch auf ihre MHC-I-Expression wie oben beschrieben untersucht.

Die Überexpression von GDF-15 in der Zelllinie OVCAR-3 führte zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten MHC-I-Induktion, wohingegen die GDF-15-Defizienz in OaW-42 eine signifikante Zunahme der MHC-I-Expression gegenüber der Kontrollzelllinie bewirkte ($p < 0,001$, t-test, Excel) (Abb. 40: MHC-I-Expression auf GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen).

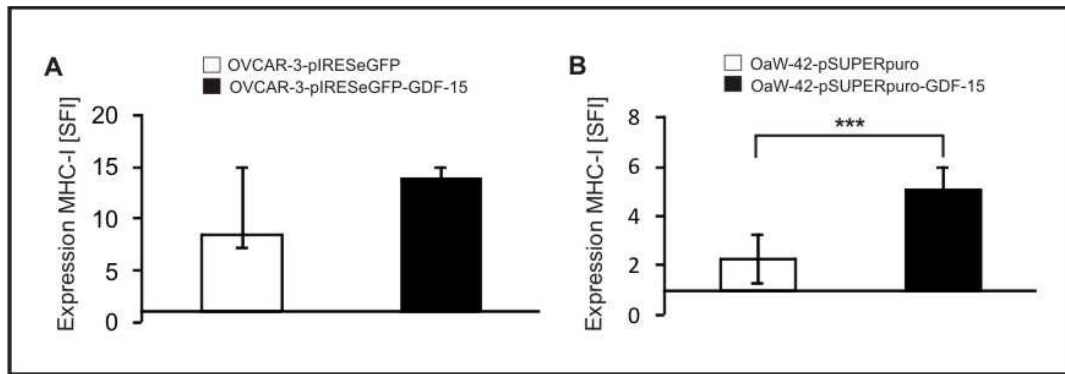


Abb. 40: MHC-I-Expression auf GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen. Die MHC-I-Expression auf den GDF-15-überexprimierenden und -defizienten OvCA-Zelllinien wurde wie in Abb. 39 beschrieben durchflusszytometrisch bestimmt. Die MHC-I-Expression auf GDF-15-überexprimierenden (A) und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen (B) wurde als SFI dargestellt. Der Unterschied bei der MHC-I-Expression zwischen GDF-15-defizienten OaW-42 und Kontrollzellen war signifikant ($p < 0,001$, t-test, Excel) ($n \geq 4$).

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die induzierte MHC-I-Expression bei endogener GDF-15-Defizienz durch Zugabe von exogenem rhGDF-15 revertiert werden konnte.

Dazu wurde die MHC-I-Expression auf GDF-15-defizienten OaW-42 48 h nach exogener Zugabe von 50 ng/ml rekombinatem GDF-15 durchflusszytometrisch bestimmt.

Bei OaW-42-pSUPERpuro und OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 war die MHC-I-Expression mit und ohne rhGDF-15 in etwa gleich hoch. Demzufolge hatte exogenes GDF-15 keinen Einfluss auf die MHC-I-Expression dieser Zelllinie (Abb. 41: MHC-I-Expression auf GDF-15-defizienten Zellen nach Zugabe von exogenem rhGDF-15).

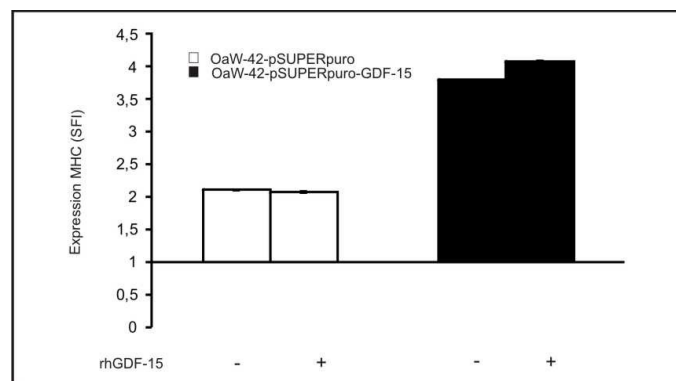


Abb. 41: MHC-I-Expression auf GDF-15-defizienten Zellen nach Zugabe von exogenem rhGDF-15. GDF-15-defiziente OaW-42 und entsprechende Kontrollzellen wurden mit 50 ng/ml rhGDF-15 48 h lang behandelt. Als Kontrollen wurden analog unbehandelte GDF-15-defiziente OaW-42 bzw. Kontrollzellen mitgeführt. Anschließend wurde die MHC-I-Expression durchflusszytometrisch auf der Oberfläche der Zellen anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt (SFI) (repräsentatives Beispiel, $n=2$, mit jeweils $>2 \times 10^4$ Zellen je Ansatz).

3.2.2.4.2 Expression von NKG2D-Liganden

Unter zellulärem Stress wie viraler oder onkogener Transformation exprimieren Zellen Liganden für den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D. Diese sind die MHC-ähnlichen Moleküle MIC-A und MIC-B sowie die ULBP-Moleküle (Cerwenka and Lanier, 2001, 2003; Groh et al., 1996). Eine Bindung der Liganden an den Rezeptor führt zur zytotoxischen Aktivierung der Immunzellen und letztendlich zur Lyse der Liganden-exprimierenden Zelle. Tumore haben jedoch Mechanismen entwickelt, um der NKG2D-Liganden-abhängigen Lyse zu entgehen, indem sie diese von der Zelloberfläche herunterregulieren oder abspalten (Eisele et al., 2006; Jinushi et al., 2005; Raffaghello et al., 2004; Song et al., 2006a; Song et al., 2006b; Waldhauer et al., 2008).

Im Folgenden sollte der autokrine Einfluss von GDF-15 auf die Expression der NKG2D-Liganden (NKG2D-L) MIC-A, MIC-B, ULBP-1, -2 und -3 auf der Oberfläche von primären, aus Asziteskultur isolierten OvCA-Zellen, auf den OvCA-Zelllinien OaW-42, OVCAR-3, SKOV-3 und der Teratom-Zelllinie PA-1 sowie auf GDF-15-überexprimierenden bzw. GDF-15-defizienten OvCA-Zellen durchflusszytometrisch untersucht werden.

Analog zur MHC-I-Färbung wurden die entsprechenden Zellen mit Hybridom-Überstand, der spezifisch für je einen NKG2D-Liganden war, inkubiert und die Antikörperbindung mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen. Unspezifische Bindungen wurden durch Kontrollen, die nur mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden, ermittelt und in die „*specific fluorescence intensity*“ eingerechnet.

In primären, aus Asziteskultur isolierten OvCA-Zellen waren die NKG2D-L MIC-A und ULBP-2 am stärksten exprimiert. MIC-B und ULBP-3 waren nur schwach und ULBP-1 gar nicht auf der Oberfläche exprimiert (Abb. 42: Expression von NKG2D-L auf und in primären OvCA-Zellen). Die Expressionen schwankten spenderabhängiger von SFI=1 (=keine Expression) bis hin zu SFI=2,6.

Zusätzlich wurde die Expression der NKG2D-L in den primären Zellen relativ zu gesundem Ovar in der qRT-PCR gemessen.

Die geringste Expression wies MIC-A auf (Median relative Expression: 5, Ct-Werte: 21 - 30), die höchste Expression wurde bei ULBP-2 gemessen (Median relative Expression: 1800, Ct-Werte: 23 - 28). MIC-B, ULBP-1 und ULBP-3 waren ebenfalls transkriptionell erhöht. Überraschenderweise zeigte MIC-A transkriptionell keine erhöhte Expression gegenüber gesundem Ovar, während es in der Durchflusszytometrie der Ligand mit der höchsten Expression auf primären OvCA-Zellen war. Umgekehrt verhielt es sich bei ULBP-1, das als Protein an der Zelloberfläche von OvCA-Zellen praktisch nicht exprimiert wurde, transkriptionell jedoch induziert war. Möglicherweise sind an der Proteinexpression dieser beiden NKG2D-L weitere Regulationsfaktoren auf post-transkriptioneller und post-translationaler Ebene beteiligt.

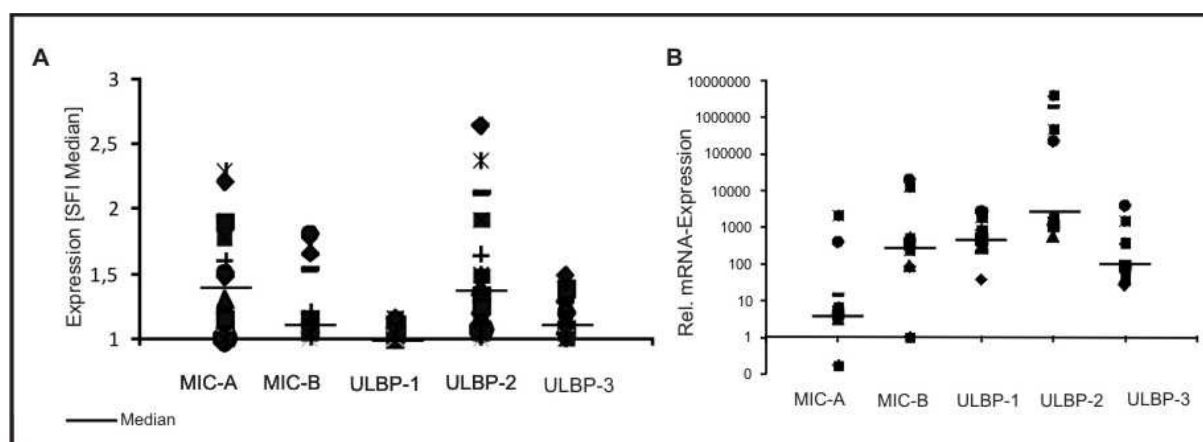


Abb. 42: Expression von NKG2D-Liganden auf und in primären OvCA-Zellen. Die Expression der NKG2D-Liganden MIC-A, MIC-B, ULBP-1, -2 und -3 wurde durchflusszytometrisch auf der Oberfläche von primären OvCA-Zellen aus Asziteskultur untersucht. Die Zellen wurden mit Maus-Hybridom-Überständen, die spezifisch für je einen Liganden sind, gefärbt und deren Bindung anschließend mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper nachgewiesen. Unspezifische Bindung wurde durch Färbung nur mit dem Zweitantikörper berücksichtigt und in den SFI eingerechnet (**A**) (Messung von $>2 \times 10^4$ Zellen je Ansatz). Die relative Expression von NKG2D-L in primären OvCA-Zellen wurde in der semi-quantitativen qRT-PCR relativ zu gesundem Ovar ermittelt (**B**).

Auch bei den OvCA-Zelllinien war MIC-A der am stärksten exprimierte NKG2D-L mit einer Expression von $SFI_{\text{Median}} = 3,1$. Weniger stark exprimiert waren, je nach Zelllinie, die Liganden MIC-B, ULBP-2 und ULBP-3. ULBP-1 wurde wie bei den primären OvCA-Zellen nicht exprimiert (Abb. 43: Expression von NKG2D-L auf und in OvCA-Zelllinien). SKOV-3 war die Zelllinie mit der höchsten Gesamtexpression aller NKG2D-L. Hier waren MIC-A und ULBP-2 am stärksten auf der Zelloberfläche nachweisbar, MIC-B und ULBP-3 waren mittelstark und ULBP-3 kaum exprimiert. PA-1 exprimierte MIC-A und -B gleich stark, ULBP-3 dagegen weniger stark, während ULBP-2 kaum detektiert wurde. Bei OaW-42 wurden nur MIC-A und MIC-B auf der Oberfläche nachgewiesen. OVCAR-3 schließlich hatte eine hohe MIC-A-Expression und eine schwache ULBP-2- und ULBP-3-Expression. MIC-B wurde auf OVCAR-3 nicht detektiert.

Transkriptionell ergab sich ein ähnliches Bild wie bei primären OvCA-Zellen. Die Expressionen von MIC-B, ULBP-1, ULBP-2 und ULBP-3 waren in allen Zelllinien stark induziert. MIC-A jedoch war wie bei den primären OvCA-Zellen nur schwach hochreguliert, während es als Protein auf der Zelloberfläche aller OvCA-Zelllinien stark exprimiert war, und wie bei den primären OvCA-Zellen war auch ULBP-1 transkriptionell induziert, auf der Zelloberfläche als Protein jedoch nicht detektierbar.

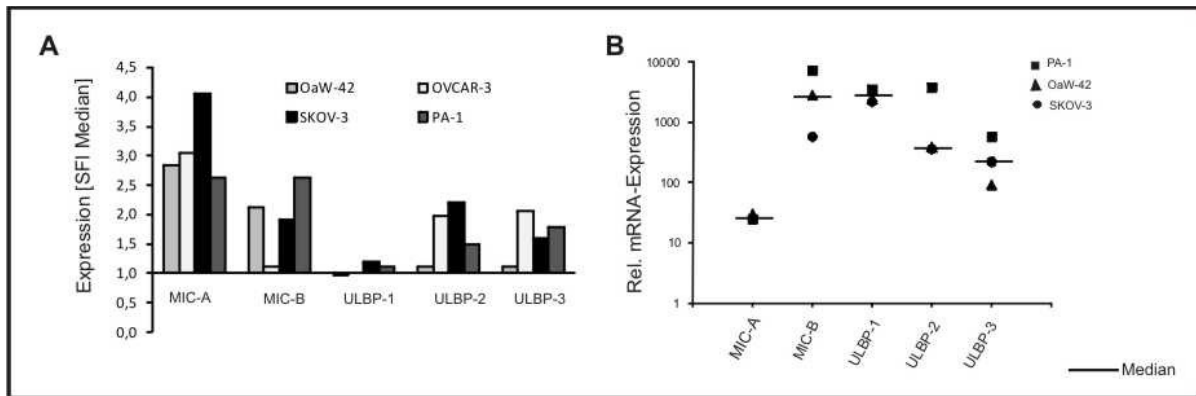


Abb. 43: Expression von NKG2D-L auf und in OvCA-Zelllinien. Die Expression der NKG2D-L MIC-A, MIC-B, ULBP-1, -2 und -3 auf den OvCA-Zelllinien OaW-42, OVCAR-3, SKOV-3 und PA-1 wurden wie in Abb. 42 beschrieben durchflusszytometrisch (A) und in der qRT-PCR untersucht (B).

Als nächstes wurde der Einfluss von endogener GDF-15-Überexpression und von GDF-15-Defizienz auf die Oberflächenexpression der NKG2D-L durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Überexpression von GDF-15 in OVCAR-3 führte zu einer Herunterregulation der NKG2D-L Expression gegenüber der Kontrollzelllinie. Bei MIC-B und ULBP-3 war dieser Unterschied nur geringfügig ausgeprägt, während er am deutlichsten bei MIC-A und ULBP-2 zu beobachten war.

Verglichen mit den Kontrollen war die Expression der NKG2D-L in GDF-15-defizienten OaW-42 dagegen induziert. MIC-A war etwa doppelt, MIC-B und ULBP-1 mehr als doppelt so stark und ULBP-3 um zwei Drittel stärker exprimiert. ULBP-2 war nicht exprimiert (Abb. 44: Expression von NKG2D-L auf GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen).

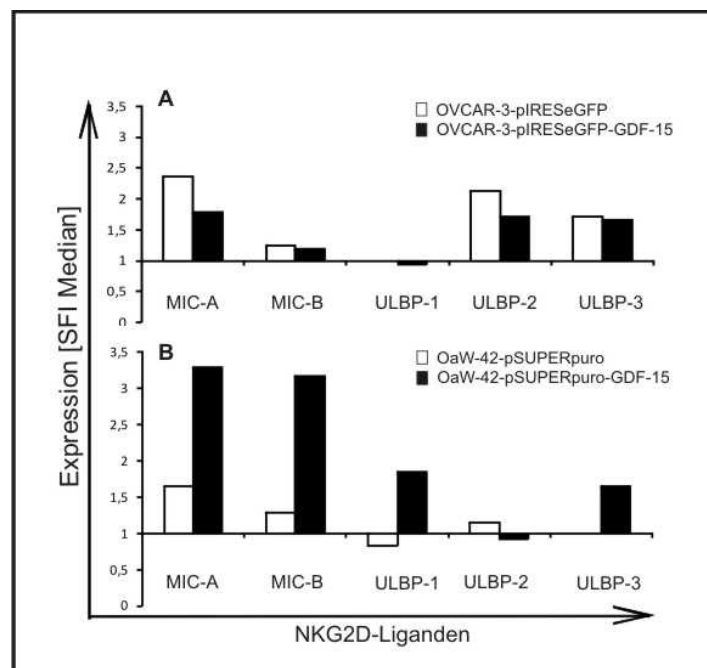


Abb. 44: Expression von NKG2D-L auf GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen. Die Expression der NKG2D-L MIC-A, MIC-B, ULBP-1, -2 und -3 auf GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 (A) und GDF-15-defizienten OaW-42 (B) wurde wie in Abb. 42 beschrieben durchflusszytometrisch bestimmt und die Expression als SFI dargestellt (Messung von $>2 \times 10^4$ Zellen je Ansatz) (repräsentatives Beispiel).

Um einen Hinweis auf die Art der Regulation zu erhalten, wurde die veränderte Expression der NKG2D-L in GDF-15-defizienten Zellen zusätzlich in der qRT-PCR untersucht.

In GDF-15-defizienten OaW-42 waren die NKG2D-L, abgesehen von ULBP-3, gegenüber der Kontrollzelllinie induziert, was die Daten der durchflusszytometrischen Analyse bestätigt (Abb. 45: Relative mRNA-Expression der NKG2D-L in GDF-15-defizienten OaW-42).

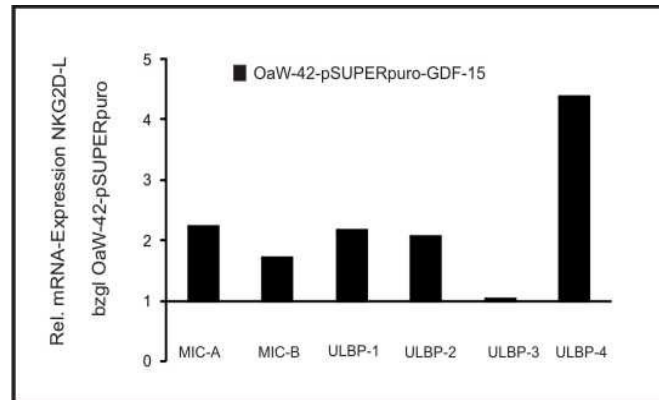


Abb. 45: Relative mRNA-Expression der NKG2D-L in GDF-15-defizienten OaW-42. Die transkriptionelle Expression der NKG2D-L MIC-A und -B, ULBP-1, 2, -3 und -4 wurde mittels qRT-PCR in OaW-42-pSUPERpuro und in OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 gemessen und die Expression der NKG2D-L in OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 relativ zur Kontrolle OaW-42-pSUPERpuro ermittelt (repräsentatives Beispiel).

Auf RNA-Ebene war ULBP-4, was mangels Antikörper als Protein (noch) nicht nachweisbar war, am stärksten induziert. Ebenfalls stark hochreguliert waren die Expressionen von MIC-A, ULBP-1 und -2. ULBP-3 war transkriptionell nicht reguliert, wohingegen ULBP-2 als Protein nicht detektiert wurde, wohl aber transkriptionell induziert war.

Die NKG2D-L-Expression auf GDF-15-defizienten Zellen konnte durch Supplementation von exogenem rhGDF-15 nicht revertiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.4.3 Expression von DNAM-1-Liganden

DNAM-1 ist ein weiterer aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen, von dem berichtet wurde, dass er besonders bei der Immunantwort gegen das OvCA eine Rolle spielt (Carlsten et al., 2007). Die Liganden von DNAM-1 (DNAM-1-L) sind PRR-2 (auch bekannt als Nectin-2 oder CD112) und der Poliovirusrezeptor CD155 (PVR-2). Die Bindung der Liganden an den Rezeptor DNAM-1 führt zur Aktivierung der NK-Zelle und zur zytotoxischen Lyse der Targetzelle (Gilfillan et al., 2008). Hier sollte überprüft werden, ob endogenes GDF-15 einen Einfluss auf die Expression der DNAM-1-L auf OvCA-Zellen hat.

Zunächst wurde die Expression von PRR-2 und CD155 auf OvCA-Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht werden, um zu klären, ob eine Lyse von OvCA-Zellen über diesen Rezeptor grundsätzlich möglich wäre.

PRR-2 war bei OaW-42 und SKOV-3 sehr stark exprimiert, auf OVCAR-3 schwächer. CD155 war auf OaW-42 nicht exprimiert, auf OvCAR-3 schwach und auf SKOV-3 sehr stark. Damit war SKOV-3 von den untersuchten OvCA-Zelllinien diejenige, die beide DNAM-1-L am stärksten exprimierte (Abb. 46: DNAM-1-Liganden-Expression auf OvCA-Zelllinien).

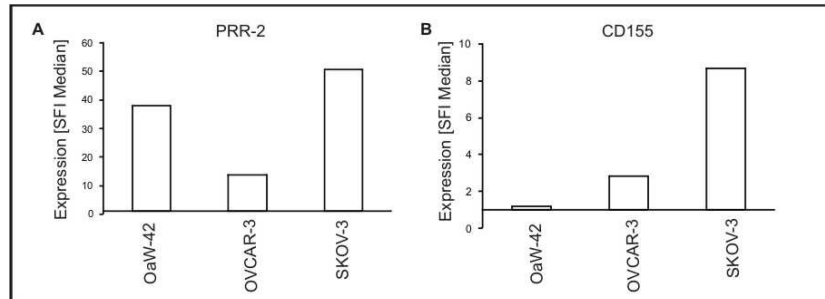


Abb. 46: DNAM-1-Liganden-Expression auf OvCA-Zelllinien. Die OvCA-Zelllinien OaW-42, OVCAR-3 und SKOV-3 wurden auf die Expression der DNAM-1-Liganden PRR-2 (A) und CD155 (B) durchflusszytometrisch untersucht und als SFI des Medians dargestellt (Messung von $>2 \times 10^4$ Zellen je Ansatz, repräsentatives Beispiel).

Um zu prüfen ob die endogene GDF-15-Expression einen Einfluss auf die Expression der DNAM-1-Liganden hat, wurde deren Expression auf den GDF-15-überexprimierenden und den GDF-15-defizienten OvCA-Zellen analysiert.

Bei GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 wurde nur ein geringfügiger Unterschied bei der PRR-2-Expression beobachtet. Die GDF-15-Überexpression führte jedoch zur Herunterregulation von CD155 auf der Oberfläche von OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Auf GDF-15-defizienten OaW-42 war PRR-2 stärker exprimiert als in den dazugehörigen Kontrollzellen, kein Unterschied war dagegen bei der CD155-Expression zu beobachten (Abb. 47: Expression der DNAM-1-Liganden PRR-2 und CD155 auf GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen).

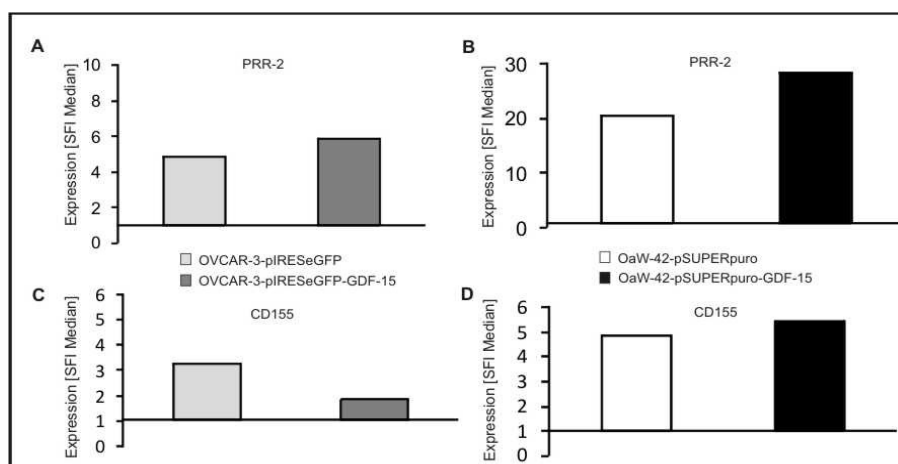


Abb. 47: Expression der DNAM-1-Liganden PRR-2 und CD155 auf GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zellen. Die Expression von PRR-2 und CD155 wurde auf OVCAR-3-pIRESeGFP und OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 (A, C) sowie auf OaW-42-pSUPERpuro und OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 (B, D) durchflusszytometrisch bestimmt und die Expression als SFI des Medians ermittelt. Expression von PRR-2 (A) und CD155 (C) auf GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 und PRR-2 (B) und CD155 (D) auf GDF-15-defizienten OaW-42 (Messung von $>2 \times 10^4$ Zellen je Ansatz, repräsentative Beispiele).

3.2.3 Zusammenfassung: Autokrine Funktion von GDF-15 im Ovarialkarzinom

Die vorangegangenen Experimente an GDF-15-überexprimierenden und GDF-15-defizienten OvCA-Zelllinien zeigen, dass endogenes GDF-15 nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum und die metabolische Aktivität von OvCA-Zellen hat. Die Wachstumsunterschiede von GDF-15-defizienten bzw. GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen gegenüber ihren jeweiligen Kontrollen sind nur gering und nicht signifikant.

GDF-15-defiziente OaW-42 proliferieren gemäß dem BrdU-Assay langsamer, zeigen im Kristallviolettassay aber eine höhere Zelldichte als ihre Kontrollen und der metabolische Umsatz von WST ist in GDF-15-defizienten OaW-42 tendenziell verlangsamt.

GDF-15-überexprimierende OVCAR-3 proliferieren gemäß BrdU-Assay und Kristallviolettassay langsamer als die Kontrollzellen, der metabolische Umsatz von WST in GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 ist jedoch tendenziell induziert.

Deutliche Unterschiede wurden bei der Expression von immunrelevanten Oberflächenmolekülen beobachtet: GDF-15-defiziente OaW-42 haben gegenüber der Kontrollzelllinie eine höhere MHC-I-Expression, die sich durch exogenes GDF-15 jedoch nicht beeinflussen lässt.

NKG2D-Liganden sind auf GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen geringfügig niedriger exprimiert als auf den entsprechenden Kontrollzelllinien, ebenso der DNAM-1-L CD155, während der DNAM-1-L PRR-2 von der GDF-15-Überexpression weitgehend unbeeinflusst bleibt.

GDF-15-Defizienz hingegen erhöht die NKG2D-Liganden-Expression an der Zelloberfläche gegenüber der Kontrollzelllinie. Die NKG2D-L-Induktion in GDF-15-defizienten OaW-42 ist auch auf RNA-Ebene zu beobachten. Auch der DNAM-1-Ligand PRR-2 ist induziert, während CD155-Expression durch die GDF-15-Defizienz nicht beeinflusst ist.

GDF-15 kann demnach als ein wichtiger, wenngleich nicht zwingend obligater autokriner Faktor im OvCA auftreten. Die Wirkung von GDF-15 kann zudem über die autokrine Funktion hinausreichen. Welchen parakrinen Nutzen die GDF-15-Überexpression durch OvCA-Zellen hat, sollte daher im folgenden Teil untersucht werden.

3.3 Parakrine Wirkung von GDF-15 im Ovarialkarzinom - Funktionalitätsstudien in Immunzellen -

Nachdem im vorherigen Abschnitt die Wirkung von GDF-15 von der autokrinen Seite her betrachtet wurde, sollte nun die GDF-15-Wirkung im OvCA aus parakriner Sicht untersucht werden. Insbesondere die Frage nach der Rolle von GDF-15 beim „*immune escape*“ des OvCAs und seine Wirkung auf die Anti-Tumorimmunität sollten hier eingehend untersucht werden.

3.3.1 Immuneffektorzellen im Aszites

Aszites bildet sich häufig bei OvCA-Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium. Neben Tumor- und Bindegewebszellen enthält dieser auch Immunzellen (Auersperg et al., 2002). Da diese Immunzellen neben den Tumor-infiltrierenden Immunzellen dem Tumor am nächsten sind, reflektieren und prägen sie das Tumormikromilieu. Besonders im Hinblick auf eine Tumorimmuntherapie ist es von Bedeutung, die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate zu kennen. Es sollte daher untersucht werden, welche Immunzellen im Aszites der untersuchten OvCA-Patientinnen nachweisbar sind.

Zellen aus frischem Aszites wurden durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt und anschließend mit Antikörpern gegen CD-Marker (CD3, CD4, CD8, CD25, CD56) zur Unterscheidung der wichtigsten zytotoxischen Effektorzellen der adaptiven und der angeborenen Immunität gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

In den untersuchten OvCA-Aszitesproben waren NK-, NKT-, CD8⁺- sowie CD4⁺-T-Zellen und T_{reg} nachweisbar. Hierbei machten NKT und T_{reg} im Durchschnitt nur 3% bzw. 1% der Gesamtzellpopulation aus; auch NK-Zellen waren mit durchschnittlich 4% selten nachweisbar. CD8⁺-T-Zellen mit einem Anteil von 17% waren dagegen häufig vertreten. Den größten Anteil der Immunzellpopulation innerhalb der Asziteszellen stellten die CD4⁺-T-Zellen mit 37% dar (Abb. 48: Immunzellpopulationen im OvCA-Aszites).

Im Blut ist die Zusammensetzung dieser Lymphozyten ähnlich verteilt: CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen bilden den größten Anteil mit 50-60% (CD4⁺-T) und 20-25% (CD8⁺-T), davon 0,2% NKT. T_{reg} machen bis zu 10% der CD4⁺-T-Zellpopulation aus (Shevach, 2002). Der NK-Zellanteil variiert spenderabhängig zwischen 5% und 15% (Abbas and Lichtman, 5th edition 2005).

Die lokalen CD8⁺-T, CD4⁺-T, NK- und NKT-Immunzellen konnten den Tumor augenscheinlich nicht eliminieren. Verantwortlich für die Ineffizienz der lokalen Immunzellen kann das immunsuppressive Milieu des Tumors sein, z.B. durch sezernierte Zytokine wie GDF-15, das im OvCA-Aszites hoch exprimiert ist. Daher sollte im Folgenden die Wirkung von GDF-15 auf Immuneffektorzellen im Hinblick auf die Immunevasion des OvCA untersucht werden.

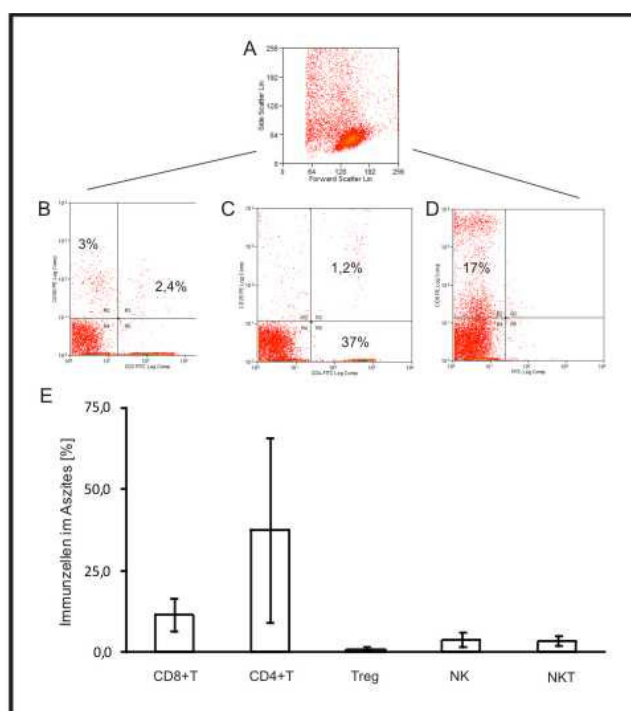


Abb. 48: Immunzellpopulationen im OvCA-Aszites. Frische Asziteszellen wurden durch Zentrifugation geerntet, mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD25 und CD56 gefärbt und der Anteil der Immunzellsubpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. Die Asziteszellpopulation in der FSC vs. SSC Darstellung (A), CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen und CD3⁺CD56⁺-NKT-Zellen (B), CD25⁺CD4⁺-T-Zellen und CD25⁺CD4⁺-T_{reg} (C) und CD8⁺-T-Zellen (D) (repräsentative Beispiele). Mittelwerte der Immuneffektorzellanteile in % der Gesamtzellpopulation des Aszites (n=4) (E).

3.3.2 Modulation der NK-Zell-Lyseaktivität durch GDF-15

Die Vermittlung von Zytotoxizität - der Induktion von Zelltod - durch Effektorzellen ist eine wichtige Aufgabe des Immunsystems. CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen sind die zytotoxischen Effektorzellen des Immunsystems, die entartete oder befallene Zellen eliminieren können. Während CD8⁺-T-Zellen über antigenabhängige Mechanismen aktiviert werden, gibt es für NK-Zellen verschiedene antigenunabhängige Auslöser: die fehlende oder veränderte Expression von HLA-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die stressinduzierte Expression von NKG2D-Liganden MIC-A, MIC-B oder ULBP oder die Expression anderer Rezeptor-aktivierender Liganden. Die Effektorfunktion beider Zelltypen ist trotz der unterschiedlichen Art der Aktivierung ähnlich und endet im Tod der betroffenen Zelle.

TGF- β ist einer der stärksten immuninhibitorischen Faktoren überhaupt. TGF- β 1 vermindert die Lyseaktivität von NK- und T-Zellen (Eisele et al., 2006). In Abschnitt 3.1 wurde gezeigt, dass im OvCA mit GDF-15 ein anderes Mitglied der TGF- β -Familie induziert ist, was vermuten lässt, dass es dem Tumor in irgendeiner Weise nützlich ist. Seine genaue Funktion, v.a. in Hinblick auf das Immunsystem, ist jedoch immer noch unklar. Der Einfluss von GDF-15 auf die NK-Zellaktivität sollte daher in Anlehnung an TGF- β untersucht werden.

3.3.2.1 Lyseaktivität von NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss

NK-Zellen sind in der Tumormunologie von besonderem Interesse, da sie ohne vorherige Antigenerkennung („*priming*“) ihre Zielzelle lysieren können. Zusätzlich zu ihrer lytischen Funktion aktivieren NK-Zellen weitere Komponenten des Immunsystems durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. Das macht sie zu schnellen zytotoxischen Mediatoren der Immunantwort gegen Tumore und zu attraktiven Werkzeugen der Tumormuntherapie. Hier sollte untersucht werden, ob GDF-15 Einfluss auf die Lyseaktivität von NK-Zellen haben kann.

Polyklonale NK-Zellen (pNK) wurden mit teilungsinaktivierten RPMI 8866-Feederzellen angezüchtet und 48 h lang mit rhGDF-15 behandelt, bevor ihre Lyseaktivität gegenüber OvCA-Zellen durchflusszytometrisch in einem modifizierten „*fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis*“ (FATAL)-Assay (NK- statt T-Zellen) untersucht wurde. Zusätzlich wurden pNK gegen Luziferase-transfizierte OvCA-Zelllinien in einem Biophotonen-Lyse-Assay eingesetzt und die Lyseaktivität mit und ohne rhGDF-15-Vorbehandlung bestimmt.

Für die Lyse-Experimente wurden pNK am Tag 7 der Kultur für weitere 48 h 50 ng/ml rhGDF-15 zugesetzt. Für den Biophotonen-Lyse-Assay wurden Luziferase-transfizierte SKOV-3-fluc als Targets eingesetzt. Diese exprimieren stabil das Enzym Luziferase, welches bei Umsetzung des Substrates messbare Photonen erzeugt. pNK wurden in verschiedenen „Effektor-zu-Target“-Verhältnissen („*Effector:Target-Ratio*“, E:T Ratio) 4 h lang zu den SKOV-3-fluc gegeben. Die Lyse der Targetzellen wurde nach Zugabe des Substrats Luziferin im Luminometer als Photonenfreisetzung in „*relative light units*“ (RLU) gemessen und anhand der nicht lysierten Kontrolle als % Lyse dargestellt. Die Menge der freigesetzten Photonen war dabei indirekt proportional zur Lyseaktivität der NK-Zellen.

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der NK-vermittelten Lyse wurden pNK mit dem Membranfarbstoff PKH26 bzw. Vybrant Dil und die OvCA-Targetzellen mit Carboxylfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gefärbt. CFSE ist ein zytoplasmatischer Farbstoff, der bei Lyse der OvCA-Zellen aus der Zelle diffundieren kann, wodurch die CFSE-Fluoreszenz abnimmt. Der Anteil der Zellen mit verminderter CFSE-Fluoreszenz wurde als % Lyse unter Abzug der nicht lysierten Kontrolle berechnet.

GDF-15-vorbehandelte NK-Zellen lysierten OvCA-Targetzellen schlechter als unbehandelte NK-Zellen (Abb. 49: NK-Zell-Lyse an OvCA-Zellen mit GDF-15-vorbehandelten NK-Zellen). Die Lyseeffizienz von GDF-15-vorbehandelten pNK-Zellen war um bis zu 40% schlechter als die von unbehandelten NK-Zellen. Die Ergebnisse des Biophotonen-Lyse-Assays wurden in der Durchflusszytometrie bestätigt.

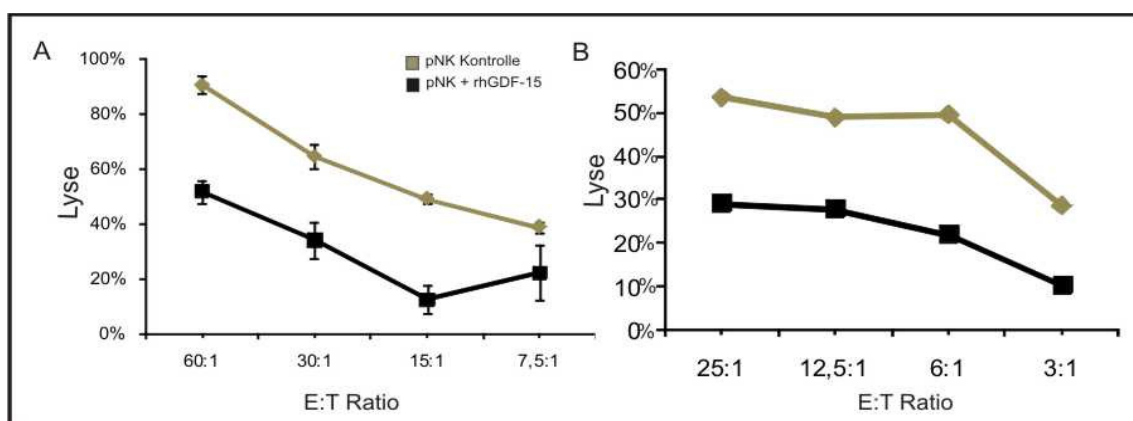


Abb. 49: NK-Zell-Lyse an OvCA-Zellen mit GDF-15-vorbehandelten NK-Zellen. Polyklonale NK-Zellen (pNK) von gesunden Donoren wurden 7 Tage lang in Co-Kultur mit teilungsinaktiven RPMI 8866-Feederzellen kultiviert, bevor sie weitere 48 h lang mit 50 ng/ml rhGDF-15 behandelt wurden. Luziferase-transfizierte SKOV-3-fluc wurden 4 h lang im angegebenen „Effector:Target“-Verhältnis (E:T Ratio) mit den NK-Zellen inkubiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer anhand der Photonenfreisetzung als „relative light units“ (RLU) gemessen. Die Lyse in % wurde auf die nicht lysierte Negativkontrolle bezogen (A) (Standardabweichung der Triplikate). GDF-15-vorbehandelte pNK und Kontrollen wurden mit PKH-26/Vybrant Dil gefärbt und 4 h lang im angegebenen E:T-Verhältnis zu CFSE-gefärbten OvCA-Targetzellen gegeben, bevor die Lyse anhand der CFSE-Fluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt wurde (B) (repräsentative Beispiele) (n=3).

Nachdem gezeigt wurde, dass rekombinantes GDF-15 die NK-Zell-Lyse hemmt, sollte im Folgenden der Effekt von nativem GDF-15 untersucht werden. Dazu wurden pNK mit dem zellfreien Kulturüberstand von GDF-15-defizienten OvCA-Zellen und von OvCA-Zellen, die GDF-15 überexprimierten, 48 h lang behandelt. Anschließend wurden die pNK wie oben beschrieben im modifizierten FATAL-Assay gegen OvCA-Targetzellen eingesetzt und die Lyseaktivität durchflusszytometrisch bzw. im Biophotonen-Assay der mit Überstand behandelten pNK gegen OvCA-Targets bestimmt.

pNK, die mit GDF-15-„knock-down“-Überstand behandelt wurden, lysierten OvCA-Zellen besser als pNK, die mit entsprechendem Kontrollüberstand behandelt wurden. Analog dazu lysierten pNK, die mit Überstand von GDF15-überexprimierenden OvCA vorbehandelt wurden, OvCA-Targetzellen schlechter als die entsprechenden pNK, die mit Kontrollüberstand behandelt wurden (Abb. 50: NK-Zell-Lyse an OvCA-Zellen: NK-Zellen mit Zellkulturüberstand von GDF-15-„knock-down“- bzw. GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen).

Zellkulturüberstand mit nativem GDF-15 konnte die NK-Lyseaktivität gegen OvCA-Zellen ebenso wie rhGDF-15 hemmen.

Hiermit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass mit GDF-15 ein weiteres TGF- β -Familienmitglied die Lysefähigkeit polyklonaler NK-Zellen hemmte.

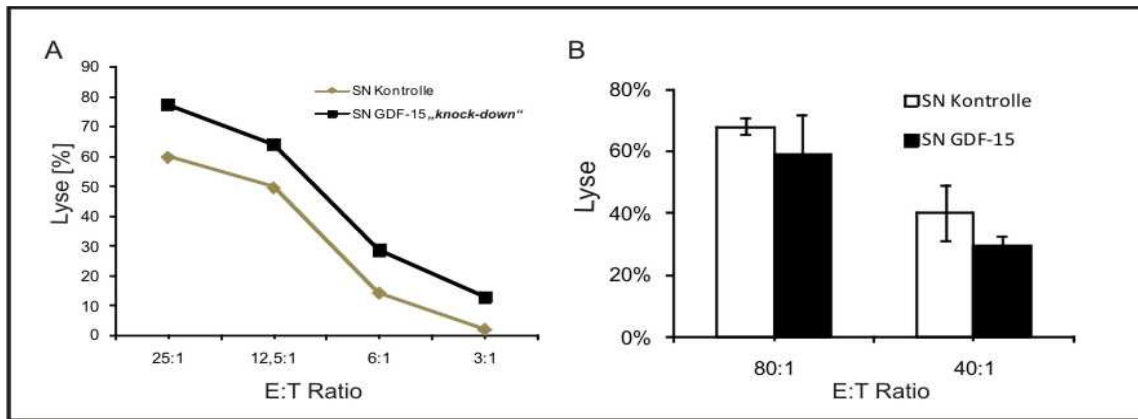


Abb. 50: NK-Zell-Lyse an OvCA-Zellen: NK-Zellen mit Zellkulturüberstand von GDF-15-„knock-down“ bzw. GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen. pNK wurden wie in Abb. 51 beschrieben kultiviert und 48 h lang mit dem Überstand (SN) von GDF-15-defizienten (A) bzw. GDF-15-überexprimierenden (B) OvCA-Zellen sowie jeweils entsprechendem Kontroll-SN behandelt. Die pNK wurden 4 h lang im angegebenen E:T-Verhältnis zu SKOV-3 (A) bzw. SKOV-3-fluc (B) gegeben und die Lyse durchflusszytometrisch (A) bzw. im Biophotonen-Lyse-Assay (B) wie in Abb. 49 beschrieben analysiert (repräsentative Beispiele) (n=3).

3.3.2.2 Lyse von GDF-15-defizienten und GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob GDF-15-Defizienz bzw. GDF-15-Überexpression der OvCA-Targets bei der NK-Zell-Lyse eine Rolle spielt. Dazu wurden pNK ohne Vorbehandlung mit OaW-42-pSUPERpuro und OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 sowie OVCAR-3-pIRESeGFP und OVCAR-3-pIRESeGFP-GDF-15 als Targets 4 h lang inkubiert und die Lyseaktivität durchflusszytometrisch wie unter 3.3.2.1 beschrieben untersucht.

GDF-15-defiziente OvCA-Targetzellen wurden von NK-Zellen effizienter lysiert als GDF-15-exprimierende Kontrollzellen. GDF-15-überexprimierende OvCA-Targetzellen hingegen wurden schlechter lysiert als ihre entsprechenden Kontrollzellen, die weniger GDF-15 sezernierten (Abb. 51: NK-Zell-Lyse an GDF-15-defizienten bzw. GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen).

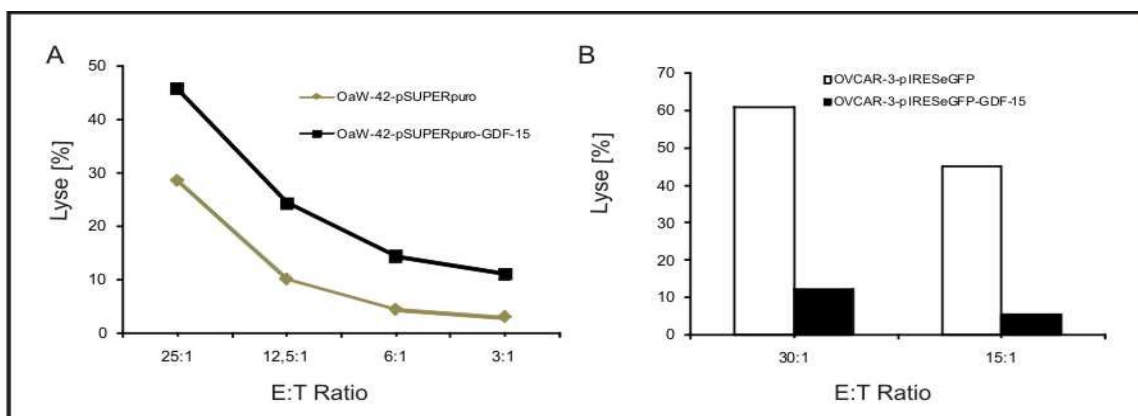


Abb. 51: NK-Zell Lyse an GDF-15-defizienten bzw. GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen. pNK wurden wie in Abb. 49 beschrieben behandelt und im angegebenen E:T-Verhältnis 4 h lang gegen GDF-15-defiziente (A)

bzw. GDF-15-überexprimierende OvCA-Zellen (**B**) sowie gegen die entsprechende Kontrollzellen eingesetzt und die Lyse durchflusszytometrisch analysiert (repräsentative Beispiele) (n=3).

Nachdem gezeigt wurde, dass GDF-15 auf die NK-Lyseaktivität Einfluss nehmen kann, sollten diese Ergebnisse mittels siRNA-„*knock-down*“ von GDF-15 in OvCA-Zelllinien reproduziert werden. Dazu wurden OaW-42 mit GDF-15-siRNA bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA 48 h lang behandelt und der zellfreie Kulturüberstand zur Vorbehandlung von pNK verwendet. Desweiteren wurden GDF-15-siRNA-transfizierte PA-1 selbst als Targets zur Lyse mit unbehandelten pNK eingesetzt.

pNK, die 48 h lang mit Überstand von GDF-15-siRNA-behandelten Zellen vorinkubiert wurden, lysierten OvCA-Targets besser als pNK, die mit dem Überstand von Kontroll-siRNA-behandelten Zellen vorinkubiert wurden. Zudem wurden wie zuvor bei stabilen GDF-15-„*knock-down*“ Zellen GDF-15-siRNA behandelte OvCA-Targetzellen besser lysiert als OvCA-Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden (Abb. 52: Einfluss von GDF-15-siRNA-Behandlung auf die NK-Zell-Lyse an OvCA-Zellen).

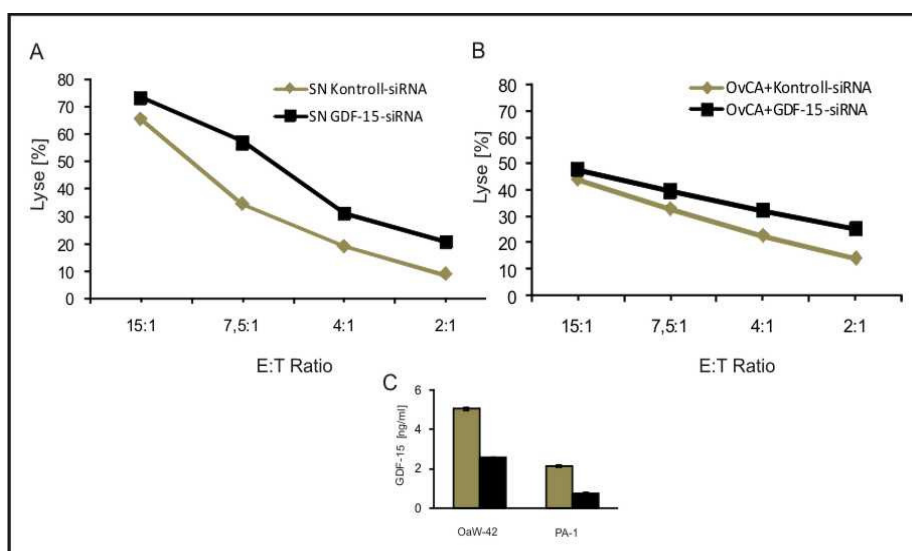


Abb. 52: Einfluss von GDF-15-siRNA-Behandlung auf die NK-Zell-Lyse an OvCA-Zellen. pNK wurden wie in Abb. 49 beschrieben angezogen, 48 h lang mit dem Überstand (SN) von GDF-15-siRNA- oder Kontroll-siRNA-behandelten OaW-42 inkubiert und im angegebenen E:T-Verhältnis 4 h lang im Lyse-Assay gegen unbehandelte OaW-42 eingesetzt und durchflusszytometrisch analysiert (**A**). Unbehandelte pNK wurden im angegebenen E:T-Verhältnis 4 h lang gegen GDF-15-siRNA- bzw. Kontroll-siRNA-behandelte PA-1 eingesetzt und die Lyse durchflusszytometrisch analysiert (**B**) (siRNA-abhängige GDF-15-Herunterregulation im Überstand von OaW-42 und PA-1, **C**) (repräsentative Beispiele) (n=3).

Mit den GDF-15-siRNA-Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass GDF-15 die Lyseaktivität von NK-Zellen einschränkt, woraus sich die Frage ergab, wie GDF-15 die NK-Zellaktivität beeinflusst.

3.3.2.3 Lyse unter NK-Zellrezeptorblockade

Die NK-Zellaktivität wird über die Aktivierung und Inhibition von Rezeptoren gesteuert. NKG2D ist einer der wichtigsten aktivierenden Rezeptoren von NK-Zellen. Es ist bekannt, dass NKG2D durch TGF- β herunterreguliert wird, was zur Hemmung der Lyseaktivität führt (Friese et al., 2004). Mit MIF wurde gezeigt, dass ein weiterer Faktor im OvCA die NK-Zell-Lyse NKG2D-abhängig hemmt (Krockenberger, Dombrowski et al., 2008).

DNAM-1 ist ein weiterer wichtiger aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen. Carlsten et al. zeigten, dass die NK-Zell-abhängige Lyse von OvCA-Zellen DNAM-1-abhängig verlief und zusätzlich durch NKG2D komplementiert wurde (Carlsten et al., 2007). Von DNAM-1 ist bislang nicht bekannt, dass es durch ein Mitglied der TGF- β -Familie reguliert wird.

Es sollte daher untersucht werden, ob GDF-15 die NK-Lyse wie TGF- β NKG2D-abhängig oder wie von Carlsten für das OvCA beschrieben DNAM-1-abhängig inhibiert. Dazu wurden NK-Zellen wie oben beschrieben 48 h lang mit rhGDF-15 behandelt. Zusätzlich wurden die pNK vor der Zusammensetzung mit den OvCA-Targetzellen 30 min lang mit blockierendem anti-NKG2D- bzw. anti-DNAM-1-Antikörper oder unspezifischem Kontrollantikörper inkubiert. Die Lyse erfolgte 4 h lang und wurde im Biophotonen-Assay untersucht.

Im Kontrollansatz lysierten NK-Zellen, deren NKG2D-Rezeptoren durch den Antikörper blockiert waren, die OvCA-Zellen schlechter als diejenigen, die mit Kontrollantikörper behandelt wurden.

GDF-15 vorbehandelte NK-Zellen lysierten die OvCA-Targetzellen generell schlechter als unbehandelte Kontrollen, was die zuvor beobachteten Ergebnisse bestätigte. Die Blockade von NKG2D nach GDF-15-Vorbehandlung führte zu keiner wesentlichen Veränderung in der Lyseaktivität der NK-Zellen.

Unbehandelte NK-Zellen, deren DNAM-1-Rezeptoren blockiert wurden, lysierten OvCA-Zellen schlechter als unbehandelte Kontrollen. Auch hier hemmte GDF-15 die Lyseaktivität der NK-Zellen in der Gruppe der GDF-15-vorbehandelten NK-Zellen. DNAM-1-Blockade führte in Kombination mit GDF-15-Vorbehandlung jedoch zu einer weiteren Reduktion der Lyseaktivität der NK-Zellen (Abb. 53: NK-Zell-vermittelte Lyse mit NKG2D- und DNAM-1-Rezeptorblockade).

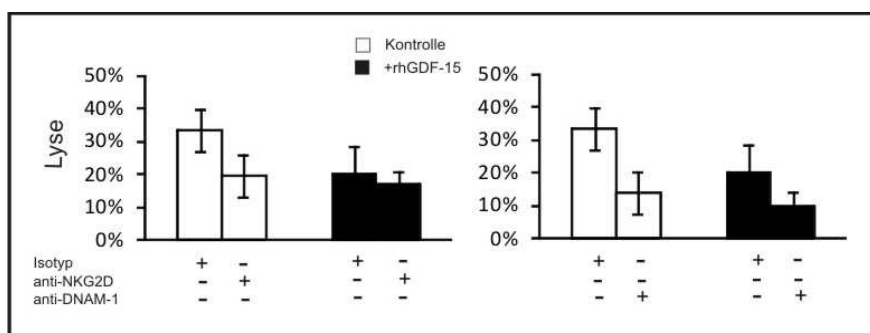


Abb. 53: NK-Zell-vermittelte Lyse mit NKG2D- und DNAM-1-Rezeptorblockade. pNK wurden wie in Abb. 49 beschrieben isoliert und 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) behandelt. Bevor sie im E:T-Verhältnis 30:1 zu OvCA-Targets gegeben wurden, wurden die pNK mit Isotypantikörper, anti-NKG2D- (A) oder anti-DNAM-1- (B) Antikörper (je 10 μ g/ml, beide Miltenyi) 30 min lang inkubiert und schließlich im Biophotonen-Assay im Triplikat analysiert (repräsentative Beispiele).

Die Blockade des Rezeptors NKG2D verhinderte die Aktivierung von NK-Zellen über diesen Rezeptor. Interessanterweise hatte die Blockade von NKG2D keinen zusätzlichen Einfluss, wenn die NK-Zellen zuvor durch GDF-15 inhibiert worden waren. Dies kann daran liegen, dass GDF-15 innerhalb der 48 h Vorinkubation eine Herunterregulation oder Internalisierung des Rezeptors induziert, so dass NKG2D nach Vorbehandlung mit GDF-15 nicht mehr in der Lage ist zur Lyse beizutragen.

Die Blockade des Rezeptors DNAM-1 führte zu einer weiteren Inhibition der Lyseaktivität der NK-Zellen zusätzlich zur GDF-15-vermittelten Hemmung. Die GDF-15-Vorbehandlung führte in diesem Fall nicht zur Inaktivierung des Rezeptor-vermittelten Signalwegs, da sonst keine zusätzliche Hemmung durch den blockierenden Antikörper möglich gewesen wäre. Die GDF-15-vermittelte Inhibition der NK-Lyse verläuft somit höchstwahrscheinlich nicht über DNAM-1-Herunterregulation.

Nachdem gezeigt wurde, dass GDF-15 die NK-Zell-Aktivität hemmt und funktionelle Daten darauf hindeuten, dass die GDF-15-vermittelte Inhibition NKG2D-abhängig verläuft, sollte im Folgenden untersucht werden, ob GDF-15 direkt Einfluss auf die Expression dieser und weiterer NK-Rezeptoren ausübt.

3.3.3 GDF-15-abhängige NK-Zellrezeptormodulation

3.3.3.1 Aktivierende Rezeptoren

Immuneffektorzellen treffen auf Tumorzellen und interagieren mit Oberflächenmolekülen, die von diesen exprimiert werden. Um adäquat auf veränderte bzw. normale Körperzellen reagieren zu können, tragen sie eine Reihe aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Zu den aktivierenden Rezeptoren und Co-Rezeptoren von NK-Zellen, die nach Liganden-Interaktion auf der Zielzelle zu einer Aktivierung der lytischen Funktionen der entsprechenden Effektorzelle führen, zählen die „*natural cytotoxicity receptors*“ (NCR), NKG2C, NKG2D, einige der „*killer cell immunoglobulin-like receptors*“ (KIR), DNAM-1 sowie CD16 (s.a. Abschnitt 1.2.4.2, Tab. 5: Auswahl der wichtigsten aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren). Analog zu den aktivierenden Rezeptoren kommt es zur Hemmung der Zellen, wenn nach Stimulation eines inhibierenden Rezeptors hemmende Signale übermittelt werden, was zur Ignoranz der Zielzelle führt. Zu diesen Rezeptoren gehören die meisten KIR, CD305 und NKG2A. CD94 nimmt eine Sonderstellung ein, da er keine eigene intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne besitzt. Als Heterodimer zusammen mit NKG2A wirkt CD94 inhibierend, in Assoziation mit NKG2C jedoch aktivierend (Moretta et al., 2001).

Viele dieser Rezeptoren werden nicht nur von NK-Zellen exprimiert, sondern finden sich auch auf NKT-Zellen und zum Teil auf zytotoxischen T-Zellen. Aufgrund der Vielzahl der zum Teil redundanten Rezeptoren auf der NK-Zelle ist die Aktivierungsregulation komplex. Abhängig davon, welche Rezeptoren Signale übermitteln und wie stark bzw. andauernd diese sind, kommt es zur Aktivierung oder Inhibition der NK-Zelle.

3.3.3.1.1 NKG2D

NKG2D ist einer der wichtigsten aktivierenden NK-Rezeptoren und ein wichtiger co-stimulatorischer Rezeptor für CD8⁺-T-Zellen. Er nimmt eine Hauptfunktion bei der NK-Zell-vermittelten Lyse von Tumorzellen ein, indem er durch Bindung an seine Liganden die Lyse gegen die Tumorzelle einleitet (Jamieson et al., 2002). NKG2D ist ein Lektin-ähnlicher Rezeptor vom Typ C II und gehört der NKG2-Rezeptorfamilie an. Mit Hilfe des Adaptormoleküls DAP10 werden Signale in die Zelle vermittelt (Zhang et al., 2005). NKG2D ist konstitutiv auf allen NK-, NKT-, $\gamma\delta$ -T- und CD8⁺-T-Zellen exprimiert, jedoch nur auf wenigen CD4⁺-T-Zellen (Dai et al., 2009) (Abb. 54: NKG2D-Expression auf Immuneffektorzellen). Spenderabhängig schwankt die Expression von NKG2D auf den Immuneffektorzellen, die höchste Expression zeigten NK- und NKT-Zellen.

Die Liganden von NKG2D sind beim Menschen die MHC-ähnlichen Moleküle MIC-A und -B, sowie die „UL-16 binding proteins“ (ULBP) 1-4 (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001). NKG2D-Liganden sind nur im Darmepithel konstitutiv exprimiert und werden ansonsten durch zellulären Stress wie virale Infektion oder onkogene Transformation induziert (Groh et al., 1996; Groh et al., 2001).

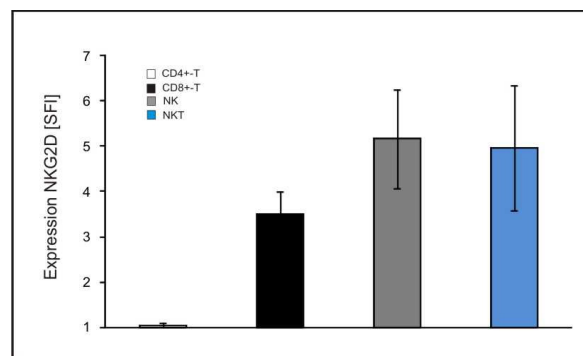


Abb. 54: NKG2D-Expression auf Immuneffektorzellen. PBL wurden von gesunden Spendern isoliert, mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8 und CD56 zur Unterscheidung der Subzellpopulationen sowie mit Isotyp- und NKG2D-Antikörper (Miltenyi) gefärbt und die Expression von NKG2D entsprechend der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt (Darstellung als SFI, n=20).

In Abschnitt 3.2.2.4.2 konnte gezeigt werden, dass OvCA-Zellen NKG2D-Liganden exprimieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass autokrines GDF-15 einen regulierenden Einfluss auf das Ausmaß der NKG2D-Liganden-Expression in OvCA-Zellen hatte: GDF-15-defiziente OvCA-Zelllinien zeigten eine höhere NKG2D-L-Expression als Kontrollzellen (Abschnitt 3.2.2.4.2). Die Blockade von NKG2D auf NK-Zellen während der Lyse deutete auch auf einen Zusammenhang zwischen GDF-15 und dem NKG2D-Signalweg hin. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob und welchen Einfluss parakrines GDF-15 auf die Expression von NKG2D auf Immuneffektorzellen hat. Dazu wurden PBL wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben aus gesunden Spendern isoliert, mit rekombinantem GDF-15 bzw. TGF- β 1 als Positivkontrolle 48 h lang behandelt und für die durchflusszytometrische Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen NKG2D, unspezifischem Isotypantikörper sowie Antikörper gegen die entsprechenden CD-Marker (CD3, CD8, CD56) zur Diskriminierung der Immuneffektorzellen gefärbt.

NK-Zellen, die mit rhGDF-15 behandelt wurden, zeigten eine signifikant verringerte NKG2D-Expression gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 55: NKG2D-Regulation durch GDF-15 auf NK-Zellen).

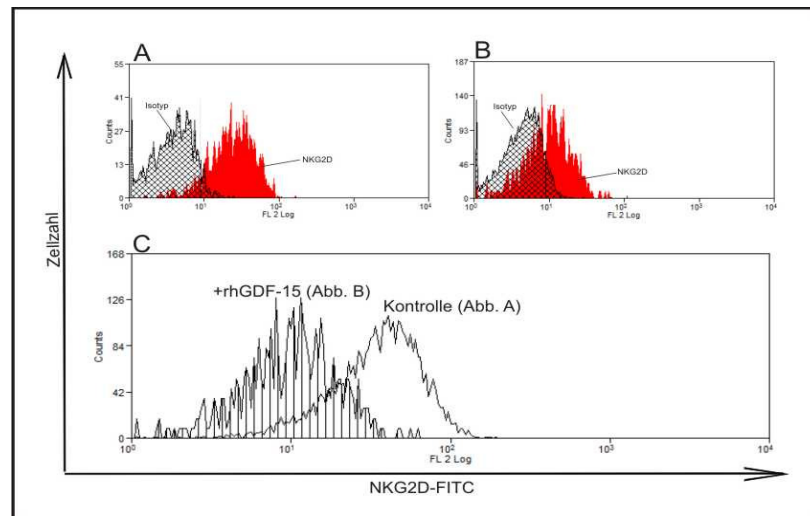


Abb. 55: NKG2D-Regulation durch GDF-15 auf NK-Zellen. PBL von gesunden Spendern wurden mit rhGDF-15 (200 ng/ml) 48 h lang inkubiert und anschließend die Expression von NKG2D auf der NK-Zellsubpopulation durchflusszytometrisch untersucht. NKG2D-Expression der unbehandelten (A) bzw. GDF-15-behandelten NK-Zellen (B) bzgl. unspezifischer Isotypkontrolle, Overlay der NKG2D-Expression von Kontrolle gegenüber GDF-15-behandelten NK-Zellen aus (A) und (B) (C).

TGF- β 1- und GDF-15-behandelte NK-Zellen regulierten beide NKG2D signifikant herunter, TGF- β 1-vermittelte Herunterregulation von NKG2D war jedoch stärker (Abb. 56: NKG2D-Expressionsregulation durch rhGDF-15 und rhTGF- β 1 auf verschiedenen Immunzellpopulationen, A, D, E). Zudem war rhTGF- β 1 mit 5 ng/ml bereits in einer bis zu 40fach geringeren Konzentration als rhGDF-15 wirksam (Wirkspektrum abhängig von Charge und Hersteller: 5 - 200 ng/ml, siehe auch Abschnitt 2.1.11). *In vitro* war rhTGF- β 1 somit ein potenterer NKG2D-Modulator als rhGDF-15.

NKG2D wird neben NK-Zellen auf weiteren Immuneffektorzellen als Co-Rezeptor exprimiert. Daher wurde die NKG2D-Regulation durch GDF-15 auch auf CD8⁺-T- und NKT-Zellen untersucht. Wie bei NK-Zellen bewirkte die GDF-15-Behandlung eine signifikante Herunterregulation von NKG2D sowohl bei CD8⁺-T- als auch bei NKT-Zellen (Abb. 56: NKG2D-Expressionsregulation durch rhGDF-15 und rhTGF- β 1 auf verschiedenen Immunzellpopulationen, B, C).

Da TGF- β 1 bei einer weit geringeren Dosis biologisch aktiv war als GDF-15, wurde für GDF-15 die NKG2D-Regulation konzentrations- und zeitabhängig untersucht. Tatsächlich erfolgte die GDF-15-vermittelte NKG2D-Herunterregulation auf NK-Zellen konzentrationsabhängig. Die höchste Konzentration von GDF-15 mit 200 ng/ml war am effektivsten. Eine zeitabhängige Regulation der NKG2D-Herunterregulation auf NK-Zellen über 72 h wurde bei keinem der beiden Zytokine beobachtet (Abb. 56: NKG2D-Expressionsregulation durch rhGDF-15 und rhTGF- β 1 auf verschiedenen Immunzellpopulationen, D, E).

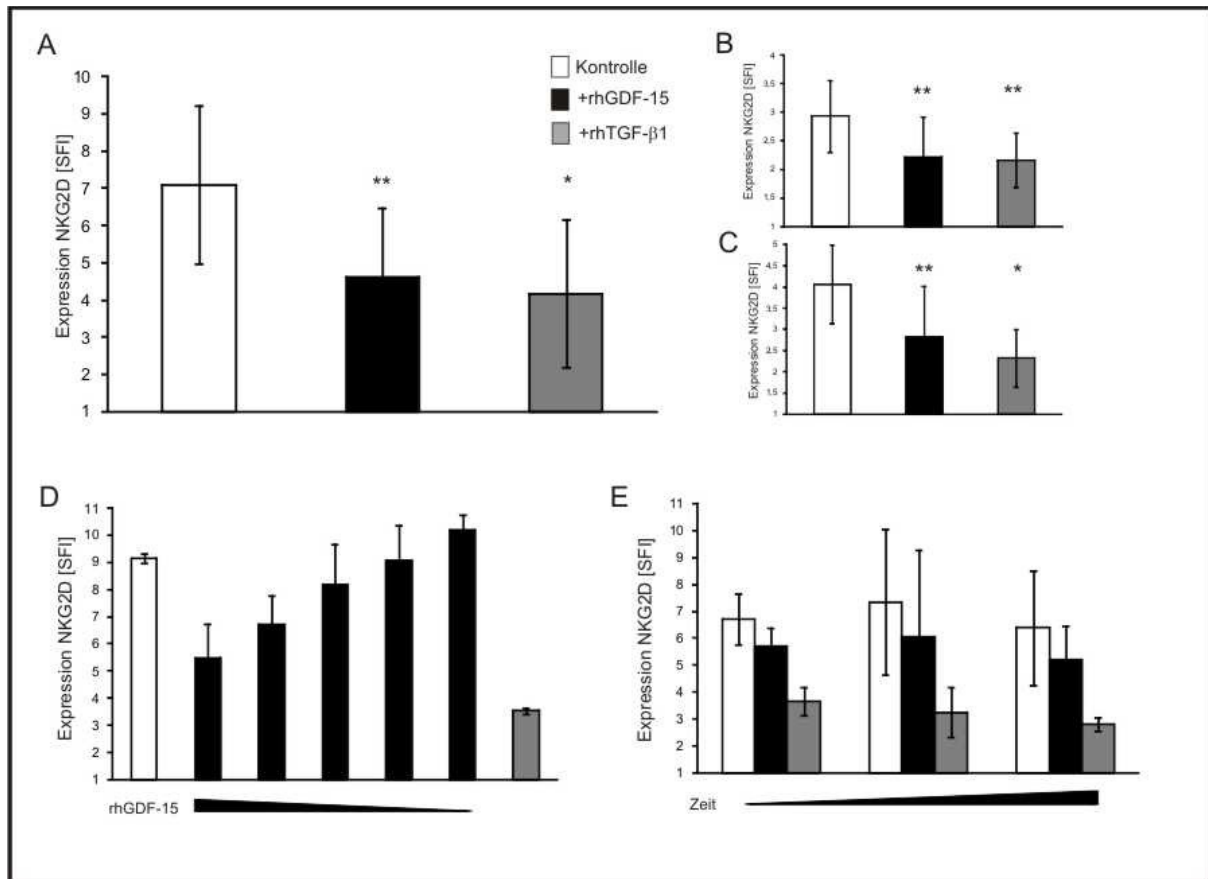


Abb. 56: NKG2D-Expressionsregulation durch rhGDF-15 und rhTGF-β1 auf verschiedenen Immunzellpopulationen. PBL wurden wie in Abb. 55 beschrieben behandelt. Immunzellsubpopulationen wurden entsprechend ihrer CD-Marker durchflusszytometrisch unterschieden und ihre NKG2D-Expression untersucht. NKG2D-Expression nach Behandlung mit rhGDF-15 (200 ng/ml) und rhTGF-β1 (5 ng/ml) auf NK-Zellen (n=9) (A), auf CD8⁺-T-Zellen (n=5) (B) und auf NKT-Zellen (n=4) (C). NKG2D-Expression auf NK-Zellen nach Behandlung mit abnehmenden rhGDF-15 Konzentrationen (200, 50, 12,5, 3,2, 0,8 ng/ml) (n=2) (D) und nach 24 h, 48 h und 72 h Vorbehandlung mit rhGDF-15 (200 ng/ml) und rhTGF-β1 (5 ng/ml) (n=2) (E) (Darstellung als SFI, *p<0,05, **p<0,01, t-test, Excel).

3.3.3.1.2 „Natural cytotoxicity receptors“

„Natural cytotoxicity receptors“ (NCR oder auch NKp genannt) werden ausschließlich von NK-Zellen exprimiert. Entsprechend ihres Molekulargewichts lassen sich vier verschiedene NKp unterscheiden: NKp30 mit 30 kDa, NKp44 mit 44 kDa, NKp46 mit 46 kDa und NKp80 mit 80 kDa. Strukturell gesehen ist diese Rezeptorklasse heterogen: NKp30, 44 und 46 sind Typ-I-Glykoproteine, die zur Ig-Familie gehören und mit CD3ζ (NKp30, 46) bzw. DAP12 (NKp44) assoziiert sind, während NKp80 (und auch NKG2D) dimere Typ-II-Glykoproteine aus der C-Lektin-Rezeptorfamilie sind (Moretta et al., 2001). Die Liganden von NKp44 und NKp46 sind bislang nicht bekannt, für NKp80 wurde der myeloidspezifische Ligand AICL (Welte et al., 2006) und für NKp30 der lösliche Ligand Bat-3 (Pogge von Strandmann et al., 2007) beschrieben. Castriconi et al. berichteten 2003, dass TGF-β neben NKG2D auch NKp30 herunterregulieren kann (Castriconi et al., 2003). Von weiteren NKp-regulierenden Faktoren ist bislang

nichts bekannt. Ob exogenes GDF-15 einen Einfluss auf die Expression der NKp auf NK-Zellen hat, sollte hier untersucht werden.

PBL bzw. NK-Zellen wurden aus gesunden Spendern isoliert und 48 h lang mit 50 ng/ml rhGDF-15 behandelt. Anschließend wurden die Zellen gegen CD3 und CD56 gefärbt und die Expression von NKp30, 44, 46 und 80 als „*specific fluorescence intensity*“ anhand des Medians der Fluoreszenzintensität auf NK-Zellen bestimmt.

NKp46 war sehr stark exprimiert, NKp44, welches *in vivo* nur auf aktivierten NK zu finden ist, war kaum exprimiert und NKp30 bzw. NKp46 waren mittelstark exprimiert. Die Behandlung mit rhGDF-15 bewirkte eine minimale, aber nicht signifikante Herunterregulation der NKp gegenüber der Kontrolle (Abb. 57: Expression der „*natural cytotoxicity receptors*“ (NKp) auf NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss).

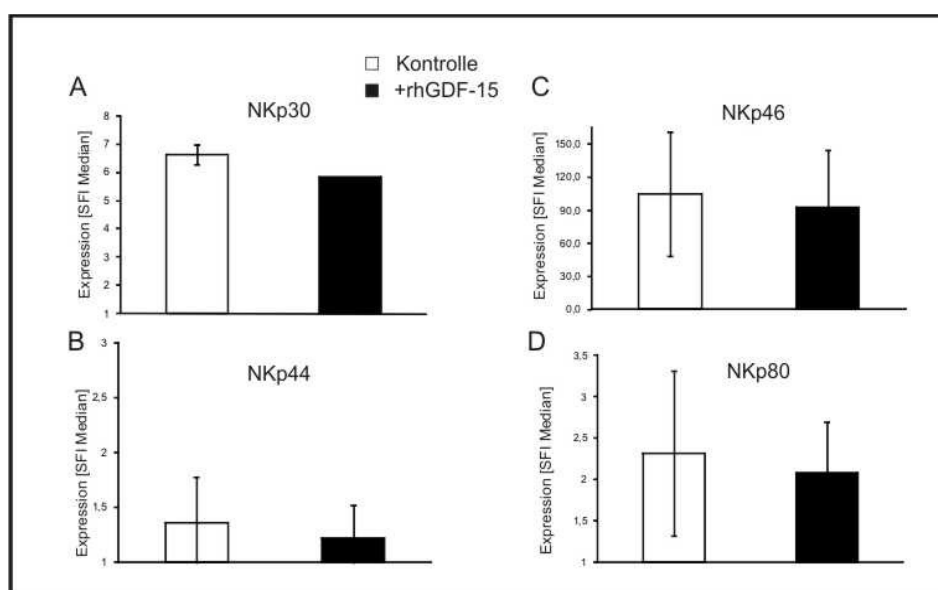


Abb. 57: Expression der „*natural cytotoxicity receptors*“ (NKp) auf NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss. PBL wurden 48 h lang mit 50 ng/ml rhGDF-15 behandelt. In der Durchflusszytometrie wurde die NK-Zellpopulation anhand der CD3⁺CD56⁺-Färbung bestimmt und die Expression der NKp-Rezeptoren als SFI ermittelt. Expression von NKp30 (A), NKp44 (B), NKp46 (C) und NKp80 (D) mit und ohne rhGDF-15-Behandlung (Mittelwert der SFI-Expressionen aus $n \geq 3$).

3.3.3.1.3 DNAM-1

Zellen brauchen zur Einwanderung ins (Tumor-)Gewebe und für eine direkte Wechselwirkung mit anderen Zellen Adhäsionsmoleküle. Diese können nach Bindung ihres Liganden aktivierende Signale ins Zellinnere weiterleiten und die entsprechende Immuneffektorzelle dadurch aktivieren. „*DNAX (DNA polymerase III/DNA elongation factor III, τ and γ subunits) accessory molecule 1*“ (DNAM-1, auch bekannt als CD226) ist ein Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie und ist auf NK-, CD8⁺-T-, CD4⁺-T-Zellen und Monozyten exprimiert. DNAM-1-Liganden sind Poliovirusrezeptor 2/ CD155 und CD112/ Nectin-2, die auf Epithel-, Endothel-, und antigenpräsentierenden Zellen exprimiert sind. DNAM-1 vermittelt *in vitro* die Aktivierung von NK-Zellen gegen CD155- und CD112-

exprimierende Tumorzellen (Bottino et al., 2003; El-Sherbiny et al., 2007). Gilfillan et al zeigten, dass DNAM-1 bei der Immunüberwachung *in vivo* eine wichtige Rolle einnimmt, indem es das Spektrum an Zellen erweitert, die durch zytotoxische Immunzellen erkannt und eliminiert werden können (Gilfillan et al., 2008). In Abschnitt 3.2.2.4.3 wurde gezeigt, dass OvCA-Zellen die DNAM-1 Liganden CD155 und CD112 exprimieren. Deren Expression war jedoch nur geringfügig beeinflusst von endogener GDF-15-Expression und auch DNAM-1 selbst spielte keine Rolle bei der GDF-15-inhibierten NK-Lyse (Abschnitt 3.3.2.3). Hier sollte untersucht werden, ob GDF-15 Einfluss auf die Regulation der DNAM-1-Expression hat.

PBL wurden isoliert und mit rekombinantem GDF-15 (200 ng/ml) 48 h lang behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit spezifischen Antikörpern gegen DNAM-1, mit unspezifischen Kontrollantikörpern (Isotyp) sowie Antikörpern zur Diskriminierung der NK-Zellpopulationen (CD3, CD56) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Hinsichtlich der Gesamtexpression war DNAM-1 unbeeinflusst von GDF-15. TGF- β 1 bewirkte eine schwache, jedoch nicht signifikante Herunterregulation ($p=0,1$, t-test, Excel) (Abb. 58: Expression von DNAM-1 auf NK-Zellen unter Einfluss von GDF-15 und TGF- β 1).

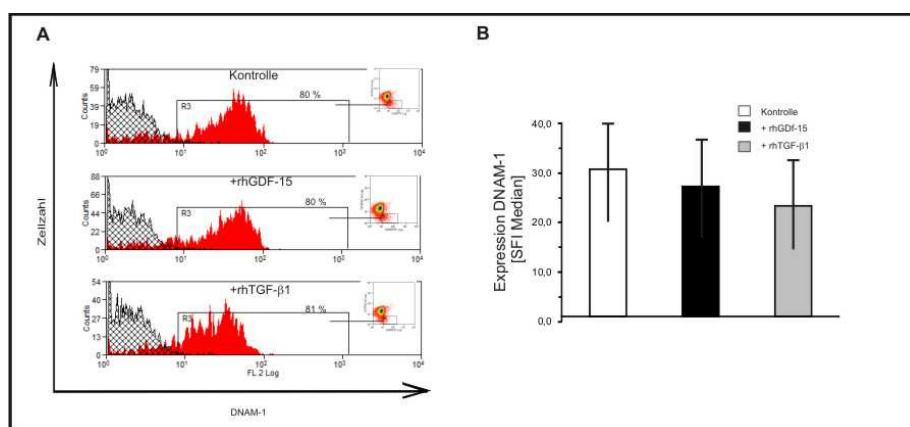


Abb. 58: Expression von DNAM-1 auf NK-Zellen unter Einfluss von GDF-15 und TGF- β 1. PBL wurden mit 200 ng/ml rhGDF-15 oder 5 ng/ml rhTGF- β 1 48 h lang behandelt. In der Durchflusszytometrie wurde die DNAM-1-Expression auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen anhand der Fluoreszenzintensität untersucht (R2 = CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen, kleines Bild) (repräsentative Analyse) (A). Die Expression von DNAM-1 als „specific fluorescence intensity“ nach Behandlung mit rhGDF-15 bzw. rhTGF- β (Darstellung SFI Median, n=4) (B).

3.3.3.1.4 CD16

CD16 ist der Fc γ -Rezeptor III, der die Immunglobuline IgG1 und IgG3 erkennt. Durch seine Assoziation mit der „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM)-haltigen γ - oder ζ -Kette kann CD16 aktivierende Signale in die NK-Zelle weiterleiten. Besonders bei der „antibody dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC) ist CD16 von Bedeutung (Ferrini et al., 1991). Veränderte Zellen, die keine spezifischen Liganden (mehr) für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren besitzen und dadurch der NK-Überwachung entgehen, können von spezifischen Immunglobulinen erkannt und gebunden

werden („Opsonisierung“). Die Bindung von CD16 an diese IgG-Moleküle löst einen zytotoxischen Angriff der NK-Zelle gegen die opsonierte Zelle aus.

Ob GDF-15 einen Einfluss auf die Expression von CD16 auf NK-Zellen hat, ist bislang ungeklärt. Daher sollte untersucht werden, ob dieser Rezeptor GDF-15-abhängig reguliert wird.

PBL wurden dazu analog wie in Abschnitt 3.3.3.1.3 beschrieben behandelt und durchflusszytometrisch analysiert.

Es wurde kein Unterschied in der CD16-Expression von GDF-15- oder TGF- β 1-behandelten NK-Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet (Abb. 59: CD16-Expression auf NK-Zellen nach GDF-15-Behandlung).

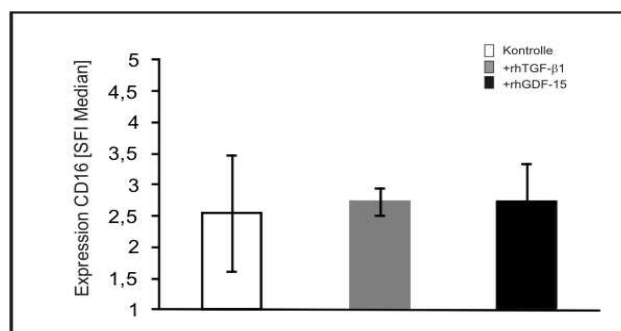


Abb. 59: CD16-Expression auf NK-Zellen nach GDF-15-Behandlung. PBL wurden mit 200 ng/ml rhGDF-15 bzw. 5 ng/ml rhTGF- β 1 48 h lang behandelt. Durchflusszytometrisch wurde auf den CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen die CD16-Expression anhand der Fluoreszenzintensität untersucht (Darstellung SFI Median, n \geq 3).

3.3.3.1.5 NKG2C

NKG2C ist wie NKG2D ein Rezeptor aus der NKG-Familie und wie dieser vermittelt NKG2C nach Interaktion mit seinem Liganden HLA-E aktivierende Signale an die NK-Zelle. Wie NKG2A ist NKG2C mit CD94 zu einem heterodimeren Rezeptorkomplex assoziiert. Es ist nicht bekannt, ob NKG2C durch ein Mitglied der TGF- β -Familie reguliert werden kann, daher sollte dies für GDF-15 und TGF- β 1 untersucht werden.

PBL bzw. NK-Zellen wurden aus gesunden Spendern isoliert und 48 h lang mit rhGDF-15 bzw. rhTGF- β 1 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörper gegen CD3, CD56, NKG2C sowie fluoreszente Zweitantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

NKG2C war auf den untersuchten NK-Zellen nicht exprimiert. Auch die Behandlung mit rhGDF-15 bzw. rhTGF- β 1 bewirkte keine Expressionsänderung (Abb. 60: Einfluss von GDF-15 auf die Expression von NKG2A und NKG2C auf NK-Zellen, B). NKG2C wird jedoch in Assoziation mit CD94 als Heterodimer exprimiert, was durch GDF-15 auf NK-Zellen induziert wurde (Abschnitt 3.3.3.3).

3.3.3.2 Inhibierende Rezeptoren

Neben aktivierenden Rezeptoren exprimieren NK-Zellen Rezeptoren, die inhibitorische Signale vermitteln und die Zellen hemmen. NK-Zellen treffen im Blut und bei der Einwanderung ins Gewebe nicht nur auf veränderte Zellen, sondern auch auf normale Körperzellen. Diese tragen Liganden, die wie die vielen, durch große Allelvariation verschiedenen HLA-Moleküle, inhibitorische Signale an die NK-Zelle vermitteln. Diese werden von den „*killer cell immunoglobulin-like receptors*“ (KIR) erkannt. Der Großteil dieser KIR vermittelt inhibitorische Signale. Auch NKG2A, ein weiterer Rezeptor aus der NKG-Familie, gehört zum inhibitorischen Rezeptorrepertoire. Das Zusammenspiel der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren und die Integration der übermittelten Signale führen letztendlich zur Reaktion der NK-Zellen gegen ihre Targetzelle (Renard et al., 1997).

3.3.3.2.1 NKG2A

NKG2A ist ein Rezeptor aus der NKG-Familie und gehört damit zur Typ-II-Transmembranrezeptorfamilie. NKG2A besitzt eine extrazelluläre C-Typ-Lektindomäne und ein intrazelluläres ITIM-Motiv. NKG2A ist auf NK- und T-Zellen exprimiert und assoziiert mit dem Rezeptor CD94, der auch mit NKG2C Komplexe bilden kann. Seine Funktion ist im Gegensatz zu NKG2C und NKG2D jedoch inhibitorischer Art: durch Assoziation mit CD94 und Signaltransduktion über ITIM werden inhibitorische Signale an die Zelle weitergeleitet, die zur Aktindestabilisation führen und damit die Zellen inhibieren (Masilamani et al., 2006). Der Ligand dieses Rezeptorkomplexes ist der gleiche wie für NKG2C/CD94, nämlich HLA-E, welches auf vielen Zellen und Geweben exprimiert ist (Wei and Orr, 1990; Wischhusen et al., 2007). Gunturi et al. berichteten, dass TGF- β 1 die Expression von NKG2A/CD94 auf murinen CD8⁺-T-Zellen, nicht jedoch auf NK-Zellen hochregulieren kann (Bertone et al., 1999; Gunturi et al., 2005).

PBL bzw. NK-Zellen wurden aus gesunden Spendern isoliert und 48 h lang mit rhGDF-15 bzw. rhTGF- β 1 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD56, NKG2A und mit fluoreszentelem Zweitantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

NKG2A war auf NK-Zellen exprimiert, jedoch war seine Expression durch GDF-15 gegenüber der Kontrolle unverändert. Auch die Behandlung mit rhTGF- β 1 bewirkte keine Expressionsänderung (Abb. 60: Einfluss von GDF-15 auf die Expression von NKG2A und NKG2C auf NK-Zellen, A), was im Gegensatz zu den Beobachtungen von Bertone steht (Bertone et al., 1999). Allerdings wird NKG2A nicht alleine, sondern als Heterodimer mit CD94 exprimiert und GDF-15 bewirkte eine schwache, aber signifikante Induktion der CD94-Expression auf NK-Zellen (Abschnitt 3.3.3.3).

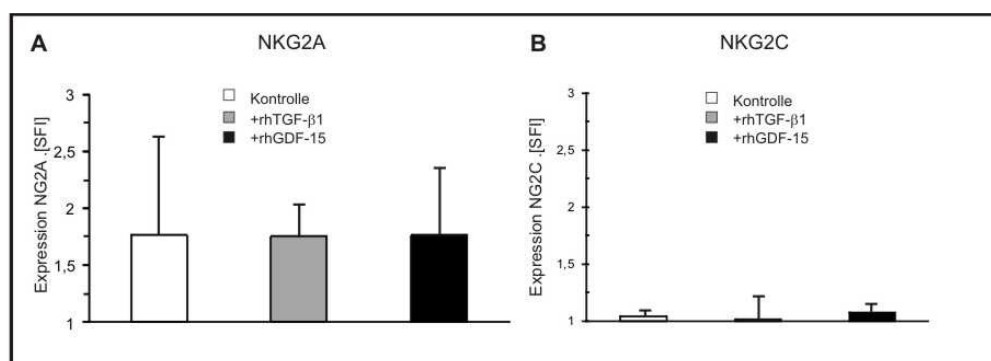


Abb. 60: Einfluss von GDF-15 auf die Expression von NKG2A und NKG2C auf NK-Zellen. PBL wurden mit 50 ng/ml rhGDF-15 bzw. 5 ng/ml rhTGF-β1 48 h lang inkubiert. In der Durchflusszytometrie wurde die Expression von NKG2A (A) und NKG2C (B) auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen untersucht und der SFI ermittelt (n=3).

3.3.3.2.2 „Killer cell immunoglobulin-like receptors“

NK-Zellen tragen „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIR) auf ihrer Zelloberfläche (Tab. 35: KIR-Rezeptoren, ihre Liganden und Antikörper). Diese molekular sehr ähnlichen Rezeptoren binden an HLA-I-Antigene, die auf allen kernhaltigen Körperzellen vorkommen. Die KIR-Rezeptorfamilie ist sehr polymorph; es gibt Mitglieder, die inhibitorische und andere, die aktivierende Signale vermitteln.

Tab. 33: KIR-Rezeptoren, ihre Liganden und Antikörper (adaptiert nach Gardiner et al., 2007).

KIR	Art des Signals	Ligand	Verwendete Antikörper
2DL1	inhibitorisch	HLA-C2	Anti-CD158a/h, Anti-KIR2D, Anti-panKIR
2DL2/3	inhibitorisch	HLA-C1	Anti-CD158b, Anti-KIR2D, Anti-panKIR
2DL4	aktivierend	HLA-G	Anti-KIR2D
2DL5	inhibitorisch	?	Anti-KIR2D
3DL1	inhibitorisch	HLA-Bw4	Anti-CD158e
3DL2	inhibitorisch	HLA-A3, A11	-
2DS1	aktivierend	HLA-C2	Anti-CD158a/h, Anti-KIR2D, Anti-panKIR
2DS2	aktivierend	HLA-C1	Anti-KIR2D, Anti-panKIR
2DS3	aktivierend	?	Anti-KIR2D
2DS4	aktivierend	?	Anti-CD158i, Anti-KIR2D, Anti-panKIR
2DS5	aktivierend	?	Anti-KIR2D
3DS1	aktivierend	HLA-Bw4?	
3DL3	?	?	
2DP1, 3DP1	Pseudogene, nicht exprimiert		

Die Aufgabe von KIR ist es, Änderungen in der Expression von HLA-I zu überwachen und entsprechende Signale zu vermitteln. Insgesamt gibt es 16 verschiedene Gene für alle KIR, wobei jeder Mensch ein unterschiedliches Expressionsmuster dieser KIR aufweist und nicht jeden einzelnen

davon exprimiert (Gardiner, 2008). Virale und onkogene Transformation kann zur Änderung der HLA-Expression führen, was KIR eine besonders wichtige Rolle bei der Erkennung solcher Veränderungen zukommen lässt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob GDF-15 Einfluss auf die Expression von KIR-Rezeptoren im Allgemeinen und auf einige ausgewählte KIR im Besonderen hat. Dazu wurde die Expression der KIR-Rezeptoren durchflusszytometrisch auf NK-Zellen mit und ohne GDF-15-Vorbehandlung bestimmt. PBL wurden 48 h lang mit 200 ng/ml rhGDF-15 inkubiert, anschließend mit Antikörper gegen CD3, CD56, KIR (panKIR, KIR2D, CD158a/h, e, i) und mit unspezifischem Isotypantikörper zur Kontrolle gefärbt. Die Expression von KIR wurde auf der CD3⁺CD56⁺-NK-Zellpopulation untersucht und als „*specific fluorescence intensity*“ dargestellt.

Die Expression von KIR allgemein war nach GDF-15-Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht verändert. TGF- β 1-behandelte NK-Zellen zeigten dagegen die Tendenz, KIR zu induzieren (Abb. 61: Einfluss von GDF-15 auf die Expression von KIR auf NK-Zellen).

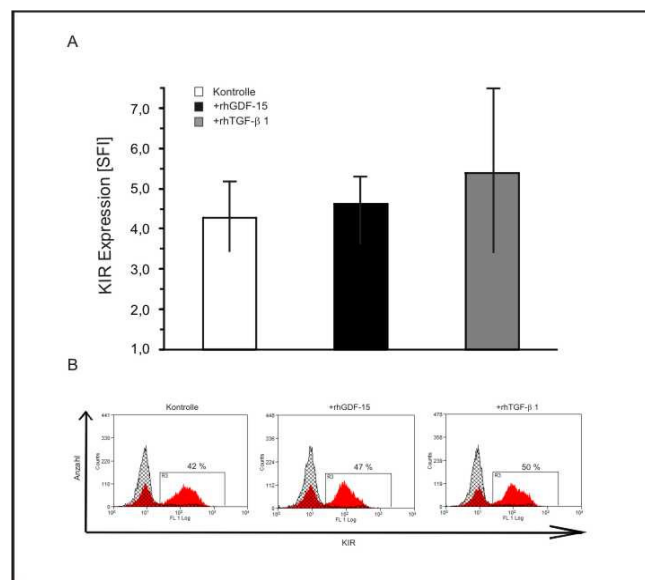


Abb. 61: Einfluss von GDF-15 auf die Expression von KIR auf NK-Zellen. In der Durchflusszytometrie wurde die Expression von (pan)KIR auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen nach 48 h Behandlung mit rhGDF-15 (200 ng/ml) bzw. rhTGF- β 1 (5 ng/ml) untersucht. Die Expression wurde als „*specific fluorescence intensity*“ dargestellt (**A**) (n=3) bzw. als Anteil positiver NK-Zellen in % (**B**) (repräsentatives Beispiel) (n=3).

Der Einfluss von GDF-15 auf die Expression von KIR wurde durch die Untersuchung der einzelnen KIR-Rezeptoren CD158a/h, e und i genauer aufgeschlüsselt. Als Vergleich wurde die Expression von KIR2D untersucht. KIR2D umfasst alle KIR-Rezeptoren mit zwei Ig-Domänen. Zu diesen gehören sowohl inhibitorische als auch aktivierende KIR (Abb. 62: Einfluss von GDF-15 auf die Expression einzelner KIR-Rezeptoren).

Generell konnte hier kein Einfluss von GDF-15 auf die Expression der untersuchten KIR festgestellt werden. Es wurde auch kein Unterschied zwischen inhibitorischen KIR (CD158a/h und e) und aktivierenden KIR (CD158a/h und i) beobachtet. Auch die Gruppe der KIR2D-Rezeptoren wurde durch

GDF-15 nicht reguliert. Die großen Standardabweichungen ergaben sich aus dem unterschiedlichen KIR-Expressionsmuster der Donoren.

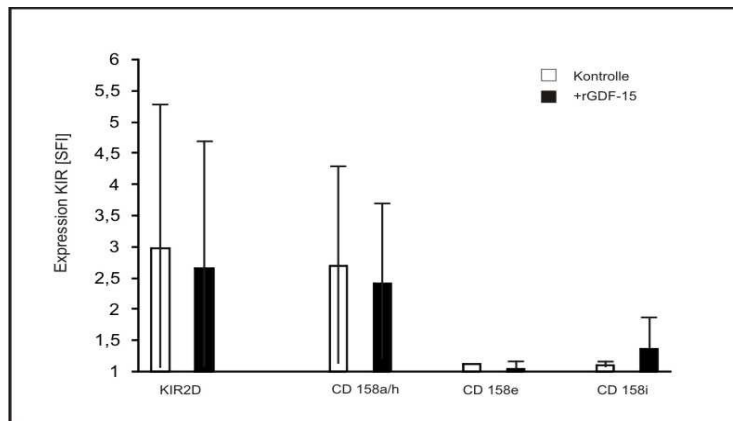


Abb. 62: Einfluss von GDF-15 auf die Expression einzelner KIR-Rezeptoren. In der Durchflusszytometrie wurde die Expression von KIR2D, CD158a/h, e und i auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen nach 48 h Behandlung mit rhGDF-15 (200 ng/ml) untersucht. Die Expression wurde als „specific fluorescence intensity“ dargestellt (n=3).

3.3.3.2.3 CD305

CD305, auch bekannt als „leukocyte-associated Ig-like receptor-1“ (LAIR-1), ist ein inhibierender Rezeptor mit „immunoglobulin-like tyrosine-based inhibitory motif“ (ITIM), der auf vielen Immunzellen, darunter auch NK- und T-Zellen, zu finden ist. Die Funktion von CD305 wurde zunächst für NK-Zellen beschrieben, wo es die Zytotoxizität inhibierte. CD305 vermittelt über seinen Liganden Kollagen die Bindung an die extrazelluläre Matrix (ECM) und erleichtert damit die Einwanderung ins Gewebe. Gleichzeitig vermittelt diese Interaktion inhibitorische Signale an die einwandernde Zelle, wodurch die Immunantwort reguliert wird (Meyaard, 2008).

PBL wurden mit rekombinantem GDF-15 (200 ng/ml) 48 h lang behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern gegen CD305, mit Kontrollantikörpern sowie Antikörpern zur Diskriminierung der NK-Zellpopulationen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Analog zu CD94 wurde auch CD305 nach Behandlung von NK-Zellen mit rhGDF-15 nur äußerst schwach, aber dennoch statistisch signifikant induziert (Abb. 63: CD305-Expression auf NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss). Ob sich dieser geringe Expressionsunterschied funktionell auswirkt, bleibt zu klären.

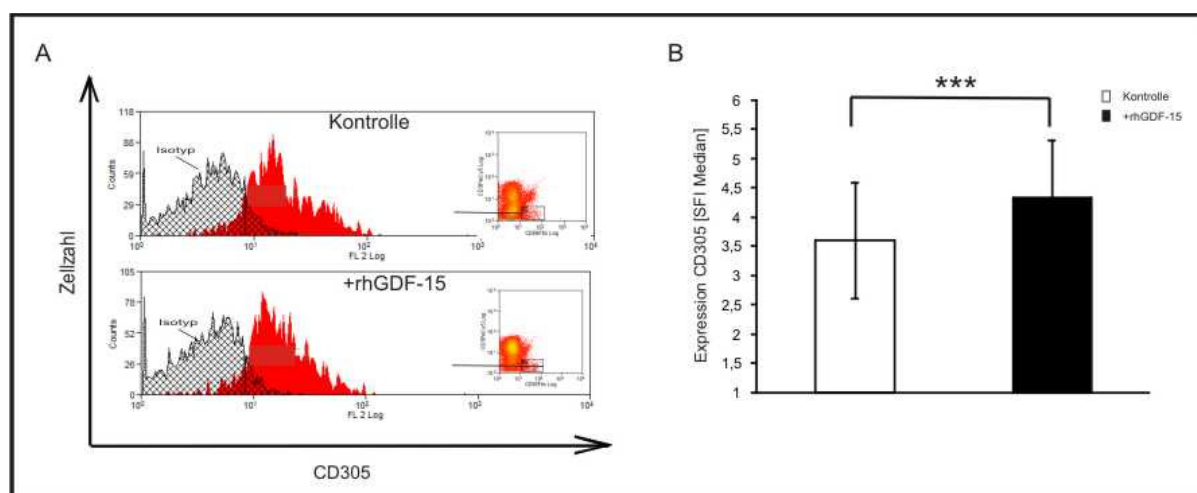


Abb. 63: CD305-Expression auf NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss. PBL von gesunden Spendern wurden 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) behandelt und die Expression von CD305 auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen durchflusszytometrisch vergleichend zu unbehandelten Kontrollzellen untersucht. Expression von CD305 auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen (kleines Bild) (A) (repräsentatives Beispiel). Expression von CD305 als SFI der Median-Fluoreszenz von unbehandelten und GDF-15-behandelten NK-Zellen (B) (n=3, ***p<0,001, t-test, Excel).

3.3.3.2.4 NKG2A- und NKG2C-assoziiierter Rezeptor CD94

CD94 ist ein Rezeptor, der ebenfalls auf NK- und T-Zellen zu finden ist. Da ihm eine zytoplasmatische Signaldomäne fehlt, kann er selbst keine Aktivierungssignale übermitteln. CD94 assoziiert als Heterodimer mit NKG2A, NKG2C und NKG2E. Damit kann CD94 sowohl inhibitorische, in Assoziation mit NKG2A, als auch aktivierende Funktionen, in Assoziation mit NKG2C und -E, ausüben. Der Ligand von CD94 ist, wie bei seinen Assoziationspartnern, HLA-E (Borrego et al., 2005). GDF-15 beeinflusst die Expression der Assoziationspartner von CD94 NKG2A und -C nicht (Abschnitt 3.3.3.1.5 und 3.3.3.2.1).

PBL wurden wie in Abschnitt 3.3.3.2 beschrieben behandelt, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert

Wie bei CD305 bewirkte GDF-15 eine geringfügige, aber signifikante Induktion der CD94-Expression auf NK-Zellen (von SFI=1,6 auf SFI=2,2, t-test, Excel) (Abb. 64: CD94-Expression auf NK-Zellen nach GDF-15-Behandlung).

Inwieweit diese geringfügige Regulation von CD94 einen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors hat, ist unklar. Dazu kommt, dass CD94 sowohl mit einem inhibierenden (NKG2A) als auch mit einem aktivierenden (NKG2C) Rezeptor assoziieren kann. Dadurch ist diese Hochregulation differenziert und in Zusammenhang mit dem jeweiligen Rezeptor zu betrachten.

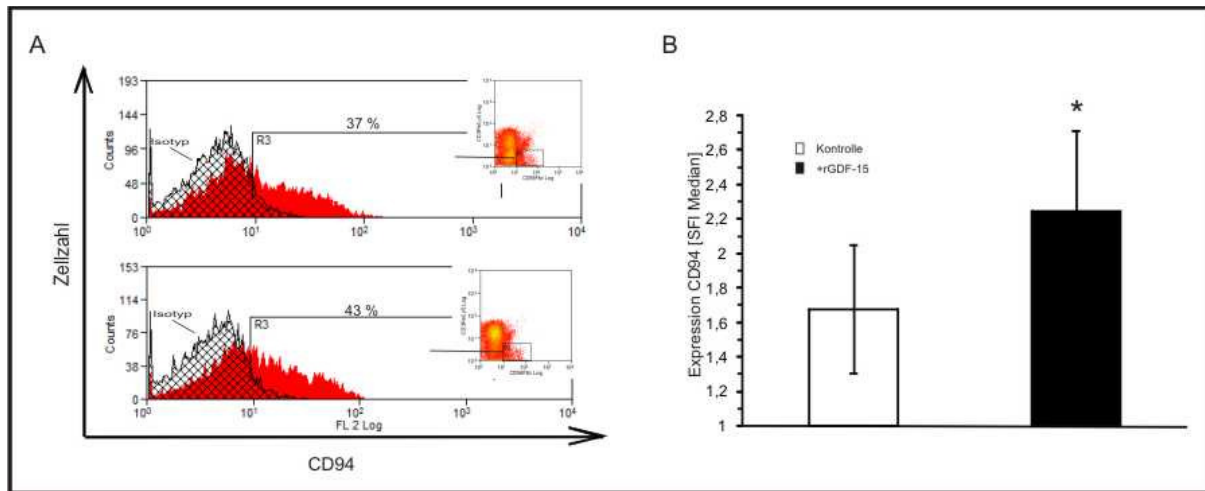


Abb. 64: CD94-Expression auf NK-Zellen nach GDF-15-Behandlung. PBL von gesunden Spendern wurden wie in Abb. 63 beschrieben behandelt und die Expression von CD94 auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen (A) (repräsentatives Beispiel) und als SFI der Median-Fluoreszenz (B) (n=3, *p<0,05, t-test, Excel) untersucht.

3.3.4 Einfluss von GDF-15 auf die Lysefunktionalität von NK-Zellen

In Abschnitt 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass GDF-15 die Lyseaktivität von NK-Zellen inhibiert. Auf welche Weise GDF-15 Einfluss auf die Aktivierung der NK-Zellen nimmt, wurde im Abschnitt 3.3.3 untersucht. Neben der Modulation von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren kann auch die Menge und Zusammensetzung der lytischen Granula und die Granulafreisetzung selbst durch äußere Faktoren reguliert werden. Es sollte daher untersucht werden, ob und wie GDF-15 in den mechanistischen Ablauf der NK-Lyseaktivität eingreift.

Dazu sollte zunächst der Aktivierungsstatus anhand der Expression von spezifischen Aktivierungsmarkern, die Expression des Granulainhalts sowie die Freisetzung der lytischen Granula unter Einfluss von GDF-15 untersucht werden.

3.3.4.1 Aktivierungsstatus von NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss

Immunzellen exprimieren spezifische Marker an der Zelloberfläche, die ihren Aktivierungsstatus charakterisieren. CD69 ist ein Rezeptor, der nach Aktivierung auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen an der Oberfläche hochreguliert wird. Auf ruhenden Immunzellen wurde CD69 nicht detektiert. Seine Funktion ist bislang noch unklar, eine co-aktivierende Eigenschaft wurde *in vitro* nachgewiesen, während *in vivo* eine modulatorische Rolle diskutiert wird (Sancho et al., 2005). CD25 ist die Alphakette des IL-2-Rezeptors (IL-2Ra) und ist exprimiert auf aktivierten T-, B- und NK-Zellen sowie auf T_{reg} und DC. Während CD69 auf einer großen Anzahl von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) exprimiert wird, ist die Expression von CD25 auf eine geringe Anzahl von TIL

beschränkt und korreliert gut mit dem anti-tumorigenen Potenzial und dem Aktivierungsstatus von T-Zellen (Ladanyi et al., 2004).

Um den Einfluss von GDF-15 auf den Aktivierungszustand zu untersuchen, wurden PBL 48 h lang mit 200 ng/ml rhGDF-15 bzw. 5 ng/ml rhTGF- β 1 behandelt und die Expression von CD25 bzw. CD69 auf CD3⁻CD56⁺-NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Die Expression von CD69 und CD25 wurde weder durch TGF- β 1 noch durch GDF-15 verändert (Abb. 65: Expression von CD25 und CD69 auf NK-Zellen unter Einfluss von GDF-15 und TGF- β 1), beide Zytokine führen, wie erwartet, nicht zur Aktivierung von NK-Zellen.

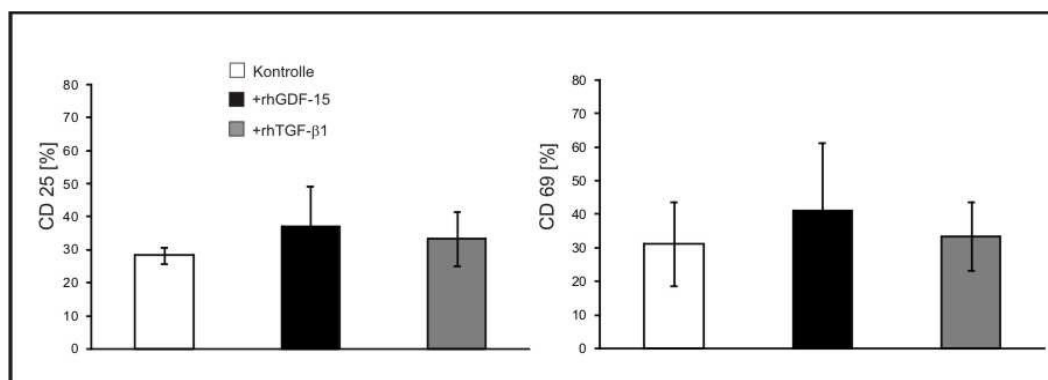


Abb. 65: Expression von CD25 und CD69 auf NK-Zellen unter Einfluss von GDF-15 und TGF- β 1. PBL von gesunden Spendern wurden 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) bzw. TGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt und die Expression von CD25 (A) und CD69 (B) auf CD3⁻CD56⁺-NK-Zellen durchflusszytometrisch vergleichend zu unbehandelten Kontrollzellen untersucht (n \geq 3).

3.3.4.2 Expression und Freisetzung lytischer Granula unter GDF-15-Einfluss

3.3.4.2.1 Expression des lytischen Granulainhalts

Immuneffektorzellen können durch die Freisetzung ihrer zytotoxischen Granula in der betroffenen Zielzelle Apoptose induzieren. Der Inhalt der Granula besteht aus Perforin, Granzymen und Granulysin. Der genaue Mechanismus, wie die Zielzelle die Granula aufnimmt und Apoptose induziert wird, ist viel diskutiert.

Die älteste und am weitesten verbreitete Hypothese zum Perforinwirkmechanismus geht davon aus, dass Perforin in Anwesenheit von Ca²⁺ zu zylindrischen Poren polymerisiert, welche Ionenaustausch erlauben. Dies führt zum osmotischen Ungleichgewicht und letztendlich zum Zelltod (Liu et al., 1995a; Liu et al., 1995b). Ebenso kommt es zum passiven Influx von Granzymen und Granulysin in die Zelle, was die Apoptosekaskade auslöst.

Eine andere Hypothese besagt, dass Granzym B unabhängig von Perforin und Ca²⁺ über den Mannose-6-phosphat-Rezeptor in die Zelle aufgenommen wird. In der Targetzelle bewirkt Perforin die Auflösung des Endosoms und die Freisetzung der Granzyme, die dort Apoptose auslösen können (Motyka et al., 2000).

Eine neue Hypothese zum Wirkmechanismus von Keefe et al. besagt, dass durch die Perforin-Pore Ca^{2+} in die Zelle eintritt, was diese zur Reparatur aktiviert, indem sie die beschädigte Membran endozytotisch aufnimmt. Durch elektrostatische Wechselwirkung an die Membran gebundene lytische Enzyme (Granzyme) werden so passiv ins Zytoplasma aufgenommen, wo sie lytisch aktiv werden (Keefe et al., 2005; Trapani and Sutton, 2003; Trapani et al., 2003) (Abb. 66: Mögliche Wege zur Aufnahme von lytischen Granula in die Zielzelle). Die letzten beiden Hypothesen gehen davon aus, dass Perforin für die Aufnahme der Granzyme nicht zwingend notwendig, für ihre pro-apoptotische Funktion jedoch unabdingbar ist (Chavez-Galan et al., 2009).

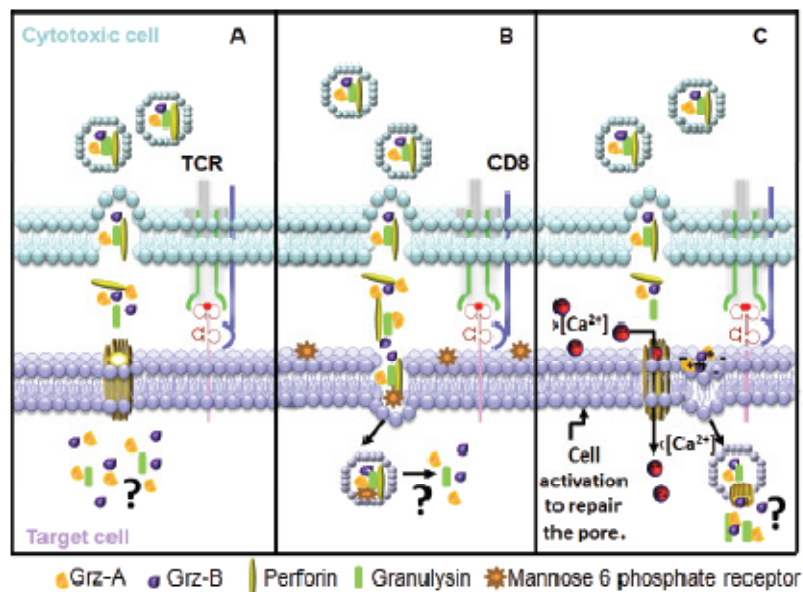


Abb. 66: Mögliche Wege zur Aufnahme von lytischen Granula in die Zielzelle. Perforin bildet eine Pore in der Zielzellmembran, durch die Ionenaustausch stattfinden kann und Granzyme in die Zelle diffundieren können (A). Granzym B bindet an den Mannose-6-phosphat-Rezeptor und wird so in die Zelle aufgenommen und mittels Perforinporenbildung intrazellulär freigesetzt (B). Ausbildung der Perforinpore führt zur Aufnahme von extrazellulärem Ca^{2+} , was die Zelle aktiviert, die Pore zu verschließen und die beschädigte Membran endozytotisch aufzunehmen. Dabei werden lytische Moleküle, die durch elektrostatische Wechselwirkung an die Membran gebunden sind, mit aufgenommen (C) (Chavez-Galan et al., 2009).

Granzyme sind Serin-Proteasen von globulärer Struktur. Granzym A aktiviert Apoptose über einen Caspase-unabhängigen Mechanismus, der Proteinhydrolyse beinhaltet (Martinvalet et al., 2005), während Granzym B (GranB) Caspase-3 entweder direkt aktiviert oder indirekt, indem es über BID-Aktivierung die Mitochondrienmembran permeabilisiert, was zum Cytochrom-C-Ausfluss führt und die Caspase-Kaskade aktiviert (Pinkoski et al., 2001; Waterhouse et al., 2006a).

PBL wurden isoliert, mit 30 U/ml IL-2 24 h lang voraktiviert (da sonst keine GranB- bzw. Perforin-Expression detektierbar wäre) und 48 h lang mit 200 ng/ml rhGDF-15 bzw. 5 ng/ml rhTGF- β 1 behandelt, um dann durchflusszytometrisch die intrazelluläre Expression von Perforin und Granzym B in der NK-Zellpopulation bestimmen zu können. Dazu wurden die PBL wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben mit entsprechenden Antikörpern gefärbt, fixiert und permeabilisiert.

GDF-15-behandelte NK-Zellen zeigten eine tendenziell, nicht jedoch signifikant erhöhte Perforinexpression gegenüber unbehandelten NK-Zellen, während TGF- β 1 keinen Einfluss hatte.

GDF-15 und TGF- β 1 bewirkten eine tendenzielle Reduktion der Granzym B-Expression, welche jedoch nicht signifikant war (GDF-15: $p=0,07$; TGF- β 1: $p=0,1$, t-test, Excel) (Abb. 69: Expression von Perforin und Granzym B in aktivierten und polyklonalen NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss, A).

In polyklonalen NK-Zellen wurde ebenfalls eine Reduktion der Granzym B-Expression in GDF-15- bzw. TGF- β 1-behandelten NK-Zellen beobachtet, welche für GDF-15, nicht aber für TGF- β 1, signifikant war ($p=0,02$ bzw. $p=0,09$, t-test, Excel) (Abb. 67: Expression von Perforin und Granzym B in aktivierten und polyklonalen NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss, B).

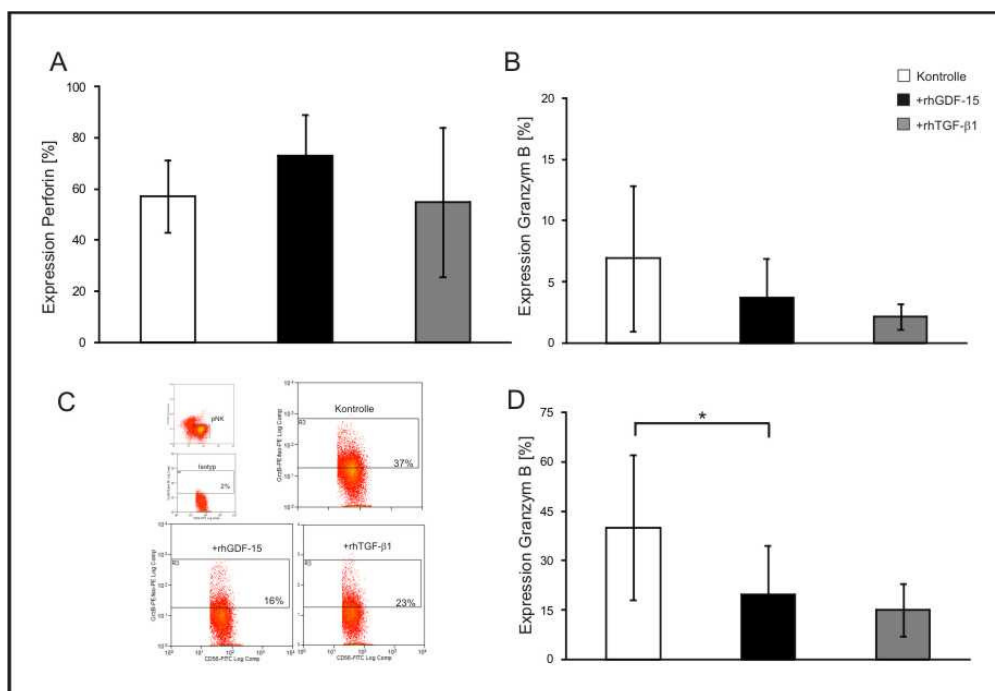


Abb. 67: Expression von Perforin und Granzym B in aktivierten und polyklonalen NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss. PBL von gesunden Spendern wurden mit IL-2 (30 U/ml) 24 h lang voraktiviert und 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) bzw. rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt. Polyklonale NK-Zellen wurden aus PBL gesunder Spender durch Co-Kultivierung mit Feederzellen über 8 Tage kultiviert und analog zu PBL mit GDF-15 und TGF- β 1 behandelt. Perforin und Granzym B wurden mittels Antikörper durchflusszytometrisch nach Fixierung und Permeabilisierung intrazellulär gefärbt und in der CD3⁺CD56⁺-NK-Zellpopulation detektiert. Perforinexpression (A) und Granzym B-Expression in aktivierten NK-Zellen (B), Granzym B-Expression in polyklonalen NK-Zellen (C, D) ($n \geq 3$, * $p=0,02$, t-test, Excel).

3.3.4.2.2 Expression von CD107a

CD107a, auch bekannt als „lysosome associated membrane protein 1“ (LAMP-1), ist in der Innenseite der Membran der Lysosomen verankert und macht zusammen mit LAMP-2 fast 50% der Lysosomenproteine aus. Seine Funktion ist noch weitgehend unbekannt, doch scheint CD107a der Membranstabilisierung im durch lytische Enzyme angereicherten Milieu zu dienen (Eskelinen, 2006).

In CD8⁺-T- und NK-Zellen wird CD107a nach Ausschüttung der lytischen Granula an der Zelloberfläche detektierbar und ist somit ein Marker für ihre Aktivierung. CD107a-Expression korreliert demnach mit der Zytotoxizität von CD8⁺-T- und NK-Zellen (Alter et al., 2004; Betts et al., 2003; Rubio et al., 2003).

In Abschnitt 3.3.4.2.1 wurde gezeigt, dass GDF-15 einen Einfluss auf die Expression des lytischen Granulainhalts hatte. Um funktional aktiv zu werden, müssen NK-Zellen ihren Granulainhalt in den synaptischen Spalt freisetzen. Erhöhte oder reduzierte Perforin- bzw. Granzymexpression muss daher nicht direkten Einfluss auf die Lyseaktivität haben, solange es nicht zu einer Freisetzung kommt. Die Freisetzung der Granula wiederum sollte in der Hochregulation von CD107a an der NK-Zelloberfläche zu beobachten sein.

PBL wurden mit 30 U/ml IL-2 bzw. 5 ng/ml PMA 24 h lang aktiviert und 48 h lang mit 200 ng/ml rhGDF-15 bzw. 5 ng/ml rhTGF- β 1 behandelt. Polyklonale NK-Zellen wurden aus PBL in Co-Kultur mit teilungsunfähigen RPMI 8866-Feederzellen und durch Aktivierung mit PMA nach 8 - 10 Tagen gewonnen und weiter analog zu den PBL behandelt. CD107a wurde nach Brefeldin- (10 μ g/ml) und Monensin- (6 μ g/ml) Behandlung wie in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben mit Antikörpern angefärbt (Alter et al., 2004; Betts et al., 2003) und in der NK-Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt.

In aktivierten NK-Zellen sowie pNK-Zellen wurde CD107a durch GDF-15 bzw. TGF- β 1 tendenziell weniger stark an der Oberfläche exprimiert als bei unbehandelten Kontrollzellen. Die Reduktion der CD107a-Expression war jedoch gegenüber unbehandelten NK-Zellen nicht signifikant (GDF-15: $p=0,19$ und TGF- β 1: $p=0,06$, t-test, Excel). Nicht voraktivierte PBL zeigten keinen Unterschied in den einzelnen Gruppen, was die Notwendigkeit einer Voraktivierung der Immunzellen für die Beobachtung möglicher Regulationsmechanismen aufzeigt (Abb. 68: CD107a-Expression auf NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss).

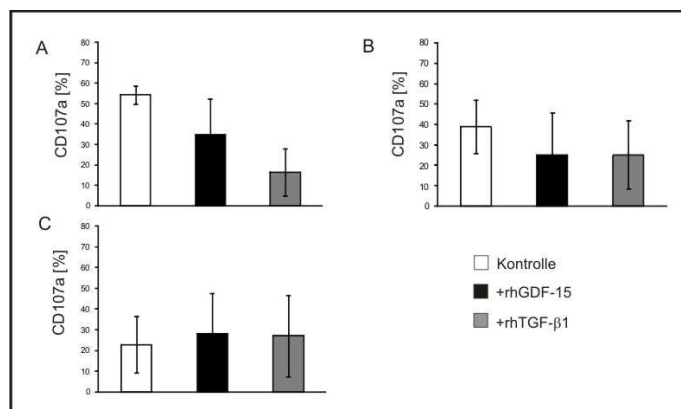


Abb. 68: CD107a-Expression auf NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss. PBL von gesunden Spendern wurden mit IL-2 (30 U/ml) bzw. pNK mit PMA (5 ng/ml) 24 h lang voraktiviert und 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) bzw. rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt. CD107a-Expression wurde nach Golgistopp durchflusszytometrisch an der Oberfläche auf CD3⁺CD56⁺-NK-Zellen bestimmt. CD107a-Expression auf IL-2-aktivierten NK-Zellen (A), PMA-aktivierten pNK-Zellen (B) und auf nicht aktivierten NK-Zellen (C) ($n \geq 3$).

Zusammengenommen zeigen die vorangegangenen Daten, dass NK-Zellen unter GDF-15-Einfluss nicht aktiviert sind und in ihrem Lysemechanismus eingeschränkt werden.

3.3.5 Einfluss von GDF-15 auf die Apoptose in Immunzellen

Apoptose ist ein genetisch programmierter Zelltod, der charakterisiert ist durch Chromatinkondensation, DNA-Fragmentation, Membran-„blebbing“ und Bildung von Apoptosevesikeln (Kerr et al., 1972). Wichtigstes Merkmal der Apoptose ist die Abwesenheit von Inflammation, was sie von der Nekrose unterscheidet. Apoptose ist ein normaler Prozess, der täglich vonstattengeht, um die Zellhomöostase zu wahren. Beispielsweise wird nach einer Expansionsphase während einer akuten Entzündung die Anzahl der antigenspezifischen Lymphozyten nach der Elimination der Entzündungsauslöser über Apoptose wieder auf das Grundniveau zurückgefahren (Lenardo et al., 1999).

Apoptose wird über zwei verschiedenen Wege eingeleitet: den intrinsischen Weg, der durch Veränderungen in der mitochondrialen Stabilität aktiviert wird und meist auf chemische oder physikalische Reize hin ausgelöst wird, und den extrinsischen Weg, der durch Interaktion von Liganden mit Todesrezeptoren initiiert wird (Debatin, 2004; Fulda and Debatin, 2006; Jin and El-Deiry, 2005).

Tumore exprimieren Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie. Ihre Aktivierung löst Apoptose in den Tumorzellen aus. Spezifische Apoptoseinduktion in Tumorzellen ist ein wichtiges Ziel der Tumortherapie (Fulda et al., 2002; Rohn et al., 2001). Andererseits können Tumore sich der Immunüberwachung entziehen, indem sie Apoptose in Todesrezeptor-tragenden Immunzellen auslösen (Bennett et al., 1998; O'Connell et al., 1997; Strand et al., 1996; Whiteside, 2002).

3.3.5.1 GDF-15-vermittelte Apoptose

Mitglieder der TGF- β -Superfamilie können sowohl anti- als auch pro-apoptotische Funktionen ausüben (Huang et al., 2000; Sanchez-Capelo, 2005; Schuster and Krieglstein, 2002; Shin et al., 2001; Valderrama-Carvajal et al., 2002). Dies korreliert stark mit dem Zelltyp und dem Zellzyklus bzw. dem Tumorstadium (Siegel and Massague, 2003). TGF- β kann beispielsweise zum Zellzyklusarrest und zur Apoptoseinduktion in der späten G1-Phase führen (Markowitz and Roberts, 1996). Die kontroversen Beobachtungen bzgl. der Apoptoseinduktion durch TGF- β -Familienmitglieder wurden auch für GDF-15 beschrieben. Von GDF-15 wurde berichtet, dass es auf verschiedene Tumore eine pro-apoptotische und damit anti-tumorigene Wirkung vermittelt (Baek et al., 2001; Baek et al., 2002; Jang et al., 2004; Kim et al., 2008a; Kim et al., 2005; Pang et al., 2007). Andererseits gibt es Beobachtungen, die GDF-15 eine anti-apoptotische bzw. pro-tumorigene Rolle zuschreiben (Appierto et al., 2007; Kim et al., 2008a; Kim et al., 2008b; Lim et al., 2007; Pang et al., 2007; Shin et al., 2008). Bisher wurde die apoptotische Eigenschaft von GDF-15 von Seiten des Tumors her analysiert. Welche Wirkung GDF-15 auf die Induktion der Apoptose in (Tumor-infiltrierenden) Immunzellen hat, ist bislang nicht bekannt.

PBL wurden 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) kultiviert. Der Anteil an toten, lebenden und apoptotischen Zellen wurde mittels Annexin-V-FITC- und 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

Immunzellen, die mit GDF-15 oder TGF- β 1 behandelt wurden, zeigten gegenüber der Kontrolle keinen Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen (Abb. 69: GDF-15- bzw. TGF- β 1-vermittelte Apoptose in Immunzellen).

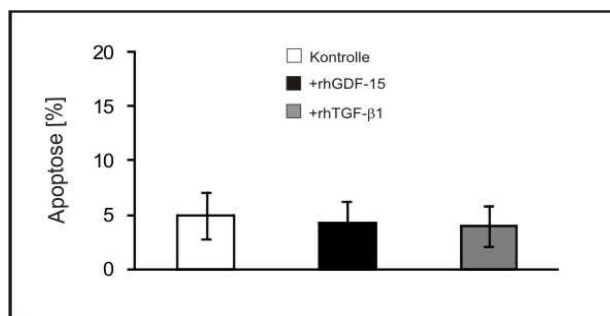


Abb. 69: GDF-15- bzw. TGF- β 1-vermittelte Apoptose in Immunzellen. PBL von gesunden Spendern wurden 48 h lang mit 200 ng/ml rhGDF-15 bzw. 5 ng/ml rhTGF- β 1 behandelt und der Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durchflusszytometrisch ermittelt (n=6).

Da GDF-15 somit selbst keine Apoptose in Immunzellen induzierte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob GDF-15 in Verbindung mit pro-apoptotischen Mediatoren (FasL, TNF, TRAIL) die Apoptoseinduktion beeinflusst.

3.3.5.2 Einfluss von GDF-15 auf induzierte Apoptose

Apoptose wird *in vivo* durch die Bindung von pro-apoptotischen Liganden an ihre Rezeptoren auf Zielzellen vermittelt. Es gibt mindestens drei Arten Liganden-induzierter Apoptose:

TRAIL („*TNF-related apoptosis-inducing ligand*“) gehört der TNF-Familie an (Wiley et al., 1995). TRAIL bindet an seine „*death receptors*“ DR4 oder DR5 und leitet dadurch die Apoptosekaskade in Zielzellen ein. TRAIL kann Apoptose in einer Vielzahl von Tumorzellen *in vitro* induzieren und übt eine wichtige Funktion bei der „*tumor immune surveillance*“ aus (Takeda et al., 2001; Takeda et al., 2002).

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das Zellaktivierung und -differenzierung bewirkt und ebenfalls Apoptose induzieren kann (Liu et al., 2005). TNF- α wird von aktivierten Lymphozyten produziert. Durch Bindung an seinen Rezeptor kommt es zur Rezeptoroligomerisierung, was die intrazelluläre Signaltransduktion und Apoptosekaskade einleitet (Zhang et al., 2008).

CD8⁺-T- und NK-Zellen exprimieren Fas-Ligand (FasL, Apo-1-Ligand, CD178). Durch Interaktion mit dem Rezeptor Fas (CD95, Apo-1) auf Targetzellen wird in diesen Apoptose induziert. FasL ist homolog zu TNF- α und seine Expression ist induzierbar. Immun-„privilegierte“ Gewebe wie das Auge, das Gehirn und die Keimdrüsen exprimieren FasL jedoch konstitutiv, was das Gewebe vor immunologischen Reaktionen schützt (Ramaswamy and Siegel, 2007). FasL wird entweder membranständig exprimiert oder als löslicher FasL („*soluble FasL*“, sFasL) sezerniert. Die Fas/FasL-Interaktion führt zur Trimerisierung von „*Fas-associated death domain*“ (FADD), was zur Aktivierung von Pro-Caspase-8 oder -10 im „*death-inducing signaling complex*“ (DISC)-Komplex führt und somit die apoptotische Kaskade einleitet.

Da GDF-15 selbst keine pro- oder anti-apoptotische Wirkung auf Immunzellen hatte, sollte der Einfluss von GDF-15 auf FasL-induzierte Apoptose untersucht werden. Dafür wurde ein löslicher mega-FasL (mFasL) eingesetzt, der in tetramerer Form durch starke Vernetzung der Fas-Rezeptoren in der Zielzelle Apoptose induzieren kann. Daneben sollte auch die TRAIL- und TNF- α -induzierte Apoptose unter GDF-15-Einfluss untersucht werden.

PBL wurden von gesunden Spendern isoliert, ohne Voraktivierung eingesetzt oder mit 100 U/ml IL-2 oder 2 μ g/ml PHA 24 h lang voraktiviert und mit 200 ng/ml rhGDF-15 bzw. 5 ng/ml rhTGF- β 1 48 h lang inkubiert. Apoptose wurde durch Behandlung mit 100 U/ml mFasL, 5 μ g/ml TRAIL oder 100 ng/ml TNF- α 4 h lang induziert und anschließend anhand der Annexin-V-FITC-Bindung und mit 7-AAD-Färbung zur Abgrenzung toter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

In Anwesenheit von GDF-15, nicht jedoch von TGF- β 1, wurde die durch FasL-induzierte Apoptose in aktivierten und nicht aktivierten Immunzellen signifikant verstärkt ($p=0,02$ für aktivierte PBL und $p=0,007$ für nicht aktivierte PBL, t-test, Excel) (Abb. 70: Einfluss von GDF-15 auf FasL-induzierte Apoptose).

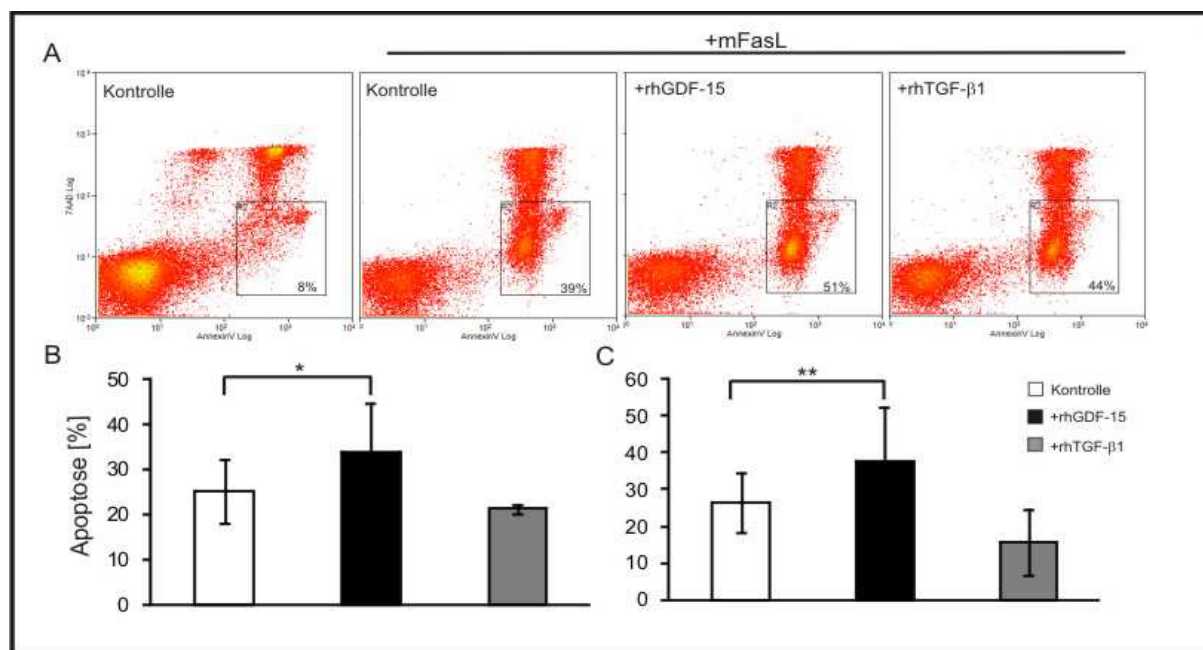


Abb. 70: Einfluss von GDF-15 auf FasL-induzierte Apoptose. PBL von gesunden Spendern wurden mit oder ohne Voraktivierung durch 100 U/ml IL-2 bzw. 2 μ g/ml PHA 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt. Apoptose wurde durch mFasL (100 U/ml) induziert und nach 4 h durchflusszytometrisch gemessen. Analyse von FasL-induzierter Apoptose in Immunzellen mit und ohne GDF-15-Behandlung (A, repräsentatives Beispiel), Anteil der apoptotischen Zellpopulation in aktivierten (B) und nicht aktivierten (C) Immunzellen nach FasL-Behandlung ($n=4$, $*p<0,05$ und $**p<0,01$, t-test, Excel).

Im Gegensatz zur FasL-induzierten Apoptose in Immunzellen war der Anteil an apoptotischen Zellen in der durch TRAIL- bzw. TNF- α -induzierten Apoptose nur minimal und wurde durch GDF-15 nicht beeinflusst (Abb. 71: Einfluss von GDF-15 auf die TRAIL- und TNF- α -induzierte Apoptose).

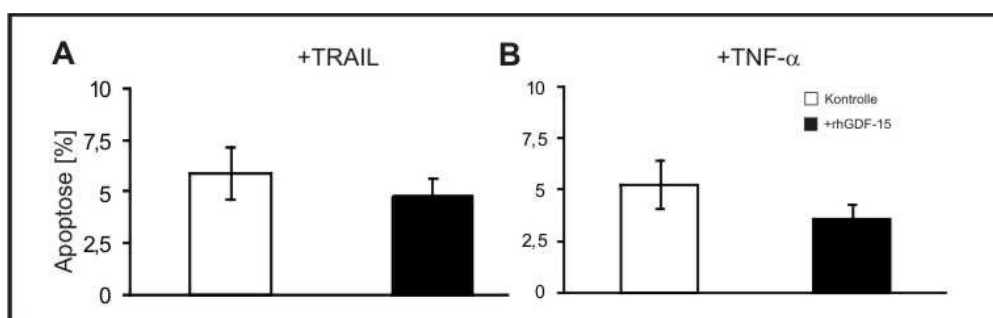


Abb. 71: Einfluss von GDF-15 auf die TRAIL- und TNF- α -induzierte Apoptose. PBL von gesunden Spendern wurden nach Aktivierung durch 100 U/ml IL-2 bzw. 2 μ g/ml PHA 48 h lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml) behandelt. Apoptose wurde durch TRAIL (5 μ g/ml) bzw. TNF- α (100 ng/ml) induziert und nach 4 h durchflusszytometrisch gemessen. Anteil apoptotischer Immunzellen nach TRAIL- (A) bzw. TNF- α - (B) Behandlung ohne bzw. mit rhGDF-15 (n=4).

3.3.5.3 Einfluss von GDF-15 auf fratrizide Apoptose

Unter fratrizider Apoptose versteht man die Vermittlung von apoptotischen Signalen von einer Zelle auf Zellen in ihrer unmittelbaren Umgebung. Da diese Zellen meist von der gleichen Art sind, spricht man von fratrizider Apoptoseinduktion, im übertragenen Sinne „Brudermord“. In der Immunzellhomöostase spielt diese Art der induzierten Apoptose eine wichtige Rolle bei der Eindämmung der Immunantwort nach erfolgreicher Antigeneliminierung (Brunner et al., 1995; Callard et al., 2003; Ju et al., 1995; Krammer, 2000).

In vivo wird FasL von Tumorzellen, aber auch von aktivierten Immunzellen selbst exprimiert (Bennett et al., 1998; O'Connell et al., 1997; Strand et al., 1996; Whiteside, 2002). Restifo beschrieb jedoch, dass nicht etwa tumorständiger FasL Apoptose in Lymphozyten induziert und dadurch einen „immune escape“ ermöglicht, vielmehr wird FasL von aktivierten Lymphozyten selbst exprimiert, wodurch in CD95-exprimierenden Lymphozyten „fratrizide“ Apoptose induziert wird (O'Connell et al., 2001; Restifo, 2000, 2001). Dieser Vorgang wird auch als „activation-induced cell death“ (AICD) bezeichnet. Um die fratrizid-induzierte Apoptose bestimmen zu können, wurden PBL unter Blockade von TRAIL bzw. FasL aktiviert, mit GDF-15 behandelt und der Anteil apoptotischer Zellen untersucht. PBL wurden dazu mit 20 μ g/ml FasL- bzw. TRAIL-blockierendem Antikörper 1 h lang vorbehandelt und anschließend in Gegenwart der TRAIL- bzw. FasL-Blockade mit 5 μ g/ml PHA 24 h lang mit bzw. ohne rhGDF-15-Behandlung aktiviert.

Bei der Blockade von FasL bzw. TRAIL zeigte sich kein Unterschied im Anteil der apoptotischen Immunzellen verglichen mit Zellen ohne Blockade. Bei Zellen, die zusätzlich mit GDF-15 behandelt wurden, führte die TRAIL-Blockade zu einem minimalen Anstieg des apoptotischen Anteils, nicht jedoch bei Zellen, bei denen FasL funktionell blockiert wurde (Abb. 72: Blockade von TRAIL- und FasL-induzierter Apoptose in Immunzellen). Fratrizide Apoptose scheint keine Rolle bei der GDF-15-vermittelten Apoptose zu spielen.

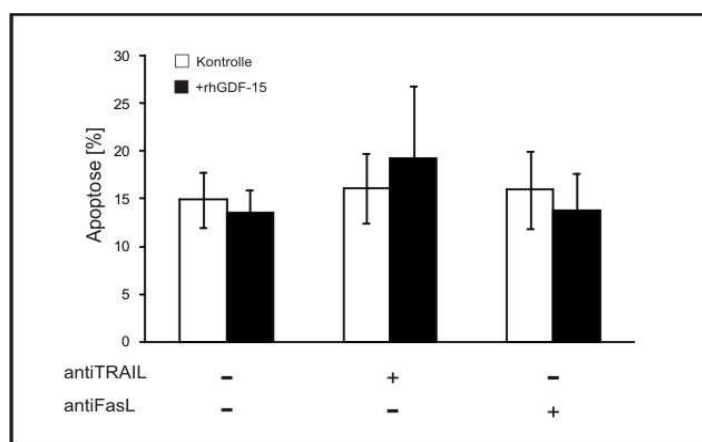


Abb. 72: Blockade von TRAIL- und FasL-induzierter Apoptose in Immunzellen. PBL wurden in Gegenwart von blockierendem TRAIL- bzw. FasL-Antikörper (je 20 µg/ml, AbDSerotec bzw. Santa Cruz) mit 5 µg/ml PHA 24 h lang mit oder ohne rhGDF-15 (200 ng/ml) aktiviert. Apoptose wurde durchflusszytometrisch anhand der Annexin-V-FITC-Färbung bestimmt (n=3).

3.3.5.4 Regulation von Apoptoserezeptoren durch GDF-15

Die als „*death receptors*“ (DR) bezeichneten Rezeptoren für pro-apoptotische Liganden werden auf verschiedensten Körperzellen exprimiert. Alle gehören der TNFR-Familie an und sind Transmembranproteine mit einer intrazellulären, 80 Aminosäuren langen „*death domain*“. An dieser bildet sich nach Rezeptoraktivierung der DISC-Komplex, der die weitere Signalkaskade initiiert, die schließlich zum Zelltod der rezeptortragenden Zelle führt (Ashkenazi, 2002).

DR4 (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-R2) binden beide TRAIL (Mahalingam et al., 2009). Die Bindung von TRAIL an seine entsprechenden Todesrezeptoren führt zur Rezeptortrimerisierung und intrazellulären Bildung des DISC, der schließlich die Apoptosekaskade über die Caspasen-Spaltung einleitet (Kischkel et al., 2000).

In Abschnitt 3.3.5.2 wurde gezeigt, dass GDF-15 die FasL-induzierte Apoptose in Immunzellen verstärkt. FasL bindet an seinen Rezeptor CD95 (Apo-1, Fas) (Itoh et al. 1991). Er gehört ebenfalls zur TNF-Rezeptorfamilie und ist auf der Oberfläche von Lymphozyten und anderen Zellen exprimiert. Bindung von FasL an CD95 führt zur Rekrutierung von FADD und Pro-Caspase-8, was zu einer kaskadenartigen Aktivierung von Caspasen und letztendlich zur Apoptose der Zelle führt (Golstein, 1997; Krammer, 1999). Die Fas/FasL-abhängige Apoptose spielt eine Rolle bei der Regulation von Immunantworten, der T-Zellzytotoxizität und beim „*immune escape*“ von Tumoren (Bellgrau et al., 1995; Krammer, 2000; O'Connell et al., 1999; O'Connell et al., 1996; Strand et al., 1996). Die Rolle der Fas/FasL-Interaktion beim „*immune escape*“ ist jedoch kontrovers diskutiert. Restifo misst der fratriziden Apoptose/AICD eine höhere Bedeutung bei als der Induktion von Apoptose in Immunzellen durch FasL-exprimierende Tumorzellen (Genestier et al., 1999; Restifo, 2000, 2001).

Hier sollte die Expression des Rezeptors CD95/Fas sowie die Expression von DR4 und DR5 unter GDF-15-Einfluss auf Immunzellen untersucht werden.

PBL gesunder Spender wurden wie in Abschnitt 3.3.5.2 beschrieben behandelt und stimuliert. Die Expression von CD95/Fas, DR4 und 5 wurde mittels Antikörperfärbung in der CD3⁺CD56⁺-NK-Zellpopulation durchflusszytometrisch untersucht.

GDF-15-Behandlung verstärkte den Anteil an CD95/Fas-positiven Immunzellen um fast 20%. Die Stärke der CD95/Fas-Expression, gemessen anhand der „specific fluorescence intensity“ der CD95-Fluoreszenz, nahm gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant zu (Abb. 73: Expression von CD95 unter GDF-15-Einfluss). TGF- β 1 erhöhte die CD95/Fas-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle im Gegensatz zu GDF-15 nicht.

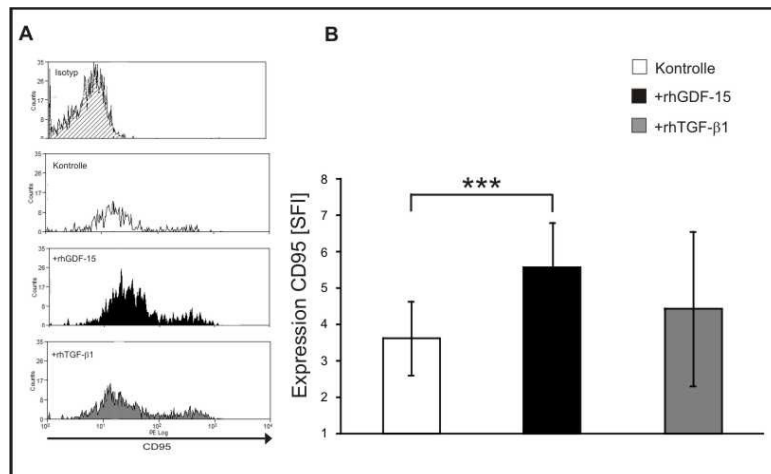


Abb. 73: Expression von CD95 unter GDF-15-Einfluss. PBL gesunder Spender wurden 24 h lang mit 100 U/ml IL-2 voraktiviert, mit rhGDF-15 (200 ng/ml) bzw. rhTGF- β 1 (5 ng/ml) 48 h lang behandelt und die CD95-Expression durchflusszytometrisch (A) bzw. als „specific fluorescence intensity“ unter Berücksichtigung unspezifischer Bindung (B) auf der CD3⁺CD56⁺-NK-Zellpopulation bestimmt (n=5, ***p=0,001, t-test, Excel).

Im Gegensatz zu CD95/Fas wurde die Expression der „death receptors“ DR4 und DR5, unabhängig von der Voraktivierung mit IL-2, weder durch GDF-15 noch durch TGF- β 1 auf NK- oder CD8⁺-T-Zellen beeinflusst (Abb. 74: Expression von DR4 und DR5 auf Immunzellen unter GDF-15-Einfluss).

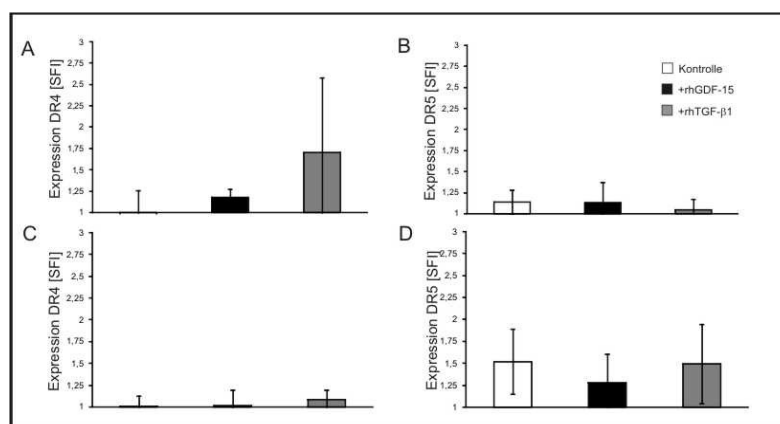


Abb. 74: Expression von DR4 und DR5 auf Immunzellen unter GDF-15-Einfluss. PBL gesunder Spender wurden 24 h lang mit IL-2 (100 U/ml) voraktiviert und mit rhGDF-15 (200 ng/ml) bzw. rhTGF- β 1 48 h lang behandelt. Die Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt und als SFI dargestellt. Expression von DR4 bzw. DR5 auf NK- (A bzw. B) und CD8⁺-T-Zellen (C bzw. D) (n=3).

3.3.6 Zusammenfassung: Parakrine Wirkung von GDF-15 im Ovarialkarzinom

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass GDF-15 in die lytische Aktivität von NK-Zellen auf unterschiedliche Weise eingreift. So kann GDF-15 die Expression bestimmter aktivierender und inhibierender NK-Rezeptoren modulieren, wie beispielsweise den aktivierenden Rezeptor NKG2D, und damit in die Rezeptor-vermittelte Lyse eingreifen. Andererseits wirkt GDF-15 direkt auf den Lysemechanismus der NK-Zellen, indem es die Granula-Expression und deren Freisetzung beeinflusst.

Schließlich verstärkt GDF-15 die FasL-induzierte Apoptose in Immunzellen durch Induktion der CD95/Fas-Expression auf Immunzellen.

Einige dieser Effekte sind stark und signifikant, andere schwächer ausgeprägt, doch zusammengenommen zeichnet sich damit zum ersten Mal eine, dem Tumor dienliche, immunregulierende und -modulierende Eigenschaft von GDF-15 ab.

3.4 GDF-15-abhängige Signaltransduktion und Genregulation

Nachdem in den vorherigen Abschnitten gezeigt wurde, dass GDF-15 einerseits einen (autokrinen) Einfluss auf OvCA-Zellen hat, aber andererseits auch als Immunmodulator parakrin Immunzellen beeinflusst, stellte sich nun die Frage, wie GDF-15 seine Funktion auf OvCA-Zellen und auf Immunzellen ausübt. Dazu sollten die Signaltransduktionsmechanismen untersucht werden, die der GDF-15-Wirkung zugrunde liegen. Die Erkenntnis daraus kann wichtige Ansatzpunkte für eine mögliche GDF-15-bezogene Tumorimmuntherapie aufzeigen. Da sich TGF- β und GDF-15 in vielen Eigenschaften ähneln, sollte primär untersucht werden, ob die Signalleitung von GDF-15 ähnlich zu der von TGF- β verläuft. Abb. 75 veranschaulicht die durch TGF- β -Familienmitglieder möglichen Signalwege.

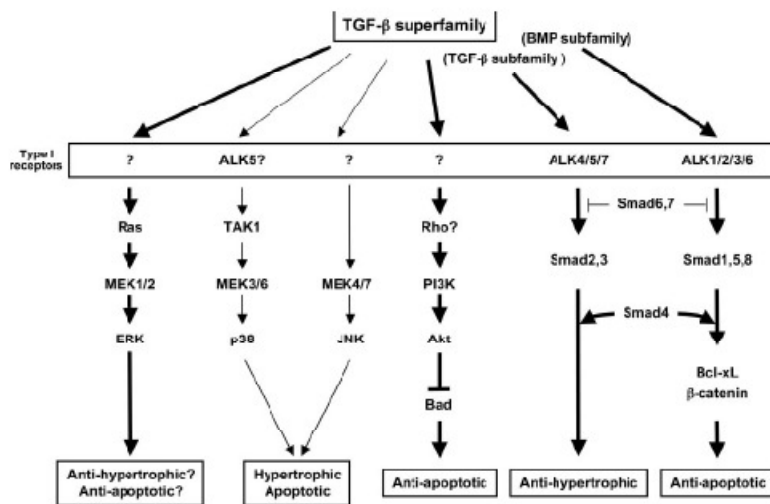


Abb. 75: Mögliche Signaltransduktionskaskaden der TGF- β -Superfamilie (Ago and Sadoshima, 2006).

3.4.1 GDF-15-abhängige Signaltransduktionsmechanismen

3.4.1.1 Wirkung von GDF-15 auf TGF- β -sensitive CCL-64-Zellen

Um einen Einblick in die Signaltransduktion von GDF-15 zu bekommen, sollte zunächst überprüft werden, ob die TGF- β -sensitive Nerz-Lungenepithelzelllinie CCL-64 auf GDF-15 reagiert. Diese Zellen reagieren mit einem Proliferationsarrest auf die Präsenz von TGF- β und sind somit ein Indikator für TGF- β -Aktivität.

CCL-64, die mit einem SMAD-abhängig aktivierbaren Luziferase-Reporterplasmid transzifiziert wurden (CCL-64-luc) (Prof. D. Rifkin, New York University, NY), reagieren auf TGF- β im Überstand mit Luziferaseaktivität. Die Zellen wurden 14 h lang mit rhTGF- β 1 bzw. rhGDF-15 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden die Zellen in 50 μ l Reporterlysepuffer pro Well lysiert und die Lumineszenz nach Zugabe des „Firefly“-Puffers am Luminometer gemessen. Analog

dazu wurden CCL-64-Zellen ohne Luziferaseplasmid mit GDF-15 und TGF- β behandelt und die Wachstumsdichte der Zellen im Kristallviolettassay untersucht.

CCL-64-luc-Zellen reagierten mit Wachstumsstopp auf hohe Konzentrationen von TGF- β 1, während GDF-15 keine Wirkung auf die Proliferation der TGF- β -sensitiven Zellen hatte. Das gleiche Ergebnis wurde im Kristallviolettassay anhand der CCL-64-Zelldichte unter TGF- β -bzw. GDF-15-Einfluss beobachtet (Abb. 76: Aktivität von GDF-15 auf TGF- β -sensitive CCL-64-Zellen).

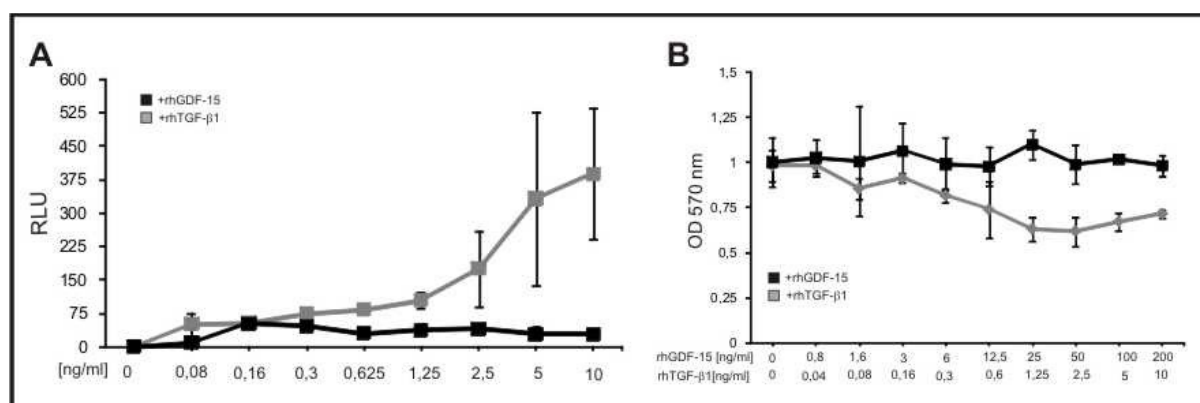


Abb. 76: Aktivität von GDF-15 auf TGF- β -sensitive CCL-64-Zellen. CCL-64-luc wurden 14 h lang (A) bzw. CCL-64 72 h lang (B) mit rhTGF- β 1 bzw. rhGDF-15 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend die Proliferation der Zellen anhand der Photonenemission (A) im Luminometer bzw. der Kristallviolettärfärbung im Photometer bestimmt (B). TGF- β -behandelte CCL-64-Zellen reagierten mit Proliferationsstopp, GDF-15 blieb wirkungslos im Vergleich zur Kontrolle (0 ng/ml) (n=3).

3.4.1.2 Aktivierung von TGF- β -sensitiven Reportergenen durch GDF-15

In der Reporter-Gen-Analyse (RGA) kann die spezifische Aktivierung eines Reportergens in Zellen durch äußere Faktoren untersucht werden. Dazu wird das Reporterplasmid, das die Promotersequenz des Reportergens direkt vor dem Gen für die „*Firefly*“-Luziferase trägt, transient in die zu untersuchenden Zellen transfiziert. Zur Transfektionskontrolle wird ein zweites Plasmid, das die Sequenz für die „*Renilla*“-Luziferase trägt, eingebracht. Wird das Reporter-Gen abgelesen, wird auch die „*Firefly*“-Luziferase exprimiert. Die Aktivität der transkribierten Luziferase kann anhand der Photonenfreisetzung im Luminometer gemessen werden und ist direkt proportional zur Expression des Reportergens (Sherf et al., 1996).

Im RGA sollten TGF- β -„*responsive elements*“ auf GDF-15-abhängige Aktivierung untersucht werden. In Tab. 34 sind die verwendeten Reporter-Elemente aufgeführt. Es sollte untersucht werden, ob GDF-15 in den untersuchten OvCA-Zelllinien TGF- β -spezifische Reportergene aktivieren kann.

Tab. 34: TGF- β -Reporterplasmide und ihr „*responsive element*“.

Reporterplasmid	Reporterelement
pTGF- β -luc	TGF- β -Gen-Reporter
pTIE-luc	TGF- β -abhängiger c-myc Repressions-Reporter
p3TP-luc	SMAD-abhängiger Reporter
pARE-luc	Antioxidant-Reporterelement
pMBE6-luc	SMAD-abhängiger Reporter (mutierte Kontrolle zu SBE)
pSBE2-luc	SMAD-abhängiger Reporter (<i>SMAD „binding element“</i>)
p154xSBR-luc	SMAD-abhängiger Reporter (<i>SMAD „binding region“</i>)

Für die RGA wurden 10^4 OvCA-Zellen (SKOV-3 und OaW-42) mit den Reporterplasmiden und dem Kontrollplasmid transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 5 ng/ml TGF- β 1 bzw. 50 ng/ml GDF-15 weitere 6 h lang behandelt, anschließend lysiert und in Luminometerplatten nach Zugabe von je 50 μ l „*Firefly*“- bzw. „*Renilla*“-Substratpuffer im Luminometer gemessen. Die relative Reporterogenaktivität wurde durch das Verhältnis von „*Firefly*“-Luziferaseaktivität/„*Renilla*“-Luziferaseaktivität ermittelt.

In SKOV-3 waren die Reporteraktivitäten generell stärker als in OaW-42 und damit leichter zu detektieren. TGF- β induzierte die Aktivität der Reporter p3TP, p154xSBR, pSBE2 (nur in SKOV-3) und pMBE6. GDF-15 induzierte die Aktivität von p154xSBR, pMBE6 (nur in OaW-42) und p3TP (nur in SKOV-3). Gegenüber der unbehandelten Kontrolle schien die Aktivität von pTGF- β und pARE unter TGF- β 1- und GDF-15-Einfluss herunterreguliert zu sein (Abb. 77: Aktivierung von TGF- β -Reporter gene durch GDF-15).

GDF-15 induzierte SMAD-abhängige Reporter gene in OvCA-Zellen, was ein Hinweis auf SMAD-Signaltransduktion ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in OvCA-Zellen weitere alternative Signalwege durch GDF-15 aktiviert werden. Das Ansprechen verschiedener SMAD-Reporter in OaW-42 und SKOV-3 deutet zudem auf zellspezifische SMAD-Signaltransduktion von GDF-15 hin.

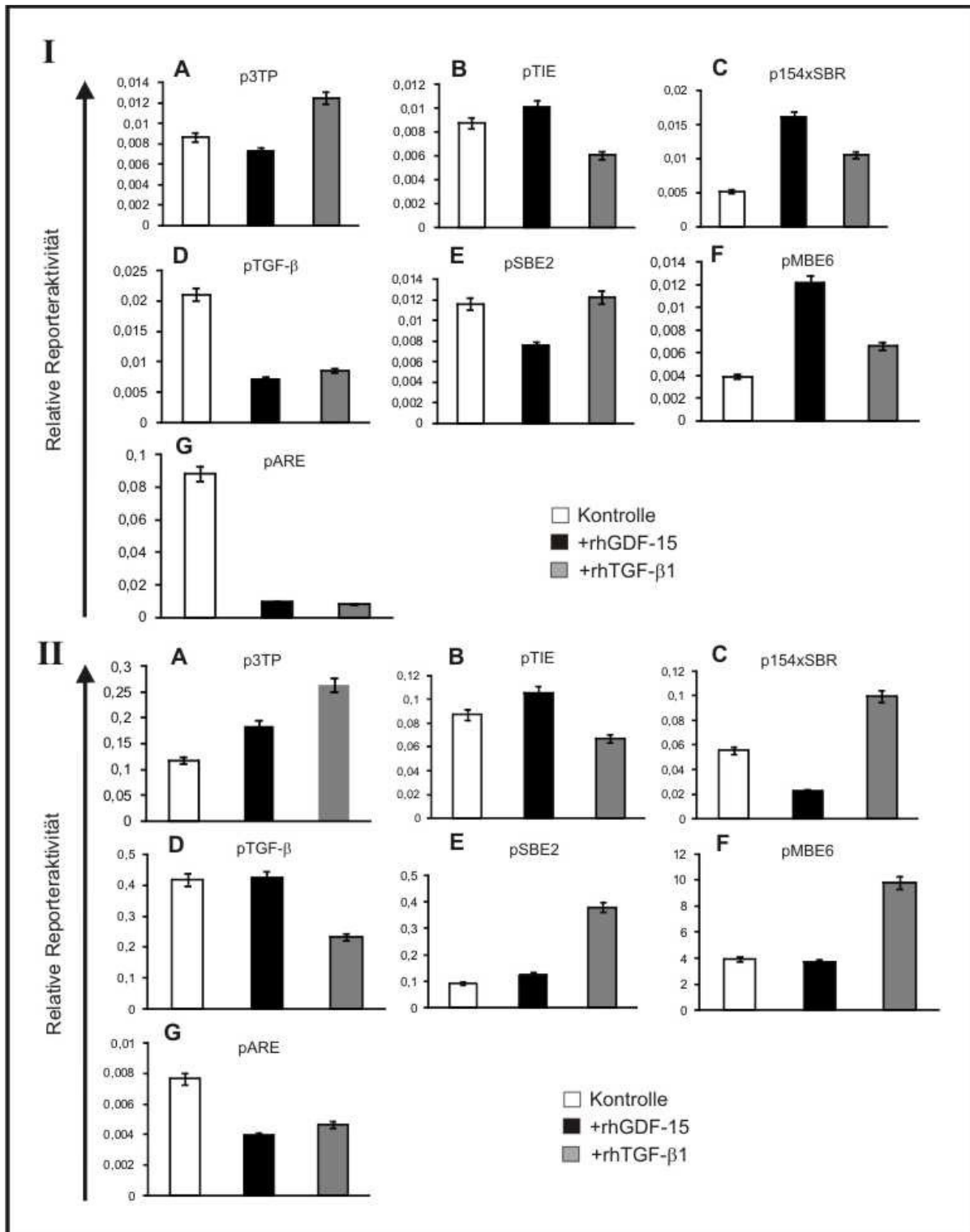


Abb. 77: Aktivierung von TGF-β-Reportergenen durch GDF-15. OaW-42 (I) bzw. SKOV-3 (II) wurden transient mit den angegebenen Reporterplasmiden und dem „*Renilla*“-Kontrollplasmid transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen 6 h lang mit TGF-β1 (5 ng/ml) bzw. GDF-15 (50 ng/ml) behandelt, lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen. Relative Aktivität der Reporterelemente p3TP (A), pTIE (B), p154xSBR (C), pTGFβ (D), pSBE2 (E), pMBE6 (F), pARE (G) nach GDF-15- und TGF-β1-Behandlung als Verhältnis von „*Firefly*“-Luziferaseaktivität/„*Renilla*“-Luziferaseaktivität (Standardabweichung der Triplikate) (repräsentative Beispiele).

3.4.1.3 GDF-15-abhängige Signaltransduktion in OvCA-Zellen

Alternativ zur SMAD-Signaltransduktion können TGF- β -Signale über eine Aktivierung von JNK, p38, PI3K/AKT und ERK laufen (Abb. 13 Alternative Signaltransduktion von TGF- β) (Engel et al., 1999; Hanafusa et al., 1999).

AKT/PKB ist eine der der wichtigsten Serin-Threonin-Kinasen für das Überleben von Zellen. Normalerweise wird AKT durch Wachstumsfaktoren wie EGF, Heregulin und PDGF aktiviert (Datta et al., 1999). AKT ist in einigen Tumoren konstitutiv aktiviert, u.a. im OvCA und im Mamma-CA (Bellacosa et al., 1995; Hutchinson et al., 2004; Sun et al., 2001). AKT-Aktivierung führte in Brusttumorzellen zu einer Induktion der Expression von GDF-15 einerseits, andererseits verlängerte das durch AKT induzierte GDF-15 die ERK-1-Aktivierung (Wollmann et al., 2005). Diese Ergebnisse stellen GDF-15 in Brusttumorzellen als Mediator des AKT- und ERK- Signalweges dar. In einer Studie von Kim et al. von 2008 wurde gezeigt, dass GDF-15 AKT und ERK-1/2 über die Aktivierung von ErbB2 in Brusttumorzellen und gastrointestinalen Tumorzellen aktiviert (Kim et al., 2008c). ErbB2 (Her2/neu) ist ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der häufig in Tumoren, u.a. auch im OvCA, überexprimiert ist (Allgayer et al., 2000; Slamon et al., 1989).

Um die Signaltransduktion von GDF-15 über AKT/PKB zu untersuchen, wurden die OvCA-Zellen OVCAR-3, SKOV-3 und OaW-42 mit 50 ng/ml rhGDF-15 oder 5 ng/ml TGF- β 1 20 min lang behandelt und die Zellen anschließend lysiert. 20 μ g Gesamtprotein wurden in die SDS-PAGE eingesetzt und die AKT-Phosphorylierung mit phospho-AKT-Antikörper (Cell Signaling) im Western Blot untersucht.

OvCA-Zelllinien wiesen nach GDF-15-Behandlung, nicht aber nach TGF- β 1-Behandlung, eine phospho-spezifische AKT-Bande bei 60 kDa auf (Abb. 78: AKT-Phosphorylierung durch GDF-15 in OvCA-Zelllinien).

Die Phosphorylierung fiel in den Zelllinien unterschiedlich stark aus: OVCAR-3 zeigten nur ein schwaches Signal, OaW-42 und SKOV3 dagegen ein starkes. Dieses Ergebnis bestätigt Beobachtungen von Kim et al., die GDF-15-abhängige AKT-Aktivierung in Brusttumorzellen nachweisen konnten (Kim et al., 2008c).

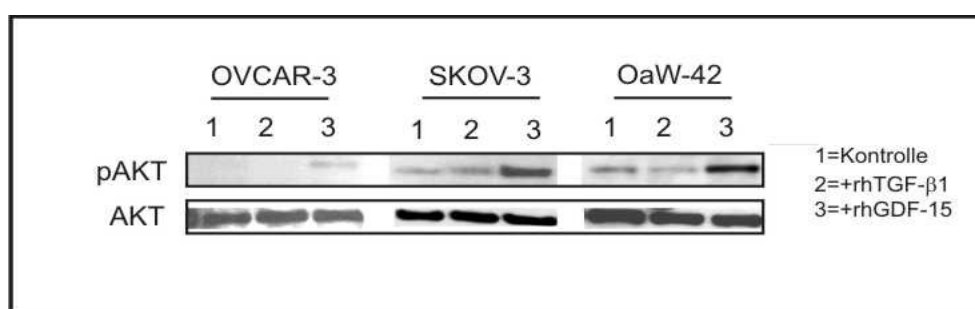


Abb. 78: AKT-Phosphorylierung durch GDF-15 in OvCA-Zelllinien. OvCA-Zelllinien wurden 20 min lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt, lysiert und davon 20 μ g Proteinlysate in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde die AKT-Phosphorylierung mit einem phospho-spezifischem AKT-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ unphosphoryliertes AKT detektiert (beide Antikörper von Cell Signaling).

Um zu prüfen, ob GDF-15-defiziente OvCA-Zellen ebenfalls über AKT-Signaltransduktion betreiben, wurden die GDF-15-defizienten OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 und die entsprechenden Kontrollzellen aus Abschnitt 3.2 mit 50 ng/ml GDF-15 bzw. 5 ng/ml TGF- β 1 20 min lang behandelt, lysiert und wie oben beschrieben im Western Blot auf AKT-Aktivierung untersucht.

Kontroll-transfizierte Zellen zeigten nach GDF-15-Behandlung AKT-Phosphorylierung und damit Aktivierung, was den Beobachtungen aus Abb. 78 entsprach. GDF-15-defiziente OaW-42 zeigten im Gegensatz dazu eine konstitutive AKT-Aktivierung, die unabhängig von GDF-15 war und durch rhGDF-15 auch nicht weiter induziert wurde. Möglicherweise reagiert hier die Tumorzelle mit kompensatorischen Mechanismen auf die Herunterregulation von GDF-15 (Abb. 79: GDF-15-abhängige AKT-Aktivierung in GDF-15-defizienten OvCA-Zellen).



Abb. 79: GDF-15-abhängige AKT-Aktivierung in GDF-15-defizienten OvCA-Zellen. OaW-42-pSUPERpuro und OaW-42-pSUPERpuro-GDF-15 wurden 20 min lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) bzw. rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt, lysiert und davon 20 μ g Gesamtprotein in die SDS-PAGE eingesetzt. AKT-Phosphorylierung wurde mit phospho-AKT-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ unphosphoryliertes AKT detektiert (beide Antikörper von Cell Signaling).

Der „*JUN-amino-terminal kinase*“ (JNK)-Signalweg ist involviert beim Zellwachstum, bei metabolischen Aktivitäten, bei der Apoptose und der DNA-Reparatur. JNK wird durch verschiedene zelluläre Stressfaktoren, z.B. Strahlung (UV-, γ -Strahlung), inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert. Sie ist daher auch unter dem Name „*stress-activated protein kinase*“ (SAPK) bekannt. Die Stresssignale werden hauptsächlich über Rho-GTPasen in die Zelle übermittelt. Alternative Aktivierungsmechanismen sind jedoch bekannt. JNK gehört zur Gruppe der MAPK. Typischerweise erfolgt die Aktivierung über schrittweise Phosphorylierung durch eine MAPKKK (MEKK1-4 oder MLK), die MKK4-7 phosphoryliert, welche wiederum JNK aktiviert. Daraufhin kann JNK dann als aktives Dimer in den Kern translozieren und über Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-JUN oder ATF-2 die Genexpression regulieren (Johnson and Nakamura, 2007).

Da TGF- β alternativ zum SMAD-Signalweg auch über JNK wirken kann, sollte diese Kinase unter GDF-15-Einfluss untersucht werden. Dazu wurden wie oben beschrieben SKOV-3 5 min lang mit GDF-15 (in unterschiedlichen Konzentrationen) bzw. mit TGF- β 1 behandelt, lysiert und im Western Blot analysiert.

JNK wurde in SKOV-3 durch GDF-15 und TGF- β 1 aktiviert. Das JNK-Signal auf Höhe der 46 kDa-Bande war unter hoher GDF-15-Konzentration sowie unter TGF- β -Einfluss stärker ausgeprägt als in

der Kontrolle. Die 54 kDa-JNK-Bande hingegen blieb unverändert (Abb. 80: JNK-Phosphorylierung unter GDF-15-Einfluss).

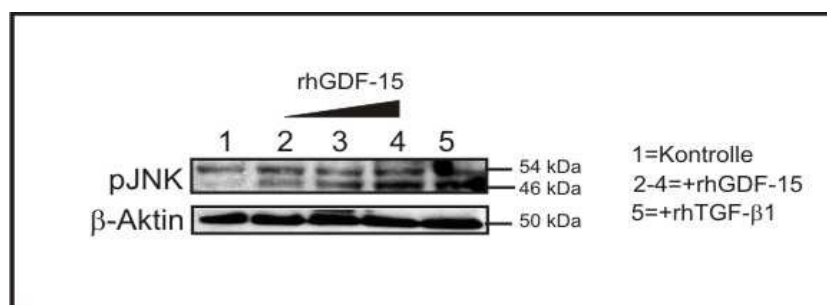


Abb. 80: JNK-Phosphorylierung unter GDF-15-Einfluss. SKOV-3 wurden 5 min lang mit rhGDF-15 (5 ng/ml (=2)/ 50 ng/ml (=3) oder 200 ng/ml(=4)) bzw. mit 5 ng/ml rhTGF-β1 (=5) behandelt, lysiert und davon 20 µg Gesamtprotein in die SDS-PAGE eingesetzt. JNK-Aktivierung wurde mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes JNK (Cell Signaling) nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β-Aktin (Abcam).

In anderen OvCA-Zelllinien (OaW-42, OVCAR-3) und einer Mamma-CA-Zelllinie (HCC1806) wurde kein erkennbarer Unterschied in der JNK-Phosphorylierung zwischen GDF-15-behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für eine zellspezifische JNK-Signaltransduktion von GDF-15.

3.4.2 GDF-15-abhängige Signaltransduktion und Rezeptoraktivierung in Immunzellen

Über die Signaltransduktion von GDF-15 in Tumorzellen ist bereits einiges bekannt, nicht jedoch über die Signalwege, die GDF-15 in Immunzellen aktiviert. Für die Tumorummuntherapie ist die Kenntnis über die Signalwege von besonderer Wichtigkeit, wenn es darum geht, die GDF-15-abhängigen „*tumor escape*“-Mechanismen zu blockieren und die Immunüberwachung zu unterstützen. Im Folgenden sollten mögliche Signalwege auf ihre Aktivierung durch GDF-15 untersucht werden. Vornehmlich wurden dabei die Signalwege untersucht, die bereits in Tumoren für GDF-15 beschrieben wurden oder von TGF-β bekannt sind.

3.4.2.1 GDF-15-abhängige Signaltransduktion in Immunzellen

3.4.2.1.1 Signaltransduktion über SMAD

TGF-β-Signaltransduktion läuft vornehmlich über die SMAD-Proteine. Nach TGF-β-Bindung an die TGF-β-Rezeptoren (TGF-βR) werden die Rezeptor-SMAD-Proteine SMAD2 und SMAD3 vom TGF-βRI phosphoryliert, was zur Rekrutierung von SMAD4 führt. Der SMAD-Komplex wandert in den Kern, wo die Bindung von Co-Aktivatoren die Bindung an die DNA der Zielgene verstärkt (Massague, 2000;

Shi and Massague, 2003). Alternativ kann der SMAD-Komplex auch Transkriptionen inhibieren, was zu einer Inhibition der TGF- β -Zielgene führt. Die Art der von TGF- β -vermittelten Transkriptionsaktivität bzw. -hemmung ist zelltypspezifisch und hängt vom Vorhandensein der jeweiligen Transkriptionsaktivatoren bzw. -repressoren ab. Reguliert wird die TGF- β -Signaltransduktion von den inhibitorischen SMAD-Proteinen SMAD6 und SMAD7, die die Phosphorylierung der Co-SMAD verhindern (Massague, 1996; Massague et al., 2000; Shi and Massague, 2003).

Die Signaltransduktion der „bone morphogenetic proteins“ (BMP), einer Subfamilie der TGF- β -Superfamilie, verläuft ähnlich wie bei TGF- β . Nach Bindung des BMP-Liganden an den Rezeptorkomplex aktiviert der BMP-Rezeptor Typ I durch Phosphorylierung die SMAD-Proteine 1, 5 und 8, welche daraufhin mit SMAD4 assoziieren und als Komplex in den Kern translozieren. Dort können SMAD1 und SMAD5 direkt an die DNA binden und die Genexpression initiieren (Cao and Chen, 2005).

Von GDF-15 wurde berichtet, dass es für seine inhibitorische Funktion in Tumorzellen ebenfalls den TGF- β -Signaltransduktionsweg benutzt (Tan et al., 2000). Auch in neonatalen Kardiomyozyten wurde eine Beteiligung der SMAD-Proteine bei der GDF-15-Signaltransduktion beobachtet (Xu et al., 2006b). Hier sollte untersucht werden, ob GDF-15 in Immunzellen ähnlich wie TGF- β oder BMP über SMAD-Aktivierung Signale in die Zelle übermittelt.

Immunzellen (PBL) wurden dafür 24 h lang in X-VIVO 15-Medium kultiviert und über verschiedene Zeitintervalle hinweg mit GDF-15 bzw. TGF- β 1 behandelt. Anschließend wurden die PBL lysiert, 20 μ g Protein im Western Blot eingesetzt und auf SMAD2/3-Phosphorylierung untersucht.

Wie erwartet setzte die TGF- β 1-vermittelte SMAD2/3-Aktivierung unverzüglich nach bereits 5 min Behandlung ein und hielt auch nach 24 h Inkubation noch an. GDF-15 zeigte in den ersten 24 h keine SMAD2/3-Aktivierung. Erst nach 24 h Inkubationsdauer setzte die Phosphorylierung zeitverzögert ein (Abb. 81: SMAD2/3-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen).

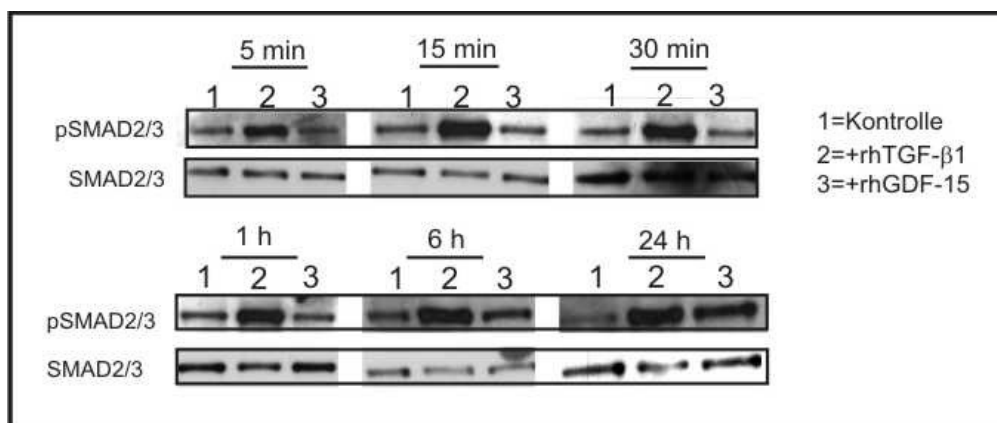


Abb. 81: SMAD2/3-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen. Immunzellen (PBL) wurden 5/ 15/ 30 min bzw. 1/ 6/ 24 h lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden sie lysiert und davon 20 μ g Proteinlysate in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde SMAD2/3-Phosphorylierung mit phospho-spezifischem SMAD2/3-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ unphosphoryliertes SMAD2/3 detektiert (beide Antikörper von Cell Signaling).

Daher wurden in einer längeren Kinetikstudie Immunzellen über 72 h hinweg mit GDF-15 behandelt und in bestimmten Zeitabständen Zellen entnommen, lysiert und die SMAD2/3-Aktivierung im Western Blot untersucht.

Die nach 24 h Inkubation einsetzende GDF-15-abhängige SMAD2/3-Phosphorylierung blieb über 72 h stabil (Abb. 82: SMAD2/3-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen (24-72 h Kinetik)). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass GDF-15 keinen direkten Effekt auf SMAD2/3-Phosphorylierung hat, sondern hier ein sekundärer, von GDF-15 induzierter Effekt zum Tragen kommt.

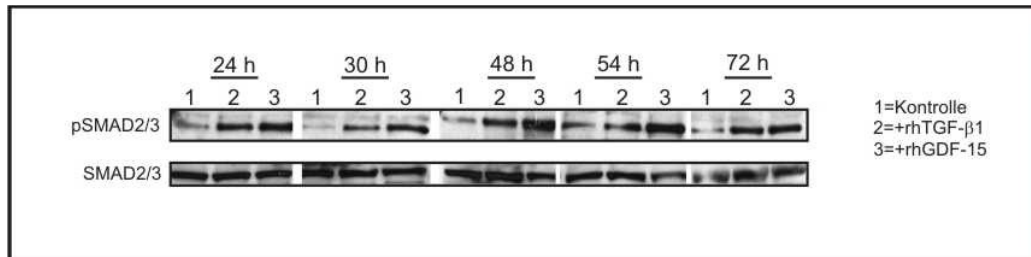


Abb. 82: SMAD2/3-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen (24-72 h Kinetik). Immunzellen (PBL) wurden 24/ 30/ 48/ 54 und 72 h lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) oder mit rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt und wie in Abb. 81 beschrieben im Western Blot analysiert.

GDF-15 ist ein eigenständiger Faktor innerhalb der TGF- β -Superfamilie, der auch Eigenschaften der BMP-Familie teilt. Diese betreiben Signaltransduktion über SMAD1/5/8-Aktivierung, im Gegensatz zu SMAD2/3-Aktivierung durch TGF- β . Daher wurde auch dieser Signalweg untersucht.

Analog zur Untersuchung des SMAD2/3-Signalweges wurden PBL mit rhGDF-15 und rhTGF- β 1 behandelt und die SMAD1/5/8-Aktivierung im Western Blot analysiert.

Bei GDF-15 behandelten Immunzellen konnte keine Phosphorylierung über SMAD1/5/8 beobachtet werden. Lediglich bei TGF- β -behandelten PBL konnte ein schwaches Signal beobachtet werden, welches nach längerer Inkubation jedoch wieder verschwand (Abb. 83: SMAD1/5/8-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen).

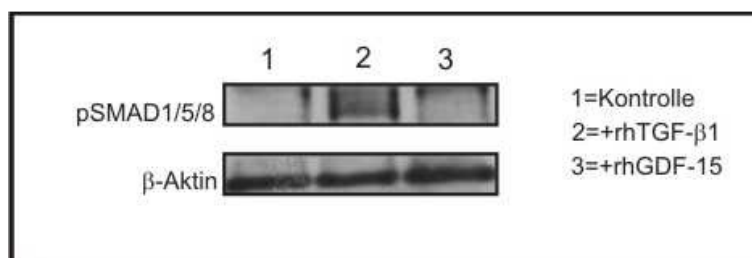


Abb. 83: SMAD1/5/8-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen. Immunzellen (PBL) wurden 30 min lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt, anschließend lysiert und 20 μ g Proteinlysate in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde SMAD1/5/8-Phosphorylierung mit phospho-spezifischem SMAD1/5/8-Antikörper (Cell Signaling) nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ β -Aktin detektiert (Abcam).

3.4.2.1.2 Signaltransduktion über AKT, p38/MAPK und JAK-STAT

AKT ist eine wichtige Serin-Threonin-Kinase, die das Zellüberleben steuert, und ist daher in vielen Tumoren konstitutiv aktiviert (Bellacosa et al., 1995; Hutchinson et al., 2004; Sun et al., 2001). GDF-15 kann in Mamma-CA-Zellen AKT aktivieren (Kim et al., 2008c) und auch im OvCA läuft die GDF-15-Signaltransduktion über AKT-Phosphorylierung (Abschnitt 3.4.1). In Immunzellen ist über die GDF-15-abhängige AKT-Signaltransduktion bisher nichts bekannt.

Die „*extracellular signal-regulated kinases*“ ERK-1 und 2 sind wichtige „*mitogen-activated protein kinases*“ (MAP-Kinasen, MAPK), die an einer Vielzahl von zellulären und physiologischen Prozessen beteiligt sind. Normalerweise werden mit der Aktivierung von ERK-1/2 über Phosphorylierung Überlebenssignale an die Zellen übertragen. Unter bestimmten Umständen kann ERK-1/2-Signaltransduktion jedoch auch pro-apoptotisch wirken (Lu and Xu, 2006).

Um eine Beteiligung von ERK-1/2 und AKT an der GDF-15-Signaltransduktion in Immunzellen zu untersuchen, wurden PBL gesunder Spender isoliert und nach 24 h Kultur in X-VIVO 15-Medium 5 min, 15 min oder 30 min lang (ERK-1/2-Aktivierung) bzw. 20 min lang (AKT-Aktivierung) mit rhGDF-15 bzw. rhTGF- β 1 behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 20 μ g Gesamtprotein auf ein Polyacrylamidgel geladen. Nach Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran wurde mittels phospho-ERK-1/2- bzw. phospho-AKT-Antikörper die Aktivierung im Western Blot untersucht.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle waren weder AKT noch ERK-1/2 durch GDF-15 bzw. TGF- β 1 in Immunzellen beeinflusst (Abb. 84: AKT- und ERK-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen). In Immunzellen läuft die Signaltransduktion von GDF-15 demnach nicht über AKT- oder ERK-1/2-Phosphorylierung.

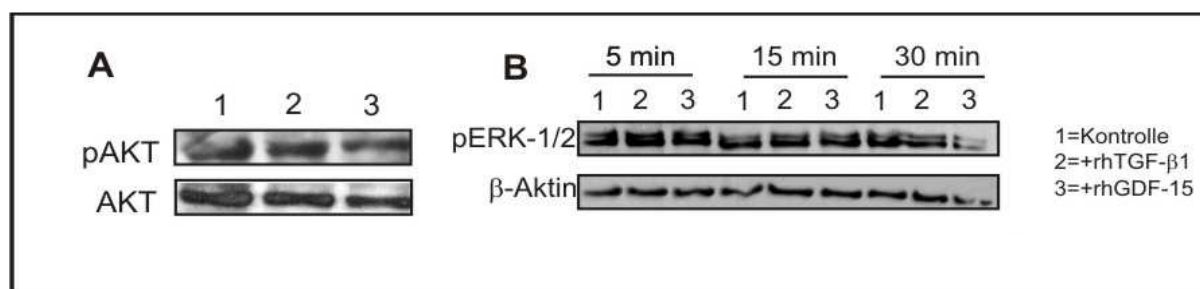


Abb. 84: AKT- und ERK-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen. Immunzellen (PBL) wurden 20 min lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt, lysiert und 20 μ g Proteinlysate in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde die AKT-Phosphorylierung mit phosphospezifischem AKT-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ unphosphoryliertes AKT detektiert (beide Antikörper Cell Signaling) (**A**). Analog zu (**A**) wurden Immunzellen 5, 15 und 30 min lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt und im Western Blot mit phospho-ERK-1/2-Antikörper (Cell Signaling) auf ERK-1/2-Phosphorylierung untersucht (**B**). Ladekontrolle diente β -Aktin.

Die p38/MAPK gehört ebenfalls zur Gruppe der „*mitogen-activated protein kinases*“. Sie ist auch als MAPK14, CSBP oder RK bekannt und hat vier Isoformen (α - δ). Aktiviert wird der p38/MAPK-Signalweg über Phosphorylierung nach Zellstress oder durch Zytokine. Die p38/MAPK spielt, ähnlich

wie SAPK/JNK, eine wichtige Rolle bei der Regulierung von zellulären Prozessen wie Differenzierung, Wachstum, Apoptose oder Inflammation (Wagner and Nebreda, 2009).

Von TGF- β ist bekannt, dass es alternativ zu SMAD über p38 und JNK Signale weiterleitet (Santander and Brandan, 2006). Hier sollte die Rolle von GDF-15 bei der Aktivierung der p38 und der JNK MAPK in Immunzellen untersucht werden.

Dafür wurden Immunzellen von gesunden Spendern isoliert, 24 h lang in X-VIVO 15-Medium kultiviert und 15 min lang mit GDF-15 bzw. TGF- β 1 behandelt. 20 μ g Proteinlysate dieser Zellen wurde in die SDS-PAGE eingesetzt und die Aktivierung von p38 bzw. JNK wurde mit phospho-spezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht.

GDF-15 aktivierte p38 über Phosphorylierung in Immunzellen (Abb. 85: p38/MAPK-Aktivierung durch GDF-15 in Immunzellen), während TGF- β 1 im Vergleich dazu keine Aktivierung zeigte.



Abb. 85: p38/MAPK-Aktivierung durch GDF-15 in Immunzellen. Immunzellen (PBL) wurden 15 min lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt, anschließend lysiert und 20 μ g Proteinlysate in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde p38/MAPK (AbDSerotec) detektiert und als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ β -Aktin detektiert (Abcam).

In SKOV-3 war die 46 kDa große Bande von JNK bei TGF- β 1- und GDF-15-behandelten Proben stärker aktiviert als in der Kontrolle. In Immunzellen wurde dagegen die 54 kDa große Bande des JNK-Dimers unter TGF- β 1-Einfluss und bei hohen GDF-15-Konzentrationen stärker aktiviert (Abb. 86: JNK-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen).

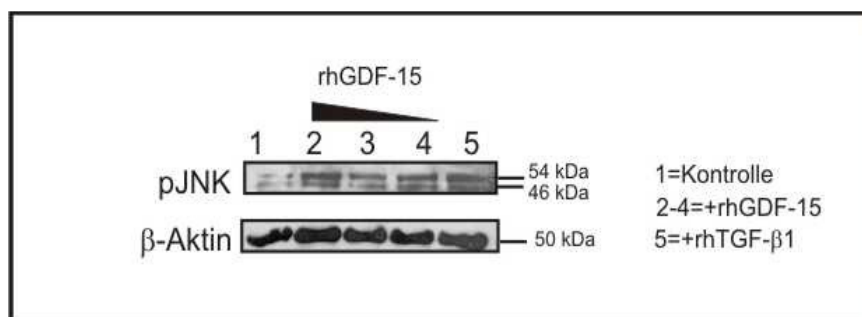


Abb. 86: JNK-Phosphorylierung durch GDF-15 in Immunzellen. Immunzellen (PBL) wurden 5 min lang mit rhGDF-15 (200 ng/ml (=2)/ 50 ng/ml (=3) oder 5 ng/ml (=4) ng/ml) oder 5 ng/ml rhTGF- β 1 (=5) behandelt, anschließend lysiert und 20 μ g Proteinlysate in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde JNK-Phosphorylierung (54 und 46 kDa) mit phospho-spezifischem JNK-Antikörper (Cell Signaling) nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ β -Aktin detektiert (Abcam).

Der JAK-STAT-Signalweg ist ein wichtiger zytokinabhängiger Mediator für Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose. Janus Kinasen (JAK) binden an Zytokinrezeptoren und werden nach Ligandenbindung über Phosphorylierung aktiviert. JAK wiederum aktiviert STAT-Proteine, die die Signale bis in den Kern weiterleiten. STAT1 ist ein Transkriptionsfaktor und ein Mitglied der „*signal transducers and activators of transcription*“ (STAT)-Familie und in der IFN-Signaltransduktion involviert (Durbin et al., 1996). STAT1 bildet mit STAT3 Heterodimere nach IFN- γ -Bindung und mit STAT2 nach IFN Typ 1-Bindung. Nach Dimerisierung wandert STAT1 in den Kern und bindet an STAT1-sensitive Gene. STAT3 wird nach Aktivierung durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, IFN I+II, IL-5, IL-6, HGF, LIF, BMP2) durch JAK phosphoryliert und aktiviert. Phospho-STAT3 bildet Homo- oder Heterodimere und transloziert in den Nukleus, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt. In vielen Tumoren ist STAT3 konstitutiv aktiviert (Alvarez et al., 2006; Klampfer, 2006; Yin et al., 2006), wo es sowohl die Apoptose als auch die Zellproliferation beeinflusst.

PBL gesunder Spender wurden isoliert, 24 h lang in X-VIVO 15-Medium kultiviert, anschließend mit rhGDF-15 und rhTGF- β 1 in den angegebenen Konzentrationen und Zeitintervallen behandelt und die Aktivierung von STAT1 und STAT3 im Western Blot untersucht.

Die Behandlung von Immunzellen mit GDF-15 und TGF- β 1 bewirkte keinen Unterschied bei der STAT1- und STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 87: STAT1- bzw. STAT3-Aktivierung durch GDF-15 in Immunzellen). Auch unterschiedlich lange Behandlungsdauer oder unterschiedliche GDF-15-Konzentrationen ergaben keinen Unterschied zur Kontrolle. Diesen Ergebnissen zufolge spielt GDF-15 keine Rolle im JAK-STAT-Signalweg von Immunzellen.

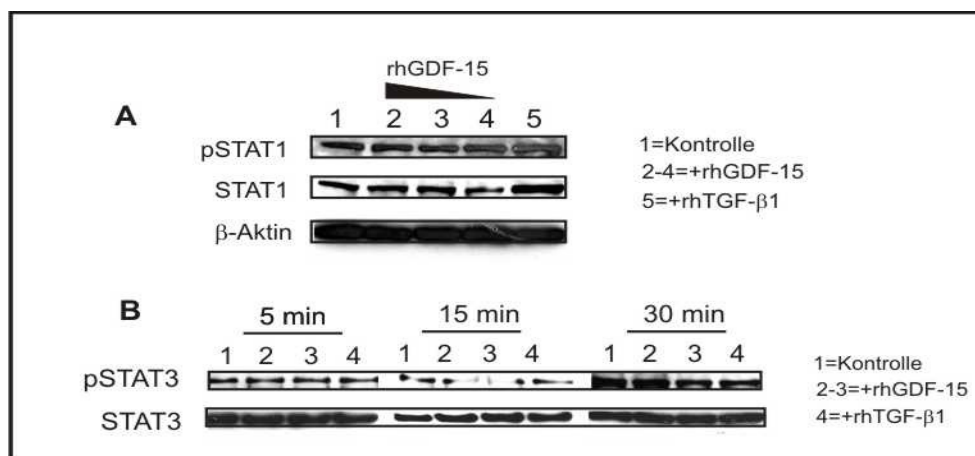


Abb. 87: STAT1- bzw. STAT3-Aktivierung durch GDF-15 in Immunzellen. Immunzellen (PBL) wurden 15 min (A) bzw. 5/ 15/ 30 min lang (B) mit rhGDF-15 (200 (=2)/ 50 (=3) oder 5 (=4) ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt, anschließend lysiert und 20 μ g Proteinlysate in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde STAT1- bzw. STAT3-Phosphorylierung mit phospho-spezifischen Antikörpern (Cell Signaling) nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde nach Membran-„stripping“ STAT-1 bzw. -3 bzw. β -Aktin detektiert (Abcam).

3.4.2.2 GDF-15- und TGF- β 1-abhängige Rezeptoraktivierung in Immunzellen

Um einen Überblick über GDF-15-abhängige Immunrezeptor-Aktivierung zu bekommen, wurde die Phosphorylierung verschiedener, in Immunzellen exprimierter Rezeptoren im „*Human Phospho-Immunoreceptor-Array*“ von R&D Systems untersucht.

Nach Bindung von Liganden an Immunrezeptoren werden diese durch Phosphorylierung ihrer intrazellulären ITAM- oder ITIM-Signaldomäne an Tyrosin-Aminosäureresten aktiviert. Immunrezeptoren mit ITAM aktivieren daraufhin die Zelle, Immunrezeptoren mit ITIM hemmen die Funktionen der Zelle.

Der Immunrezeptor-Array ist eine Nitrozellulosemembran mit immobilisierten „*capture*“-Antikörpern gegen 59 Immunrezeptoren mit ITAM/ITIM-Signaldomäne. Die Antikörper binden unspezifisch phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Immunrezeptoren aus Proteinlysaten. Auf diese Membran wird das Zellysate gegeben und nach Entfernung der ungebundenen Proteine durch Waschen die Aktivierung der Immunrezeptoren mit Zweitantikörper gegen phospho-Tyrosin detektiert.

Immunzellen (PBL) von drei gesunden Spendern wurden separat isoliert, mit rhGDF-15 (200 ng/ml) oder rhTGF- β 1 (5 ng/ml) 20 min lang behandelt und lysiert. Nach Proteinbestimmung wurde von jedem Spender 166,67 μ g Protein für den Immunrezeptor-Array eingesetzt (Gesamtproteinmenge = 500 μ g).

Generell zeigte sich bei der Immunrezeptoraktivierung von TGF- β 1 und GDF-15 ein ähnliches Muster. Die Unterschiede waren marginal und lagen überwiegend in der Stärke der Signale. Viele Mitglieder der Siglec-Proteinfamilie (Siglec2, 5, 7, 10) wurden durch GDF-15 und TGF- β 1 aktiviert, ebenso verschiedene Fc-Rezeptoren (FcR ϵ , γ) und Immunrezeptoren der ILT-Familie (2, 3, 6). Außerdem wurden SLAMF4, 5 und 6, TREM1 und 2, LIRM-6, CAECAM-1 und BLAME im Phospho-Immunrezeptor-Array aktiviert gefunden.

Grundlegende Unterschiede ergaben sich bei DNAM-1-Aktivierung (Koordinaten C 1, 2), KIR2DL4 (Koordinaten D 5,6), NTB-A/SLAMF6 (Koordinaten E 5, 6), LAIR-1/CD305 (Koordinaten D 7, 8), PECAM/CD31 (Koordinaten E 9, 10), CD84/ SLAMF5 (Koordinaten A 19, 20) und Dectin-1/CLEC-7a (Koordinaten B 19, 20). Diese zeigten nur mit GDF-15 ein Signal, nicht jedoch mit TGF- β 1. NKp30 (Koordinaten D 21, 22) wurde hingegen nur von TGF- β 1, nicht aber von GDF-15 aktiviert, was die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie aus Abschnitt 3.3.3.1.2 bestätigte.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war das Signal von GDF-15- und TGF- β 1-behandelten Proben bei SHP-2 (Koordinaten E 15, 16) abgeschwächt (Abb. 88: Human Phospho-Immunorezeptor-Array, Tab. 37: Phospho-Immunorezeptor-Array (R&D Systems): Rezeptor-Koordinaten).

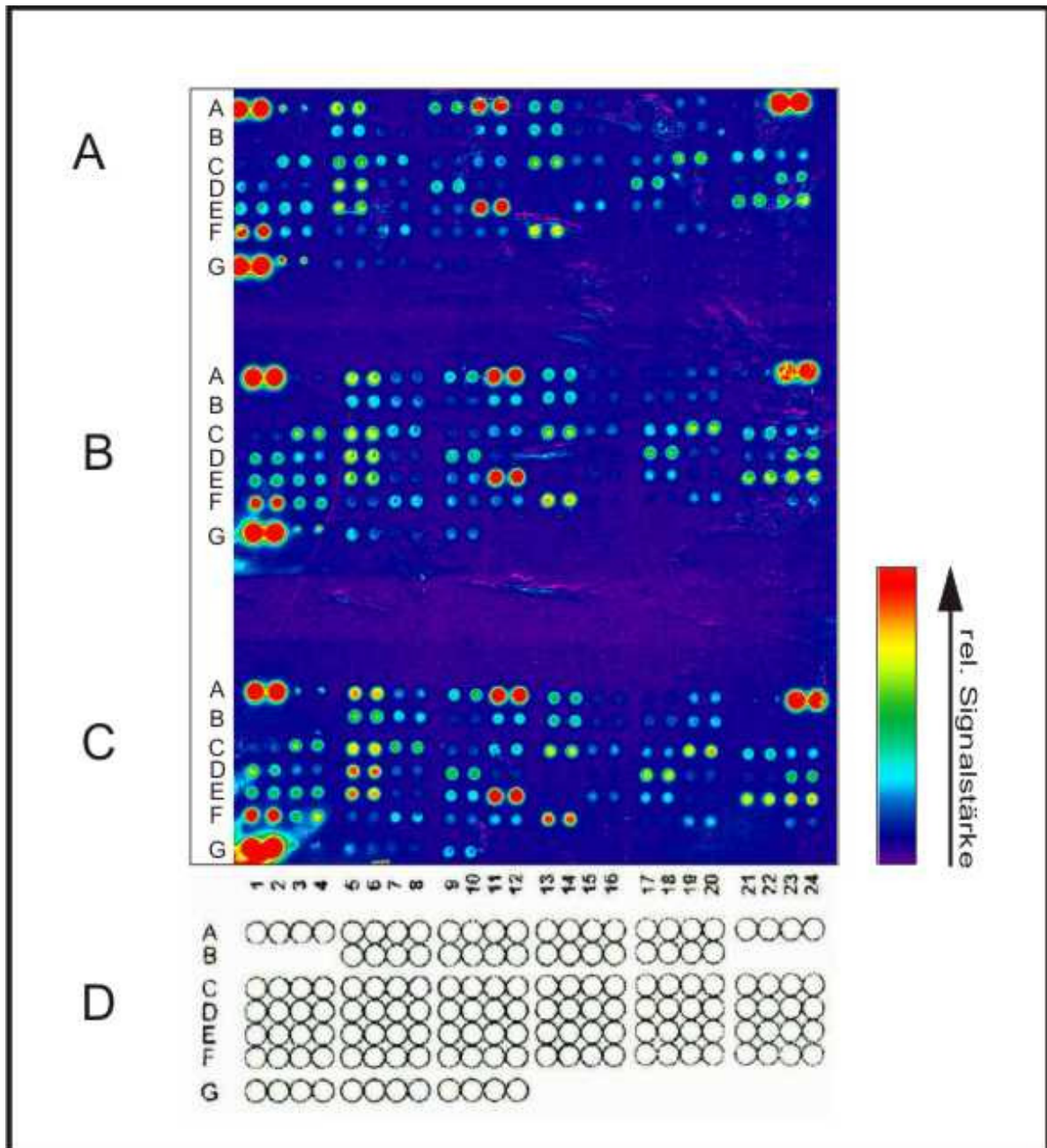


Abb. 88: Human Phospho-Immune Receptor-Array. PBL von drei gesunden Spendern wurde isoliert, mit rhGDF-15 (200 ng/ml) bzw. TGF- β 1 (5 ng/ml) 20 min lang behandelt und anschließend lysiert. Je 166,67 μ g Protein/Spender wurde in einen Ansatz gepoolt (500 μ g Gesamtprotein) und pro Membran im Phospho-Immune Receptor-Array eingesetzt. Unbehandelte Kontrolle (**A**), TGF- β 1-behandelte PBL (**B**) und GDF-15-behandelte PBL (**C**). Raster zur Lokalisation der Immune Rezeptoren (**D**) (Proteinpool aus 3 Donoren) (n=2).

Tab. 35: Phospho-Immunoarray (R&D Systems): Rezeptor-Koordinaten.

Koordinaten	Rezeptor	Koordinaten	Rezeptor	Koordinaten	Rezeptor
A 1, 2	*PY-Kontrolle	C 11, 12	FcRH2/ IRTA4	E 13, 14	SHP-1
A 3, 4	**Bt Kontrolle	C 13, 14	FcRH4/IRTA1	E 15, 16	SHP-2
A 5, 6	2B4/SLAMF 4	C 15, 16	FcRH5/IRTA2	E 17, 18	Siglec-2/CD22
A 7, 8	BLAME/SLAMF 8	C 17, 18	ILT2/CD85j	E 19, 20	Siglec-3/CD33
A 9, 10	BTLA4	C 19, 20	ILT3/CD85k	E 21, 22	Siglec-5
A 11, 12	CD3e	C 21, 22	ILT4/CD85d	E 23, 24	Siglec-7
A 13, 14	CD5	C 23, 24	ILT5/CD85a	F 1, 2	Siglec-9
A 15, 16	CD6	D 1, 2	ILT6/CD85e	F 3, 4	Siglec-10
A 17, 18	CD28	D 3, 4	Integrinβ3/CD61	F 5, 6	SIRP-β1
A 19, 20	CD84/SLAMF 5	D 5, 6	KIR2DL4	F 7, 8	SLAM/CD150
A 21, 22	**Bt-Kontrolle	D 7, 8	LAIR-1	F 9, 10	TREM-1
A 23, 24	*PY-Kontrolle	D 9, 10	LAIR-2	F 11, 12	TREM-2
B 5, 6	CD229/SLAMF 3	D 11, 12	LMIR-1/CD300a	F 13, 14	TREML1/TLT1
B 7, 8	CEAAM-1	D 13, 114	LMIR2/CD300c	F 15, 16	Goat-IgG
B 9, 10	CLEC-1	D 15, 16	LMIR3/CD300f	F 17, 18	mouse-IgG ₁
B 11, 12	CLEC-2	D 17, 18	LMIR6/CD300e	F 19, 20	mouse-IgG _{2a}
B 13, 14	CRACC/SLAMF 7	D 19, 20	MDL-1/CLEC5a	F 21, 22	mouse-IgG _{2b}
B 15, 16	CTLA-4/CD152	D 21, 22	NKp30/NCR3	F 23, 24	mouse-IgG ₃
B 17, 18	DCIR/CLEC-4a	D 23, 24	NKp44/NCR2	G 1, 2	*PY-Kontrolle
B 19, 20	Dectin-1/CLEC-7a	E 1, 2	NKp46/NCR1	G 3, 4	**Bt-Kontrolle
C 1, 2	DNAM-1	E 3, 4	NKp80/KLRP1	G 5, 6	rat-IgG ₁
C 3, 4	FcεRII/CD23	E 5, 6	NTB-A/SLAMF6	G 7, 8	rat-IgG _{2a}
C 5, 6	FcγRIIa	E 7, 8	PD-1	G 9, 10	rat-IgG _{2b}
C 7, 8	FcγRIIIa/b	E 9, 10	PECAM/CD31	G 11, 12	PBS
C 9, 10	FcRH1/IRTA5	E 11, 12	SHIP-1		

*PY= Phospho-Tyrosin Positivkontrolle

**Bt= Biotinylierte Kontrolle

Unterschiedliche Regulierung in TGF-β1- und GDF-15-behandelten PBL

Gegenüber der Kontrolle schwächeres Signal

3.4.3 GDF-15- und TGF- β 1-abhängige Genregulation in Immunzellen

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten auto- und parakrine Eigenschaften von GDF-15 untersucht sowie einige GDF-15-abhängige Signaltransduktionsmechanismen analysiert wurden, sollte sich der folgende Abschnitt mit der GDF-15-abhängigen Genexpression in Immunzellen befassen.

Dafür wurden wie in Abschnitt 2.2.5.9 und 10 beschrieben NK- und CD8⁺-T-Zellen von sechs gesunden Donoren isoliert, mit IL-2 vorstimuliert und 6 bzw. 24 h lang mit rhGDF-15 (50 ng/ml) (NK-Zellen) und 24 h lang mit rhTGF- β 1 (5 ng/ml) (NK- und CD8⁺-T-Zellen) behandelt. Nach Stimulation wurden Aliquots zur Qualitäts- und Funktionalitätskontrolle entnommen, die Immunzellen der Donoren pelletiert und in stabilisierendem PrepProtect gepoolt. Die anschließende RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, CHIP-Hybridisierung auf „Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays“ sowie die Genexpressionsmessung und -analyse wurden von der Firma Miltenyi durchgeführt.

Der Gesamtüberblick der nicht regulierten sowie der hoch- bzw. herunterregulierten Gene durch TGF- β 1 und GDF-15 in NK-Zellen zeigte, dass in der TGF- β -behandelten Gruppe deutlich mehr Gene nach 24 h reguliert wurden als in der GDF-15-behandelten Gruppe. Dabei waren durch TGF- β 1 in CD8⁺-T-Zellen deutlich weniger Gene reguliert als in NK-Zellen zum gleichen Zeitpunkt. Nach 6 h GDF-15-Behandlung waren nur sehr wenig Gene überhaupt reguliert (Abb. 89: GDF-15- bzw. TGF- β 1-abhängige Genregulation in NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen).

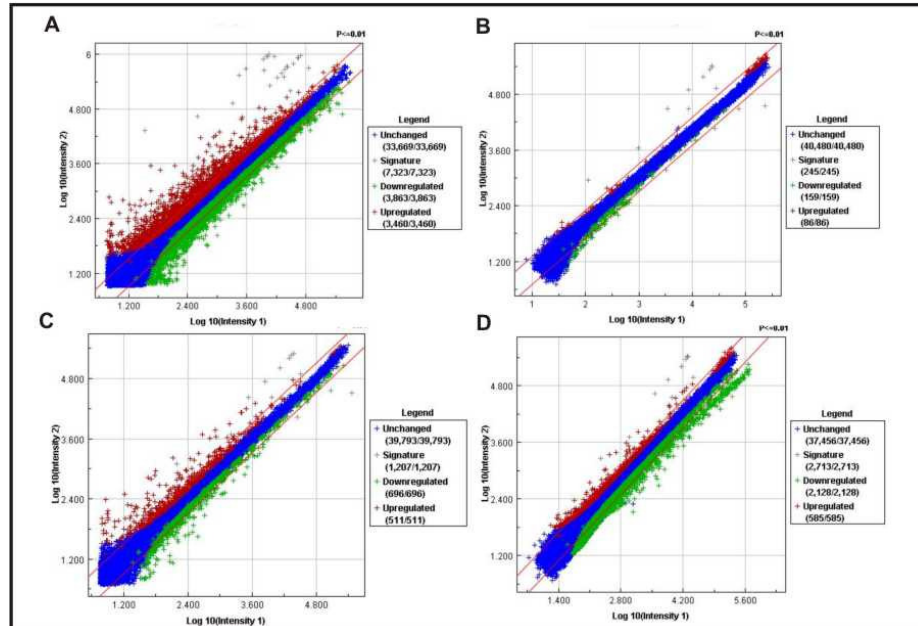


Abb. 89: GDF-15- bzw. TGF- β 1-abhängige Genregulation in NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen. Gesamtüberblick über die in NK-Zellen (A) bzw. in CD8⁺-T-Zellen (C) durch TGF- β 1 nach 24 h und in NK-Zellen durch GDF-15 nach 6 h (B) und nach 24 h (D) Behandlungsdauer regulierten Gene bzgl. unbehandelten NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen (blau= nicht reguliert, rot=hochreguliert, grün=herunterreguliert).

Die Gene, die durch TGF- β 1 bzw. GDF-15 im Vergleich zur Kontrolle um mehr als 200fach hoch- bzw. herunterreguliert wurden („fold change“) und dabei einen p-Wert $< 0,05$ aufwiesen wurden genauer

analysiert. Die interessantesten Gene in Bezug auf Immunregulation sind im folgenden Abschnitt zusammengefasst. Die vollständigen Daten der Microarray Analyse werden in „Gene Expression Omnibus“ (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) eingestellt und damit frei zugänglich gemacht.

3.4.3.1 Induzierte Genexpression

3.4.3.1.1 TGF- β 1-induzierte Genexpression in NK- und CD8⁺-T-Zellen

NK-Zellen

Das Gen, das durch TGF- β 1 in NK-Zellen nach 24 h Behandlung am stärksten hochreguliert war, war der IL-1R Typ II. Dieser bindet die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β . In der Gruppe der Wachstumsfaktoren, Zytokine und deren Rezeptoren waren auffallend viele Chemokinrezeptoren hochreguliert (CCR3, 8, 10, CXCR3, 4, CSF3R). Aus der Gruppe der Interleukinrezeptoren waren neben IL-1RII auch IL-22Ra2 und IL-9R hochreguliert. Ebenso waren BMP-Rezeptoren (BMPR1a, BMPR2) aus der TGF- β -Superfamilie induziert.

TGF- β 1 regulierte die Expression seiner Isoform TGF- β 2 in NK-Zellen hoch, nicht jedoch die Expression der Isoform TGF- β 3. Aus der TGF- β -Superfamilie waren neben TGF- β 2 auch BMP8a und Inhibin- β e induziert. Daneben waren der „*insulin-like growth-factor*“ (IGF), das IGF „*binding protein*“ 2, der „*fibroblast growth factor*“ (FGF) 16 und das assoziierte Protein FGFBP2 sowie Mitglieder der TNF- bzw. TNFR-Familie stark induziert (Tab. 36: Durch TGF- β 1 induzierte Wachstumsfaktoren, Zytokine und deren Rezeptoren).

Tab. 36: Durch TGF- β 1 induzierte Wachstumsfaktoren, Zytokine und deren Rezeptoren.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
IL1R2	Homo sapiens interleukin 1 receptor, type II (IL1R2), transcript variant 1, mRNA.	2.753.260	6,24E-11
IGFBP2	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa (IGFBP2), mRNA.	1.765.483	4,59E-16
IGF2BP1	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 (IGF2BP1), mRNA.	1.119.368	0
CXCR4	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 1, mRNA.	672.859	0
FGF16	Homo sapiens fibroblast growth factor 16 (FGF16), mRNA.	611.292	1,03E-05
TGFB2	Homo sapiens transforming growth factor, beta 2 (TGFB2), mRNA.	559.769	8,70E-06
CD9	Homo sapiens CD9 molecule (CD9), mRNA.	514.239	3,29E-10
CCR3	Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 3 (CCR3), transcript variant 1, mRNA.	480.221	1,35E-09
BMP8A	Homo sapiens bone morphogenetic protein 8a (BMP8A), mRNA.	440.761	0.00004
FGFBP2	Homo sapiens fibroblast growth factor binding protein 2 (FGFBP2), mRNA.	426.627	9,06E-09
CXCR3	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3), mRNA.	389.996	5,90E-08
ENST00000382790	Homo sapiens mRNA for tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a precursor variant protein. [AB209762]	368.860	3,50E-02

IL22RA2	Homo sapiens interleukin 22 receptor, alpha 2 (IL22RA2), transcript variant 1, mRNA.	363.827	2,29E-02
TNFSF4	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa) (TNFSF4), mRNA.	331.821	5,04E-06
IL9R	Homo sapiens interleukin 9 receptor (IL9R), transcript variant 2, mRNA.	329.414	2,92E-06
CCR10	Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 10 (CCR10), mRNA.	316.703	1,49E-05
U94902	Human soluble CD44 (CD44) mRNA, with exon v9 extension, partial cds. [U94902]	312.613	0.00015
C1QTNF6	Homo sapiens C1q and tumor necrosis factor related protein 6 (C1QTNF6), transcript variant 1, mRNA.	298.391	1,06E-04
CR1	Homo sapiens complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group) (CR1), transcript variant S, mRNA.	270.059	2,94E-02
CD6	Homo sapiens CD6 molecule (CD6), mRNA.	268.296	4,22E-04
BMPR1A	Homo sapiens bone morphogenetic protein receptor, type IA (BMPR1A), mRNA.	262.589	0.00027
TNFRSF11A	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator (TNFRSF11A), mRNA.	261.237	0.00044
CD96	Homo sapiens CD96 molecule (CD96), transcript variant 1, mRNA.	252.374	1,99E-03
INHBE	Homo sapiens inhibin, beta E (INHBE), mRNA.	251.026	9,95E-03
CCR8	Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 8 (CCR8), mRNA.	240.939	0.00017
AJ245002	Homo sapiens mRNA for immunoglobulin mu heavy chain variable region, partial, clone 2-C89. [AJ245002]	227.236	0.00602
TNFAIP3	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), mRNA.	224.929	3,92E-02
HBG1	Homo sapiens hemoglobin, gamma A (HBG1), mRNA.	217.690	6,17E-07
BMPR2	Homo sapiens bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase) (BMPR2), mRNA.	204.691	0.00332
CSF3R	Homo sapiens colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte) (CSF3R), transcript variant 4, mRNA.	202.136	0.00357

Weitere induzierte Gene, die immunregulatorische Eigenschaften aufweisen, waren NLRP1, das als Inflammasomkomponente bei der Aktivierung von IL-1 β und IL-18 beteiligt ist, sowie Caspase-12, die Caspase-1 bei der Aktivierung und Sekretion dieser Zytokine inhibiert (Franchi et al., 2009; Scott and Saleh, 2007).

Durch TGF- β 1 war zudem die Expression vieler Kalzium-assoziiierter Proteine wie Kalziumkanalproteine und kalziumabhängige Enzyme induziert (Tab. 37: Durch TGF- β 1 induzierte Expression von Kalzium-assoziierten Proteinen).

Tab. 37: Durch TGF- β 1 induzierte Expression von Kalzium-assoziierten Proteinen.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
CACNA1H	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit (CACNA1H), transcript variant 1, mRNA.	443.870	4,37E-09
S100A5	Homo sapiens S100 calcium binding protein A5 (S100A5), mRNA.	395.696	5,21E-08
CAMTA1	Homo sapiens calmodulin binding transcription activator 1 (CAMTA1), mRNA.	348.012	6,57E-03
CAMKK2	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta (CAMKK2), transcript variant 6, mRNA.	290.613	5,59E-05
CAMKK1	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha (CAMKK1), transcript variant 1, mRNA.	275.886	1,12E-02

CASK	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family) (CASK), mRNA.	262.725	0.00004
CACNA1C	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (CACNA1C), mRNA.	229.225	2,43E-02

Von TGF- β 1 sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Eigenschaften bekannt. Seine apoptotische Wirkung ist stark abhängig vom zellulären Kontext (Huang et al., 2000; Schuster et al., 2002; Wildey et al., 2003). Daher war besonders die Induktion von pro- und anti-apoptotischen Genen durch TGF- β 1 in Immunzellen interessant (Tab. 38: Durch TGF- β 1 induzierte Expression Apoptose-assoziiierter Gene).

Tab. 38: Durch TGF- β 1 induzierte Expression Apoptose-assoziiierter Gene.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
APOC1**	Homo sapiens apolipoprotein C-I (APOC1), mRNA.	404.694	9,81E-08
BMF*	Homo sapiens Bcl2 modifying factor (BMF), transcript variant 1, mRNA.	345.637	4,51E-06
PERP*	Homo sapiens PERP, TP53 apoptosis effector (PERP), mRNA.	259.489	5,25E-03
BCOR*	Homo sapiens BCL6 co-repressor (BCOR), transcript variant 2, mRNA.	243.870	7,99E-03
BCL6**	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51) (BCL6), transcript variant 2, mRNA [NM_138931]	229.000	2,51E-02

*pro-apoptotisch, **anti-apoptotisch

TGF- β 1 regulierte in NK-Zellen die Expression der MAPK1 sowie der MAPK-phosphorylierenden Kinasen MAPKK6 und MAPKKKK3 hoch.

Auch die Expression der Matrix-Metalloproteinasen ADAM28 und ADAMTSL-5 waren durch TGF- β 1 hochreguliert. MMPs degradieren die ECM, was in diesem Zusammenhang besonders bei der Tumormetastasierung und -invasion eine pro-tumorigene Rolle spielt.

Weitere induzierte Gene, die an der Regulation von Immunreaktionen beteiligt sein können, waren der Vitamin D-Rezeptor und Cathelicidin, die neben anderen Funktionen auch in immunregulatorischen Prozessen involviert sein können (Dombrowski et al., 2010).

Durch TGF- β 1 auf NK-Zellen hochregulierte Oberflächenmoleküle waren neben CD6, ein Scavenger-Rezeptor, der CD166 bindet, das Tetraspanin CD9, das Thrombozyten über Fc γ R1a aktivieren kann und Zell-Zell-Fusionen reguliert, und daher v.a. bei der Virusinfektion eine Rolle spielt (Singethan and Schneider-Schaulies, 2008). CD44, das Zelladhäsion vermittelt, der CD155-bindende Rezeptor CD96 (Fuchs et al., 2004; Jalkanen and Jalkanen, 1992) und Integrine waren ebenfalls induziert. Auch der Fc γ R1b war expressionell hochreguliert. Der Fc γ R1a, der durch TGF- β 1 im Phospho-Immunorezeptor-Array (Abschnitt 3.4.2.2) aktiviert war, war hier nicht induziert.

CD8⁺-T-Zellen

In CD8⁺-T-Zellen wurden generell weniger Gene durch TGF- β 1 aktiviert als unter gleichen Bedingungen in NK-Zellen.

Das durch TGF- β 1 am stärksten induzierte Gen in CD8⁺-T-Zellen war IL-2, das T- und NK-Zellen aktiviert. Weitere induzierte Zytokine und Chemokine bzw. deren Rezeptoren waren CCL20, PDGF β , CXCR3, das TNF-Familienmitglied TNFSF13b und IL-13R1. Daneben waren CD1e (MHC-ähnlicher Oberflächenrezeptor, der Lipid- bzw. Glycolipid-Antigene präsentiert) und die Komplementkomponente C3 induziert.

Wie bei NK-Zellen waren Gene des Fettstoffwechsels induziert (APO-BE, APO-C1) sowie SMURF2, das bei der SMAD-Signaltransduktion eine Rolle spielt und der Vitamin D-Rezeptor (VDR) (Tab. 39: Durch TGF- β 1 induzierte Gene in CD8⁺-T-Zellen).

Tab. 39: Durch TGF- β 1 induzierte Gene in CD8⁺-T-Zellen.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
IL2	Homo sapiens interleukin 2 (IL2), mRNA.	1.614.945	2,34E-08
CD1E	Homo sapiens CD1e molecule (CD1E), transcript variant 1, mRNA.	706.051	1,77E-03
CCL20	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20), mRNA.	558.347	6,48E-06
JUN*	Homo sapiens jun oncogene (JUN), mRNA.	484.962	2,94E-39
APOBEC3H*	Homo sapiens apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3H (APOBEC3H), mRNA.	473.422	3,63E-09
APOC1*	Homo sapiens apolipoprotein C-I (APOC1), mRNA.	389.488	1,25E-05
PTK2	Homo sapiens PTK2 protein tyrosine kinase 2 (PTK2), transcript variant 1, mRNA.	281.610	5,62E-15
SMURF2*	Homo sapiens SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (SMURF2), mRNA.	279.167	1,31E-03
VDR*	Homo sapiens vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor (VDR), transcript variant 2, mRNA.	277.931	1,64E-14
PDGFB	Homo sapiens platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog) (PDGFB), transcript variant 1, mRNA.	268.583	0.00001
C3	Homo sapiens complement component 3 (C3), mRNA.	258.929	5,37E-03
SMAD7	Homo sapiens SMAD family member 7 (SMAD7), mRNA.	242.617	1,25E-02
TNFSF13B	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b (TNFSF13B), mRNA.	235.444	1,39E-02
SKI*	Homo sapiens v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian) (SKI), mRNA.	232.855	0.00679
CAMSAP1L1	Homo sapiens calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1 (CAMSAP1L1), mRNA.	225.784	0.00031
CXCR3*	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3), mRNA.	225.706	3,54E-02
IL13RA1	Homo sapiens interleukin 13 receptor, alpha 1 (IL13RA1), mRNA.	213.454	0.00017

*Induktion in NK- und CD8⁺-T-Zellen

Gene, die durch TGF- β 1 in NK- und CD8⁺-T-Zellen gleichermaßen induziert wurden, waren APOC1, CXCR3, JUN, ITGA1, SKI, SMURF2 und der VDR.

3.4.3.1.2 GDF-15-induzierte Genexpression in NK-Zellen nach 6 und 24 h Inkubation

Gen-Induktion nach 6 h

Wie in Abb. 89 zu sehen ist, waren nach 6 h Inkubation mit GDF-15 nur wenige Gene induziert (Tab. 40). Immunologisch relevant war Hämoglobin β , welches bereits nach 6 h GDF-15-Behandlung in NK-Zellen induziert wurde und auch nach 24 h noch induziert war. Daneben waren Claudin18, ein Bestandteil von „tight junctions“, und ein Leukotrien-Rezeptor induziert.

Tab. 40: Durch GDF-15 induzierte Gene in NK-Zellen nach 6 h Inkubation.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
ANKRD1	Homo sapiens ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) (ANKRD1), mRNA	294.688	0.00001
HBB	Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB), mRNA	233.265	7,07E-09
CLDN18	Homo sapiens claudin 18 (CLDN18), transcript variant 1, mRNA	224.630	0.00932
CYSLTR2	Homo sapiens cysteinyl leukotriene receptor 2 (CYSLTR2), mRNA	205.458	0.00174

Gen-Induktion nach 24 h

Das durch GDF-15 nach 24 h Behandlung in NK-Zellen am stärksten induzierte Gen war das co-stimulatorische Molekül CD86 (auch bekannt als B7.2), der Ligand von CD28 und CTLA-4 (Ellis et al., 1996; Janeway et al. Immunologie, 5.Aufl. 2002). Daneben waren die Chemokine „colony stimulating factor 1“ (CSF), CXCL2 und CCL17 induziert. Auch HLA-G, ein nicht klassisches MHC-Molekül und Ligand von KIR2DL4, wurde durch GDF-15 hochreguliert. Weitere interessante Gene, die von GDF-15 in NK-Zellen reguliert wurden, waren der Proteinkinaseinhibitor PKIB und Siglec-11 (Tab. 41: Durch GDF-15 induzierte immunrelevante Gene).

Tab. 41: Durch GDF-15 induzierte immunrelevante Gene.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
CD86	Homo sapiens CD86 molecule (CD86), transcript variant 2, mRNA [NM_006889]	403.808	8,16E-06
SIGLEC11	Homo sapiens sialic acid binding Ig-like lectin 11 (SIGLEC11), mRNA [NM_052884]	361.395	0.00002
PKIB	Homo sapiens protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta (PKIB), transcript variant 1, mRNA [NM_181795]	248.663	0.00377
CSF1	Homo sapiens colony stimulating factor 1 (macrophage) (CSF1), transcript variant 4, mRNA [NM_172212]	227.216	0.00469
HLA-G	Homo sapiens HLA-G histocompatibility antigen, class I, G (HLA-G), mRNA [NM_002127]	224.726	3,96E-02
CXCL2	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), mRNA [NM_002089]	223.516	0.00416

CCL17	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 17 (CCL17), mRNA [NM_002987]	217.197	0.00018
ENST00000381298	IL6B_HUMAN (P40189) Interleukin-6 receptor beta chain precursor (IL-6R-beta) (Interleukin 6 signal transducer) (Membrane glycoprotein 130) (gp130) (Oncostatin M receptor) (CDw130) (CD130 antigen), partial (27%) [THC2315176]	211.607	0.00036
HBB	Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB), mRNA [NM_000518]	205.124	7,01E-03

3.4.3.2 Inhibition der Genexpression

3.4.3.2.1 TGF- β 1-abhängige Inhibition der Genexpression in NK- und CD8⁺-T-Zellen

NK-Zellen

Zu den am stärksten durch TGF- β 1 in NK-Zellen herunterregulierten Gene zählten Integrin- α d, das Chemokin CXCL11, IFN- γ und Lymphotoxin B.

In NK-Zellen war unter TGF- β 1-Einfluss die Expression des NKG2D-Liganden ULBP2 und des KIR-Rezeptors KIR2DI5a herunterreguliert. Zusammen mit der Herunterregulation von Granulysin, Granzym A und Granzym B, welches auch auf Proteinebene durch TGF- β 1 tendenziell herunterreguliert war (Abschnitt 3.3.4.2.1), führte dies zur Inhibition der lytischen Aktivität der NK-Zellen.

Viele Zytokine und Rezeptoren aus der TNF-Familie waren durch TGF- β 1 in NK-Zellen herunterreguliert, so z.B. TNF- α selbst, Lymphotoxin A und B, TNFSF11 und TNFRSF4. Daneben waren Chemokine wie CCL18, CXCL10 oder CCL1 und Chemokinrezeptoren herunterreguliert. Mit IFN- γ war durch TGF- β 1 zudem die Expression eines wichtigen Immunmediators herunterreguliert (Tab. 42).

Tab. 42: Durch TGF- β 1 herunterregulierte Zytokine und Chemokine und deren Rezeptoren.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
LIF	Homo sapiens leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) (LIF), mRNA.	-203.020	0.00001
CXCL10	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10), mRNA.	-236.771	1,37E-02
TNFRSF18	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18 (TNFRSF18), transcript variant 2, mRNA.	-237.361	9,69E-03
TNF	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF), mRNA.	-238.813	1,42E-09
CCL3L3	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3 (CCL3L3), mRNA.	-264.956	5,72E-04
FGF9	Homo sapiens fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor) (FGF9), mRNA.	-267.939	0.00003
XCCL2*	Homo sapiens chemokine (C motif) ligand 2 (XCCL2), mRNA.	-271.766	3,00E-04
CCL18	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated) (CCL18), mRNA.	-273.682	1,27E-03

TNF*	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF), mRNA.	-290.577	5,63E-05
CCL23	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 23 (CCL23), transcript variant CKbeta8-1, mRNA.	-308.814	1,28E-05
IL8RA	Homo sapiens interleukin 8 receptor, alpha (IL8RA), mRNA.	-323.444	5,18E-03
CCL3	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3), mRNA.	-328.202	2,91E-06
CXCL9	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9), mRNA.	-333.135	2,89E-06
LTA	Homo sapiens lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1) (LTA), mRNA.	-339.139	2,04E-06
CX3CR1*	Homo sapiens chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (CX3CR1), mRNA.	-342.100	1,10E-06
IL2RA*	Homo sapiens interleukin 2 receptor, alpha (IL2RA), mRNA.	-348.275	7,74E-07
CSF2*	Homo sapiens colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) (CSF2), mRNA.	-357.127	4,12E-07
TNFRSF4	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4 (TNFRSF4), mRNA.	-377.825	1,33E-07
CCL1*	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 1 (CCL1), mRNA.	-437.365	5,54E-09
CCL23*	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 23 (CCL23), transcript variant CKbeta8-1, mRNA.	-523.072	3,25E-04
IFNG	Homo sapiens interferon, gamma (IFNG), mRNA.	-541.532	0
IL12RB2	Homo sapiens interleukin 12 receptor, beta 2 (IL12RB2), mRNA.	-554.110	1,30E-10
CCR2	Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2), transcript variant A, mRNA.	-634.859	0.00003
LTB	Homo sapiens lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) (LTB), transcript variant 1, mRNA.	-737.782	1,07E-12
TNFSF11	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (TNFSF11), transcript variant 1, mRNA.	-844.164	8,96E-10
CXCL11	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11), mRNA.	-990.011	8,73E-04

* in NK- und CD8⁺-T-Zellen herunterreguliert

Durch TGF- β 1 waren auch einige Apoptose-assoziierte Gene herunterreguliert. Wie bei den Apoptose-assoziierten Genen, die durch TGF- β 1 induziert waren (Abschnitt 3.4.3.1.1.1), befanden sich darunter sowohl pro- wie auch anti-apoptotische Faktoren (Tab. 43).

Tab. 43: Durch TGF- β 1 herunterregulierte Apoptose-assoziierte Gene.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
BRCA2*	Homo sapiens breast cancer 2, early onset (BRCA2), mRNA.	-200.648	0.00032
BCL7B**	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 7B (BCL7B), transcript variant 2, mRNA [NM_138707]	-203.575	0.00034
BCL2A1**	Homo sapiens BCL2-related protein A1 (BCL2A1), transcript variant 1, mRNA.	-254.138	1,70E-03
APITD1*	Homo sapiens apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1 (APITD1), transcript variant B, mRNA.	-270.007	5,37E-04

*pro-apoptotisch, **anti-apoptotisch

TGF- β 1 regulierte die Expression der Oberflächenmoleküle CD36, CD38, CD55 (der „decay accelerating factor“, der dem Komplementsystem angehört und Konvertasen inhibiert), CD74 (MHC-II

„invariant chain“), CD274 (B7-H1), LAIR-2 und ICAM-1 und ICAM-2 herunter. Auch der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, dem eine Rolle bei der GranB-vermittelten Lyse zugesprochen wird (Motyka et al., 2000), wurde herunterreguliert (Tab. 44).

Tab. 44: Durch TGF- β 1 herunterregulierte Oberflächenmoleküle.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
CD36	CD36=collagen type I/thrombospondin receptor [human, mRNA Partial, 369 nt]. [S67044]	-202.983	0.00041
CD63	Homo sapiens CD63 molecule (CD63), transcript variant 1, mRNA.	-223.513	4,56E-02
FCRL3*	Homo sapiens Fc receptor-like 3 (FCRL3), mRNA.	-244.791	4,47E-03
CD274	Homo sapiens CD274 molecule (CD274), mRNA.	-250.783	2,52E-02
CD55	Homo sapiens CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group) (CD55), transcript variant 1, mRNA.	-252.776	1,05E-02
CD74	Homo sapiens CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain (CD74), transcript variant 2, mRNA.	-272.746	3,75E-04
CD38	Homo sapiens CD38 molecule (CD38), mRNA.	-319.567	1,32E-05
CD300A*	Homo sapiens CD300a molecule (CD300A), mRNA.	-358.209	3,85E-07
ICAM1	Homo sapiens intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor (ICAM1), mRNA.	-398.272	2,59E-29
CD300C	Homo sapiens CD300c molecule (CD300C), mRNA.	-431.309	2,86E-08
LAIR2*	Homo sapiens leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2 (LAIR2), transcript variant 1, mRNA.	-439.487	5,18E-09
CADM1	Homo sapiens cell adhesion molecule 1 (CADM1), transcript variant 1, mRNA.	-502.453	2,08E-03

* in NK- und CD8⁺-T-Zellen herunterreguliert

Außerdem waren die MAPK13, MAPKKK8, STAT1, welches auf Proteinebene durch TGF- β 1 in Immunzellen unbeeinflusst blieb (Abschnitt 3.4.2.1), STYK, TIE1 und die MMPs 1 und 12 herunterreguliert.

CD8⁺-T-Zellen

In CD8⁺-T-Zellen war das durch TGF- β 1 am stärksten herunterregulierte Gen LAIR-2 (CD306), welches auch in NK-Zellen durch TGF- β 1 herunterreguliert und im Phospho-Immunorezeptor Array nicht aktiviert war. LAIR-2 ist ein löslicher Rezeptor, der an Kollagenmoleküle binden kann. Er fungiert als natürlicher Kompetitor zu dem nah verwandten inhibitorischen Rezeptor LAIR-1 (CD305) und wirkt damit immunregulierend (Lebbink et al., 2006; Lebbink et al., 2008).

In Abschnitt 3.3.4.2.1 wurde die Regulation von Perforin und Granzym auf Proteinebene bestimmt. Während Perforin unbeeinflusst durch TGF- β 1 blieb, war Granzym B durch TGF- β 1 auf Proteinebene herunterreguliert. Auch die Genexpression von Perforin und Granulysin war durch TGF- β 1 in CD8⁺-T-Zellen herunterreguliert, was die Lyse-Fähigkeit der CD8⁺-T-Zellen stark einschränkt. Jedoch waren

die p-Werte mit 0,3 (Perforin) und 0,09 (Granulysin) außerhalb der gewählten Signifikanzgrenze ($p < 0,05$).

Der „*natural cytotoxicity triggering receptor*“ 3 (NCR3), auch bekannt als NKp30, war nicht nur als Protein, sondern auch auf Genebene durch TGF- β 1 herunterreguliert. Das Oberflächenmolekül CD300a, ein inhibierender Rezeptor (Alvarez et al., 2008), sowie das HLA-Molekül HLA-DQA1 waren durch TGF- β 1 ebenfalls inhibiert.

In der Gruppe der Zytokine und Chemokine war v.a. die Expression pro-inflammatorischer Zytokine gehemmt (Tab. 45), so z.B. der „*colony stimulating factor*“ 2, IL-1 β , IL-8 und TNF α sowie CXCL2, CCL1 und CCL23. Die Zytokin- bzw. Chemokinrezeptoren CX3CR1, IL2Ra, IFN α R2, TNFRSF9 und TGF β R3 waren durch TGF- β 1 in CD8⁺-T-Zellen herunterreguliert. Außerdem war die Genexpression von IL-13, einem anti-inflammatorischen T_H2-Zytokin, gehemmt.

Die Herunterregulation der Genexpression dieser wichtigen immunregulatorischen Faktoren kann zur Inhibition der CD8⁺-T-Zell-Zytotoxizität durch TGF- β 1 beitragen.

Tab. 45: Durch TGF- β 1 herunterregulierte Zytokine, Chemokine und deren Rezeptoren.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
SLAMF7*	Homo sapiens SLAM family member 7 (SLAMF7), mRNA.	-227.628	2,86E-02
TNF*	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF), mRNA.	-227.840	3,26E-02
HBD	Homo sapiens hemoglobin, delta (HBD), mRNA.	-229.454	3,12E-02
MMP9	Homo sapiens matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) (MMP9), mRNA.	-229.541	2,07E-08
IL8	Homo sapiens interleukin 8 (IL8), mRNA.	-234.190	0.00085
HBG1	Homo sapiens hemoglobin, gamma A (HBG1), mRNA.	-234.293	5,26E-09
IFNAR2	Homo sapiens interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 (IFNAR2), transcript variant 1, mRNA.	-243.360	0.00414
XCL1*	Homo sapiens chemokine (C motif) ligand 1 (XCL1), mRNA.	-246.722	3,57E-03
CCL23*	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 23 (CCL23), transcript variant CKbeta8-1, mRNA.	-247.727	0.00016
XCL2*	Homo sapiens chemokine (C motif) ligand 2 (XCL2), mRNA.	-252.772	1,93E-03
FCRL3*	Homo sapiens Fc receptor-like 3 (FCRL3), mRNA.	-258.120	5,55E-03
HLA-DQA1	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1, mRNA (cDNA clone MGC:17213 IMAGE:4339446), complete cds. [BC008585]	-274.048	0.00140
IL1B	Homo sapiens interleukin 1, beta (IL1B), mRNA.	-278.721	1,30E-14
NCR3	Homo sapiens natural cytotoxicity triggering receptor 3 (NCR3), mRNA.	-280.640	1,34E-04
TGFBR3	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor III (TGFBR3), mRNA.	-283.351	6,57E-03
TNFRSF9	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 (TNFRSF9), mRNA.	-302.229	0.00002
CD300A*	Homo sapiens CD300a molecule (CD300A), mRNA.	-314.672	8,31E-06
IL2RA*	Homo sapiens interleukin 2 receptor, alpha (IL2RA), mRNA.	-341.121	0.00167
CASP8	Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP8), transcript variant C, mRNA.	-351.825	6,60E-07
CABYR	Homo sapiens calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated (CABYR),	-354.144	0.00380

	transcript variant 1, mRNA.		
HBD	Homo sapiens hemoglobin, delta (HBD), mRNA.	-369.285	2,20E-07
APOL6	Homo sapiens apolipoprotein L, 6 (APOL6), mRNA.	-385.680	8,60E-08
CX3CR1*	Homo sapiens chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (CX3CR1), mRNA.	-395.346	4,49E-08
CSF2*	Homo sapiens colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) (CSF2), mRNA.	-431.458	6,34E-08
CCL1*	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 1 (CCL1), mRNA.	-493.876	1,45E-06
CXCL2	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), mRNA.	-608.694	0.00287
IL13	Homo sapiens interleukin 13 (IL13), mRNA.	-625.799	0.00171
LAIR2*	Homo sapiens leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2 (LAIR2), transcript variant 1, mRNA.	-848.020	2,03E-06

* in NK- und CD8⁺-T-Zellen herunterreguliert

Außerdem war die Expression der Kalzium-assoziierten Proteine S100A4, -A12 und CABYR und des Enzyms Caspase-8, das an der Apoptose-Kaskade beteiligt ist, sowie die der Matrixmetalloproteinase MMP9 herunterreguliert.

Gene, die in NK- und CD8⁺-T-Zellen durch TGF-β1 gleichermaßen herunterreguliert wurden, waren die Chemokine CCL1 und CCL23, XL1 und XL2, der „*colony stimulating factor*“ 2 (CSF 2), TNFα, die Rezeptoren CX3CR1, IL2RA, LAIR-2 sowie FCRL3, SLAMF7 und CD300a.

3.4.3.2.2 GDF-15-abhängige Inhibition der Genexpression in NK-Zellen nach 6 und 24 h Inkubation

Generell waren nach 6 h GDF-15-Behandlung in NK-Zellen nur wenige Gene reguliert, demnach auch nur wenige Gene herunterreguliert (siehe Abb. 92). Dazu zählte als einzig immunrelevantes Gen der Zytokinrezeptor IL-22RA1.

Die nach 24 h GDF-15-Behandlung am stärksten herunterregulierten Gene in NK-Zellen waren u.a. Caspase-8, eine Creatinkinase, das Apolipoprotein 6 und BMP8a aus der TGF-β-Familie. Interessanterweise waren viele Apoptose-assoziierte Proteine mit sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Funktion herunterreguliert (BCL2, BCL2L11, BAX, APAF1, Harakiri, CIDEA).

Neben den Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren BMP8a, IL-19, CX3CL1, GH2 und NGF-β waren als weitere immunspezifische Gene der Fc-Rezeptor für IgA und IgM, HLA-DOB, der Komplementprotein-Rezeptor C5aR1, der FGF-Rezeptor 3 sowie der „*decay-accelerating factor*“ CD55 herunterreguliert.

Unter den Enzymen war die Genexpression von MMP- (MMP 28, 17) und ADAM- (ADAMTS7) Proteinasen herunterreguliert sowie von MAPK8 und von dem MAPK8-interagierenden Protein MAPK8IP3.

Während TGF-β1 die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit dem Kalziummetabolismus stehen, überwiegend induzierte (Tab. 37), regulierte GDF-15 die Expression der Kalzium-assoziierten Gene CAMKK1 und 2, CAMK1D, CACNA1E und -1I herunter (Tab. 46).

Tab. 46: Durch GDF-15 nach 24 h herunterregulierte Gene in NK-Zellen.

Sequence Name(s)	Sequence Description	Fold Change	P-value
MAPK8IP3	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3 (MAPK8IP3), transcript variant 1, mRNA [NM_015133]	-210.824	0.00371
FCAMR	Homo sapiens Fc receptor, IgA, IgM, high affinity (FCAMR), mRNA [NM_032029]	-211.500	0.00002
IL19	Homo sapiens interleukin 19 (IL19), transcript variant 1, mRNA [NM_153758]	-215.967	0.00906
HLA-DOB	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DO beta, mRNA (cDNA clone IMAGE:4565687), complete cds. [BC020226]	-219.303	0.00131
MAPK8	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8), transcript variant 4, mRNA [NM_139047]	-222.247	0.00014
BCL2	Human B-cell leukemia/lymphoma 2 (bcl-2) proto-oncogene mRNA encoding bcl-2-beta protein, complete cds. [M13995]	-225.284	3,76E-02
MMP28	Homo sapiens matrix metalloproteinase 28 (MMP28), transcript variant 1, mRNA [NM_024302]	-228.210	0.00003
ILDR1	Homo sapiens immunoglobulin-like domain containing receptor 1 (ILDR1), mRNA [NM_175924]	-229.554	2,29E-02
FTH1	Homo sapiens ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1), mRNA [NM_002032]	-229.872	2,21E-02
CAMKK1	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha (CAMKK1), transcript variant 1, mRNA [NM_032294]	-230.414	3,08E-02
APAF1	Homo sapiens apoptotic peptidase activating factor (APAF1), transcript variant 3, mRNA [NM_181861]	-231.250	3,43E-02
GH2	Homo sapiens growth hormone 2 (GH2), transcript variant 3, mRNA [NM_022558]	-232.292	1,90E-02
MMP17	Homo sapiens matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted) (MMP17), mRNA [NM_016155]	-232.918	1,58E-02
BCL2L11	Homo sapiens BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) (BCL2L11), transcript variant 2, mRNA [NM_138622]	-235.206	0.00005
CX3CL1	Homo sapiens chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1), mRNA [NM_002996]	-236.708	0.00890
NGFB	Homo sapiens nerve growth factor, beta polypeptide (NGFB), mRNA [NM_002506]	-242.891	0.00219
CAMKK2	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta (CAMKK2), transcript variant 6, mRNA [NM_172215]	-242.962	5,91E-03
RCP9	Homo sapiens calcitonin gene-related peptide-receptor component protein (RCP9), transcript variant 1, mRNA [NM_014478]	-244.204	2,24E-02
HRK	Homo sapiens harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain) (HRK), mRNA [NM_003806]	-244.268	4,61E-03
CARD9	Homo sapiens caspase recruitment domain family, member 9, mRNA (cDNA clone MGC:87491 IMAGE:30343821), complete cds. [BC070091]	-251.874	2,10E-03
ADAMTS7	Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 7 (ADAMTS7), mRNA [NM_014272]	-252.879	1,89E-03
SAMD4A	Homo sapiens mRNA for KIAA1053 protein, partial cds. [AB028976]	-253.007	0.00111

APOL6	Homo sapiens apolipoprotein L, 6 (APOL6), mRNA [NM_030641]	-257.937	3,04E-03
CAMK1D	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID (CAMK1D), transcript variant 1, mRNA [NM_020397]	-258.657	1,70E-03
BAX	Homo sapiens BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant delta, mRNA [NM_138763]	-268.069	4,25E-04
PCSK1N	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor (PCSK1N), mRNA [NM_013271]	-271.206	3,24E-04
BCL9	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 9 (BCL9), mRNA [NM_004326]	-272.306	0.00640
SCARF2	Homo sapiens scavenger receptor class F, member 2 (SCARF2), transcript variant 1, mRNA [NM_153334]	-280.010	1,41E-04
CD55	Homo sapiens decay-accelerating factor 4ab mRNA, partial cds, alternatively spliced. [AY055760]	-281.133	0.00174
C5AR1	Homo sapiens complement component 5a receptor 1 (C5AR1), mRNA [NM_001736]	-281.213	0.00235
FGFR3	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism) (FGFR3), transcript variant 1, mRNA [NM_000142]	-281.452	0.00077
FCRLM2	Homo sapiens Fc receptor-like and mucin-like 2, mRNA (cDNA clone MGC:71141 IMAGE:3529386), complete cds. [BC067080]	-281.788	1,20E-04
NBEAL2	Homo sapiens cDNA FLJ35552 fis, clone SPLEN2004346. [AK092871]	-283.535	0.00037
CIDEA	Homo sapiens cell death-inducing DFFA-like effector a (CIDEA), transcript variant 2, mRNA [NM_198289]	-284.677	0.00080
CACNA1E	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, alpha 1E subunit (CACNA1E), mRNA [NM_000721]	-289.853	5,96E-05
IGSF4B	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 4B (IGSF4B), mRNA [NM_021189]	-297.566	4,15E-05
MAN1B1	Homo sapiens mannosidase, alpha, class 1B, member 1 (MAN1B1), mRNA [NM_016219]	-300.025	4,89E-05
KLK3	Homo sapiens prostate-specific antigen variant 2 mRNA, complete cds, alternatively spliced. [AF335478]	-308.816	1,25E-05
KISS1R	Homo sapiens KISS1 receptor (KISS1R), mRNA [NM_032551]	-314.276	8,20E-06
ADAMDEC1	Homo sapiens ADAM-like, decysin 1 (ADAMDEC1), mRNA [NM_014479]	-316.230	0.00014
BMP8A	Homo sapiens bone morphogenetic protein 8a (BMP8A), mRNA [NM_181809]	-332.409	2,15E-06
ENST0000381826	Homo sapiens mRNA for alternative form of GDNF; HFK4. [AJ001898]	-333.563	1,99E-06
IFITM5	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 5 (IFITM5), mRNA [NM_001025295]	-351.583	5,87E-07
PRR7	Homo sapiens proline rich 7 (synaptic) (PRR7), mRNA [NM_030567]	-352.712	5,46E-07
WNT6	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 6 (WNT6), mRNA [NM_006522]	-353.698	5,12E-07
PARP10	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10 (PARP10), mRNA [NM_032789]	-355.176	4,66E-07

CACNA1I	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, alpha 1I subunit (CACNA1I), transcript variant 1, mRNA [NM_021096]	-355.658	4,52E-07
PRR5	Homo sapiens proline rich 5 (renal) (PRR5), transcript variant 2, mRNA [NM_015366]	-358.414	3,79E-07
DRD4	Homo sapiens dopamine receptor D4 (DRD4), mRNA [NM_000797]	-361.959	3,04E-07
BBC3	Homo sapiens BCL2 binding component 3 (BBC3), mRNA [NM_014417]	-419.149	1,30E-08
APOL6	Homo sapiens apolipoprotein L, 6 (APOL6), mRNA [NM_030641]	-496.018	5,03E-10
CKB	Homo sapiens creatine kinase, brain (CKB), mRNA [NM_001823]	-553.748	7,40E-11
CASP8	Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP8), transcript variant C, mRNA [NM_033356]	-944.715	6,19E-14

Nur wenige Gene waren durch GDF-15 und TGF- β 1 in NK-Zellen gleichermaßen reguliert. Interessanterweise zeigte sich überwiegend eine gegensätzliche Regulation der Genexpression unter GDF-15- und TGF- β 1-Einfluss (Tab. 47).

Zu den wenigen Genen, die durch GDF-15 und TGF- β 1 gleichermaßen reguliert waren, zählten CD55, Caspase-8 und das Apolipoprotein 6, die in NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen herunterreguliert waren.

Durch TGF- β 1 und GDF-15 unterschiedlich regulierte Gene waren überwiegend Chemokine und Wachstumsfaktoren. BMP8a, das mit TGF- β 1 und GDF-15 verwandt ist, war durch TGF- β 1 induziert, durch GDF-15 jedoch herunterreguliert. CXCL2 hingegen war unter GDF-15-Einfluss induziert, während TGF- β 1 seine Expression inhibierte. Gene, die in Zusammenhang mit Kalziummetabolismus und -transport stehen, wurden durch TGF- β 1 überwiegend induziert, während GDF-15 diese herunterregulierte (z.B. CAMKK1 und 2).

Tab. 47: Unterschiedliche bzw. gleichartige Regulation der gleichen Gene durch GDF-15 und TGF- β 1 in NK-Zellen.

Gen	GDF-15	TGF- β 1
IL-22RA2	↓	↑
BMP8a	↓	↑
Hämoglobin	↓ (B)	↑ (γ A)
CSF	↑ (1)	↓ (2)
CXCL2	↑	↓*
CD55	↓	↓
MAPK	↓ (8)	↓ (13)*
MMP	↓ (17, 28)	↓ (9)*
Caspase-8	↓	↓*
APOL6	↓	↓*

* in CD8⁺-T-Zellen

Während im Abschnitt 3.3 eine überwiegend ähnliche Wirkung von TGF- β 1 und GDF-15 auf Immunzellen zu beobachten war, zeigte sich bei der Untersuchung der Genexpression der Immunzellen ein verschiedenartiges Regulationsmuster.

3.4.3.3 „Pathway Analyse“ der TGF- β 1- und GDF-15-regulierten Gene

Im vorherigen Abschnitt wurden immunrelevante Gene, die durch GDF-15 und TGF- β 1 in NK- bzw. CD8⁺-T-Zellen reguliert wurden, aufgeführt. Die Frage, in welche zellulären Prozesse diese regulierten Gene eingebunden sind, sollte im Folgenden untersucht werden.

Um einen Einblick in die Funktion der regulierten Gene zu erhalten und mögliche Interaktionsnetzwerke, an denen diese Gene beteiligt sein könnten, aufzudecken, wurden diese mit Hilfe von „*Genome Expression Pathway Analysis Tool*“ (GEPAT), das von Prof. J. Schultz und seinen Mitarbeitern vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg entwickelt wurde, analysiert.

Obwohl Microarrays mittlerweile zum Standard der Genexpressionsanalyse gehören, ist es schwierig, die riesigen Datenmengen, die aus diesen Analysen hervorgehen, in funktionale Gruppen zu gliedern. GEPAT bietet die Möglichkeit, interessante exprimierte Gene in zelluläre Signal- und Regulationsnetzwerke einzugliedern und damit einen Überblick über funktional regulierte Gen-Cluster zu bekommen.

Zur „Pathway Analyse“ wurden die Microarray-Datensätze in GEPAT eingelesen, so dass diese anschließend online unter <http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT> analysiert werden konnten. Dargestellt ist die Auswertung der „Pathway Analyse“ mit besonderem Augenmerk auf immunrelevante Signalwege. Im Anhang 5.4 ist die komplette „Pathway Analyse“ der beteiligten Signalwege aufgeführt.

In NK-Zellen sind durch TGF- β 1 nach 24 h Behandlung Gene reguliert, die in verschiedenen Signalwegen konzentriert sind, u.a. im MAPK- (Abb. 90), WNT-, TGF- β - und Kalzium-Signalweg. Viele der regulierten Gene finden sich auch bei Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktionen (Abb. 91), bei der Apoptose und dem Zellzyklus (Abb. 92) wieder (Tab. 48: „Pathway Analyse“ NK-Zellen: TGF- β 1).

Tab. 48: „Pathway Analyse“ NK-Zellen: TGF- β 1.

Pathway	Regulierte Enzyme
MAPK Signaling	30
Cytokine-cytokine receptor interaction	21
Cell cycle	16
WNT signaling	16
Apoptosis	15
Neuroactive ligand-receptor interaction	14
Cell adhesion molecules	11

Insulin signaling pathway	11
JAK-STAT signaling	9
Ca signaling	8
TLR signaling	8
TCR signaling	8
Fatty acid metabolism	6
Adipocytokine signaling	5
TGF β signaling	4
NK cell mediated cytotoxicity	4

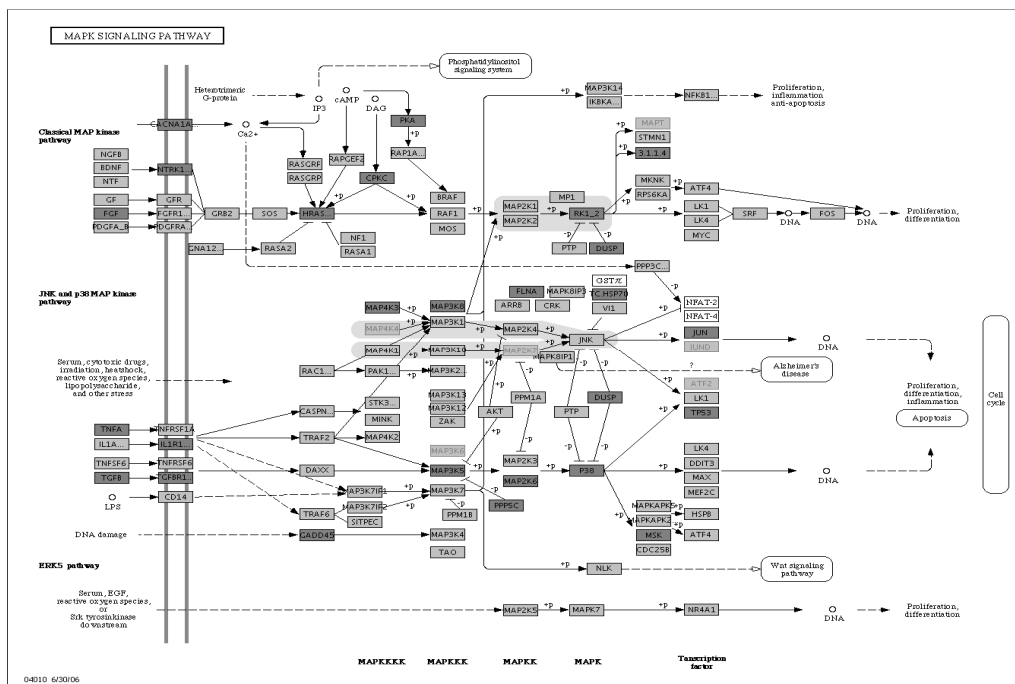


Abb. 90: „MAPK Signaling Pathway“. Die durch TGF- β 1 in NK-Zellen regulierten Gene TNF α , TGF- β , IL1R1, TGF β R1, GADD45, MAP3K4, MAP2K6, MAP4K3, MAP3K8, PPP5C, P38, DUSP, MSK, TP53, JUN u.a. sind an der MAPK-Signaltransduktion beteiligt (<http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT>, KEGG Maps).

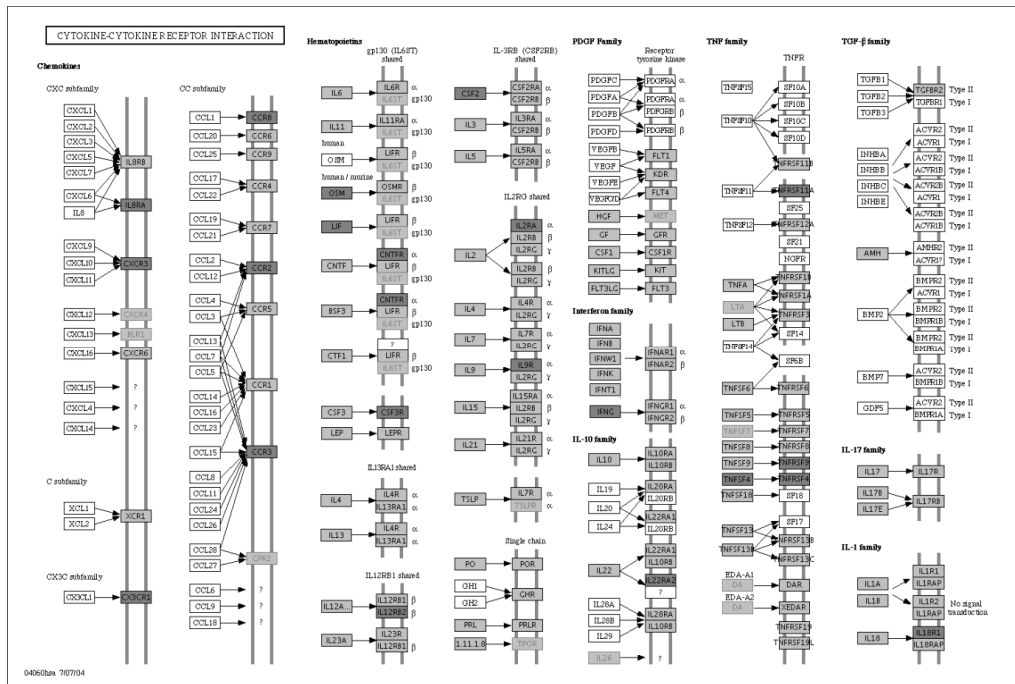


Abb. 91: Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktionen. Durch TGF-β1 in NK-Zellen regulierte Gene (IL-8RA, IL-2RA, IL-9R, IL-12RB2, IL-18R1, IL22RA2, CXCR3, CCR2, CCR3, CCR8, u.a.) sind an Zytokin- Zytokinrezeptor-Interaktionen beteiligt und beeinflussen dadurch die Zellaktivität (<http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT>, KEGG Maps).

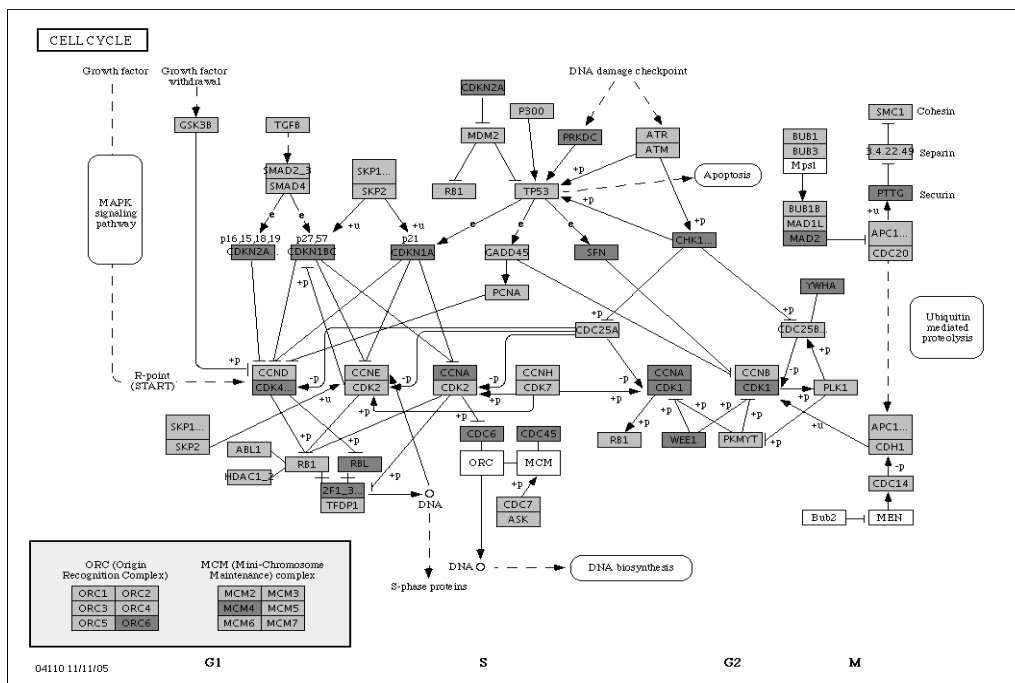


Abb. 92: Zellzyklusregulation. Die durch TGF-β1 in NK-Zellen regulierten Gene (CDKN1A, -2A, -1BC, CDK1, CDK4, CDC6, CDC45, WEE1, CCNA SFN, CHK1, PTTG, MAD2, YWHA, PRKDC, RBL, 2F1_3, ORC6, MCM4) sind maßgeblich am Zellzyklus beteiligt (<http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT>, KEGG Maps).

In CD8⁺-T-Zellen wurden durch TGF-β1 Gene reguliert, die wie bei NK-Zellen beim MAPK-Signalweg involviert sind, für Zelladhäsionsmoleküle oder für Zytokine/Chemokine (Abb. 93) codieren oder Apoptose-assoziiert sind (Tab. 49: „Pathway Analyse“ CD8⁺-T-Zellen: TGF-β1).

Tab. 49: „Pathway Analyse“ CD8⁺-T-Zellen: TGF-β1.

Pathway	Regulierte Enzyme
Cytokine-cytokine receptor interaction	11
Apoptosis	9
Purine metabolism	6
Adherens junction	5
Cell adhesion molecules	5
JAK-STAT signaling	5
TCR signaling	5
Insulin signaling	4
BCR signaling	3

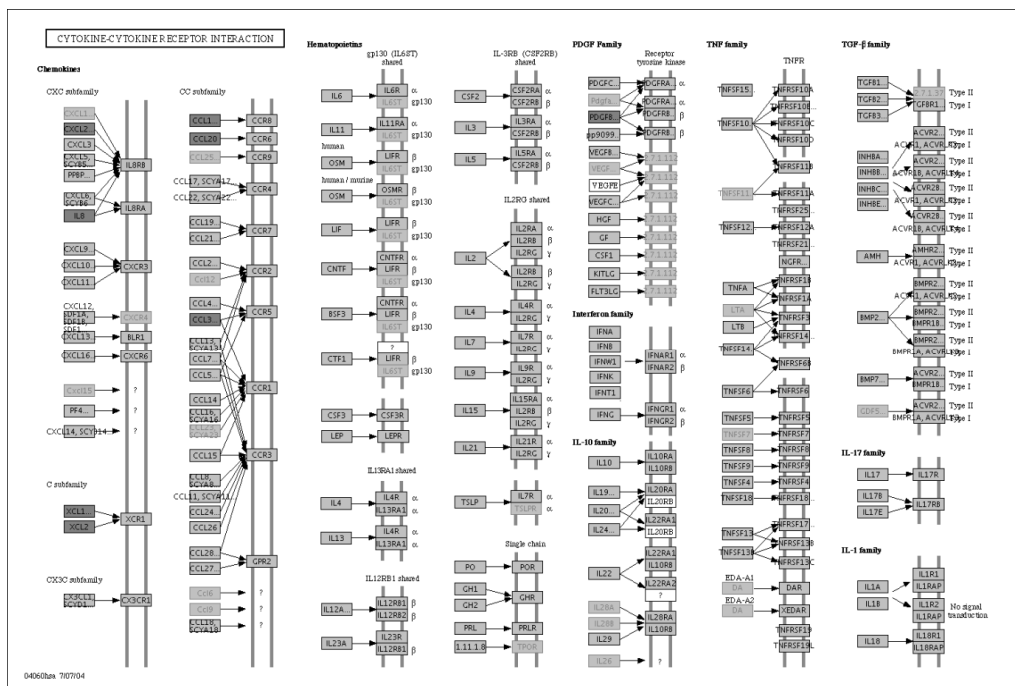


Abb. 93: Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktionen. Durch TGF-β1 in CD8⁺-T-Zellen regulierte Zytokin- und Chemokin-Gene (CXCL2, IL8, XCL1, XCL2, CCL1, CCL20, CCL3, PDGFB) sind in wichtige Zytokin-Netzwerke integriert (<http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT>, KEGG Maps).

Wie bereits in Abschnitt 3.4.3.1.2 gezeigt, waren nach 6 h GDF-15-Behandlung nur wenige (immunrelevante) Gene exprimiert. Die „Pathway Analyse“ ergab, dass diese Gene in folgenden Gen-Clustern konzentriert waren: bei der Kalzium-Signaltransduktion waren drei Enzyme durch GDF-15

dereguliert, zwei weitere deregulierte Enzyme waren am Fettsäuremetabolismus beteiligt (Tab. 50: „*Pathway Analyse*“ NK-Zellen: GDF-15 (6 h)).

Tab. 50: „*Pathway Analyse*“ NK-Zellen GDF-15 (6 h).

Pathway	Regulierte Enzyme
Calcium signaling	3
Fatty acid signaling	2

Nach 24 h GDF-15-Behandlung der NK-Zellen waren weitaus mehr Gene reguliert. Wie sich bereits im vorherigen Abschnitt abzeichnete, waren viele der regulierten Gene an der oxidativen Phosphorylierung, der Apoptose (Abb. 94) oder im MAPK-Signalweg (Abb. 95) beteiligt. Auch am T-Zell-Rezeptor- und Insulin-Signalweg beteiligte Gene waren gehäuft dereguliert. Weitere Gen-Cluster fanden sich unter den Zelladhäsionsmolekülen und dem B-Zell-Rezeptor-Signalweg (Tab. 51: „*Pathway Analyse*“ NK-Zellen: GDF-15 (24 h)).

Tab. 51: „*Pathway Analyse*“ NK-Zellen: GDF-15 (24 h).

Pathway	Regulierte Enzyme
Oxidative phosphorylation	22
Apoptosis	12
MAPK signaling pathway	11
Adherens junction	7
T cell receptor signaling pathway	6
Insulin signaling pathway	6
Cell adhesion molecules (CAMs)	5
B cell receptor signaling pathway	4
Huntington's disease	4
Calcium signaling pathway	3
Wnt signaling pathway	3
Notch signaling pathway	3
TGF-beta signaling pathway	3
Jak-STAT signaling pathway	3
Alzheimer's disease	3
Toll-like receptor signaling pathway	2

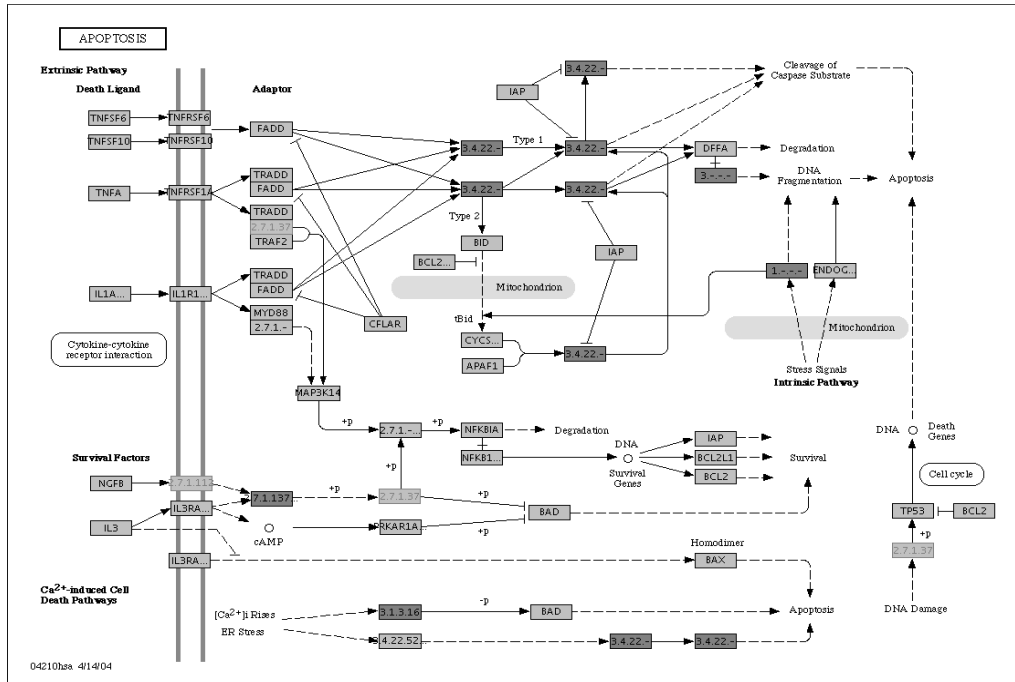


Abb. 94: Apoptose. Die durch GDF-15 regulierten pro- und anti-apoptische Gene (u.a. BAX, Harakiri, APAF1, CIDEA BCL2, Caspase-8, ApoL6) in NK-Zellen sind an der Apoptose beteiligt (<http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT>, KEGG Maps).

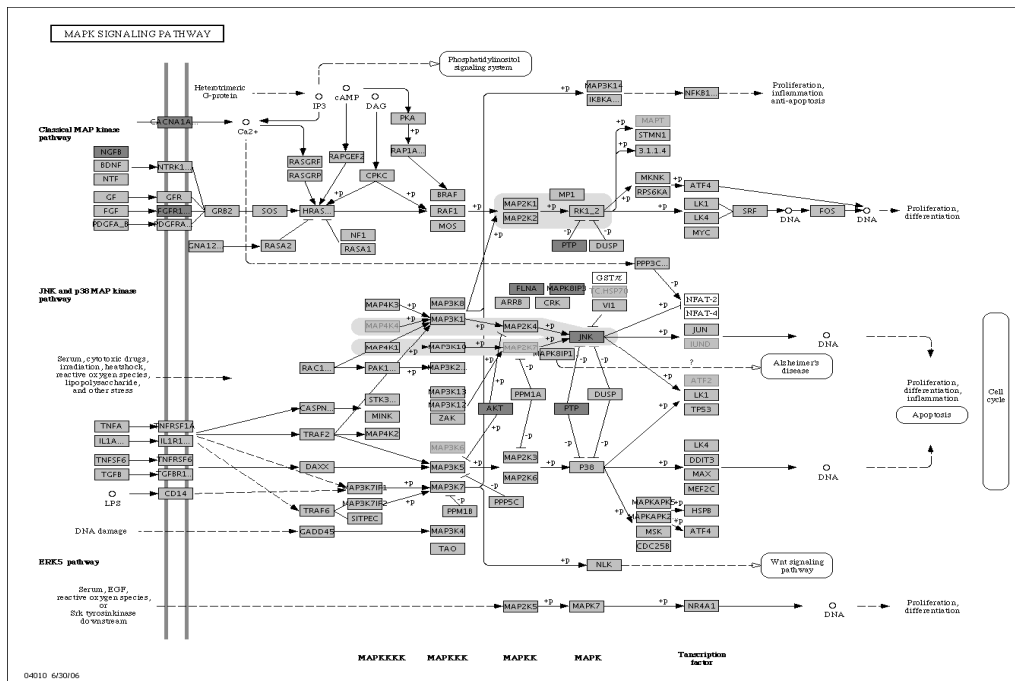


Abb. 95: „MAPK Signaling Pathway“. Durch GDF-15 regulierte Gene (AKT, PTP, JNK, NGFB, CACNA1A, FGFR1, MAPK8IP3, FLNA) in NK-Zellen, die an der MAPK-Signaltransduktion beteiligt sind (<http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT>, KEGG Maps).

3.4.4 Zusammenfassung: Signaltransduktion und Genregulation

Obwohl GDF-15 ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie ist und mit TGF- β viele funktionale Eigenschaften teilt, ist die Signaltransduktion und Genregulation der beiden Zytokine in OvCA-Zellen und Immunzellen weitgehend verschieden.

GDF-15 aktiviert zelltypspezifisch in OvCA-Zellen und Immunzellen unterschiedliche Signalwege. Zwar sind in OvCA-Zellen ebenfalls SMAD-Proteine bei der GDF-15-Signaltransduktion beteiligt, aber im Gegensatz zu TGF- β findet die Signalweiterleitung zusätzlich über AKT-Phosphorylierung statt.

In Immunzellen kann GDF-15 wie TGF- β SMAD2/3-Phosphorylierung initiieren. Allerdings setzt dieser Effekt zeitlich verzögert zum TGF- β -Effekt ein. Im Gegensatz zu TGF- β aktiviert GDF-15 zusätzlich auch die p38/MAPK in Immunzellen.

Ähnlich wie TGF- β kann GDF-15 verschiedenste Immunrezeptoren aktivieren, u.a. Mitglieder der Siglec-Familie und Fc-Rezeptoren, was im Phospho-Immunorezeptor-Array beobachtet wurde.

Die Genexpressionsanalyse zeigt ein sehr unterschiedliches Bild von TGF- β und GDF-15 in Immunzellen. Zwar sind die durch GDF-15 und TGF- β 1 regulierten Gene zumeist in ähnlichen Funktionsclustern eingebunden, die einzelnen regulierten Gene sind jedoch verschieden oder gegensätzlich reguliert. Nur drei Gene sind durch GDF-15 und TGF- β 1 gleichermaßen reguliert: die Expression von CD55, von Caspase-8 und von Apolipoprotein 6 wurde von beiden Zytokinen herunterreguliert.

Während sich TGF- β und GDF-15 in ihrer Wirkung auf Immunzellen zwar funktional ähneln, z.B. bei der Rezeptorregulation, verdeutlichen Signaltransduktion und Genregulation ihre gegensätzlichen intrazellulären Mechanismen.

4 DISKUSSION

4.1 Expression von GDF-15 im Ovarialkarzinom

GDF-15 wurde vor etwas mehr als 10 Jahren in aktivierten Makrophagen entdeckt und aufgrund seiner anti-inflammatorischen Wirkung als „*macrophage inhibitory cytokine*“ 1 (MIC-1) bezeichnet. In den folgenden Jahren beschrieben weitere Gruppen das gleiche Protein unter anderen Namen. Heute ist MIC-1 unter vielen Namen, u.a. „*growth and differentiation factor*“ 15 (GDF-15) oder als plazentares TGF- β , bekannt (Baek et al., 2001; Bottner et al., 1999; Hromas et al., 1997; Lawton et al., 1997; Li et al., 2005; Paralkar et al., 1998). Aufgrund seiner charakteristischen Struktur wurde GDF-15 der TGF- β -Superfamilie, einer Großfamilie von Zytokinen, Wachstums- und Zelldifferenzierungsfaktoren zugeordnet (Fairlie et al., 1999; Paralkar et al., 1998). Im Gegensatz zu TGF- β findet sich GDF-15 unter physiologischen Bedingungen im adulten Gewebe jedoch nur gering exprimiert. Einzig in den Trophoblasten der humanen Plazenta wird GDF-15 hoch exprimiert (Li et al., 2005; Marjono et al., 2003). Es wird vermutet, dass GDF-15 in diesem Zusammenhang den Fötus vor einer Abstoßung durch das maternale Immunsystem schützt, da eine Reduktion des GDF-15-Serumspiegels während der Schwangerschaft die Wahrscheinlichkeit für eine Fehlgeburt erhöht (Tong et al., 2004). Daneben konnte eine geringe GDF-15-mRNA-Expression in adulten Epithelien der Niere, des Pankreas und der Prostata sowie in der fötalen Lunge und Niere detektiert werden (Fairlie et al., 1999; Lawton et al., 1997; Moore et al., 2000). Außerdem wurde GDF-15 in Adipozyten und subkutanem und viszeralem Fettgewebe nachgewiesen (Ding et al., 2009; Kim et al., 2008d).

In pathologischen Situationen, z.B. bei Gewebeverletzungen (Hsiao et al., 2000; Koniaris et al., 2005; Schober et al., 2001; Zimmers et al., 2005; 2006) oder Erkrankungen des Herzens (Kempf and Wollert, 2009; Khan et al., 2009; Xu et al., 2006) werden deutlich höhere GDF-15-Level nachgewiesen als im physiologischen Kontext. Dass GDF-15 in transformiertem Gewebe exprimiert wird, wurde zuerst von Welsh et al. 2001 beschrieben. Hier wurde GDF-15 als einer der am höchsten exprimierten Faktoren in 21 von 24 Prostatatumoren gefunden (Welsh et al., 2001). Seitdem wurde GDF-15 in vielen weiteren Tumoren nachgewiesen, so z.B. im Kolonkarzinom, im Glioblastom, im Mamma-CA und im Melanom (Albertoni et al., 2002; Baek et al., 2009; Bottone et al., 2002; Boyle et al., 2009; Welsh et al., 2003; Wollmann et al., 2005). Über die Expression von GDF-15 im Ovarialkarzinom war bislang nur wenig bekannt. Appierto et al. beobachteten die Induktion von GDF-15 durch das Retinoid 4-HPR in OvCA-Zelllinien und in diesem Zusammenhang eine Apoptoseinduktion (Appierto et al., 2009; Appierto et al., 2007).

Da über die Expression von GDF-15 im OvCA nur wenig bekannt war, wurde zunächst die Expression von GDF-15 im Vergleich zur Expression der TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 in verschiedenen *ex vivo*-OvCA-Materialien sowie in primären OvCA-Zellen und OvCA-Zelllinien *in vitro* untersucht.

Sowohl im OvCA-Gewebe als auch in primären, aus Asziteskultur isolierten OvCA-Zellen ist GDF-15 das Zytokin mit der höchsten Überexpression im Vergleich zum gesunden Ovar (2500fache Überexpression im Gewebe und 7000fache Überexpression in primären OvCA-Zellen, Abb. 20, 21). Damit reiht sich das OvCA in die Gruppe der Tumore ein, die GDF-15 stark überexprimieren.

TGF- β 1, das auch als Prototyp-Zytokin seiner Familie gilt, ist im OvCA fast 200 Mal stärker exprimiert als im gesunden Ovar (Median Expressionsänderung: +191 im Gewebe und +236 in primären OvCA-Zellen, Abb. 20 und 21), damit aber weit geringer überexprimiert als GDF-15. TGF- β 1-Überexpression im OvCA wurde auch von Bristow et al. beobachtet. Allerdings fanden sie TGF- β 3 ebenfalls überexprimiert (Bristow et al., 1999), was hier nicht beobachtet wurde. Die Expression der TGF- β -Isoformen 2 und 3 ist im OvCA kaum verändert gegenüber gesundem Ovar (5 bzw. 2fache Überexpression, Abb. 20). Diese Isoformen haben daher höchstwahrscheinlich keine funktionale Relevanz im OvCA. Interessanterweise besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der GDF-15- und der TGF- β 1-Expression im OvCA: Tumore, die eine hohe GDF-15-Expression aufweisen, haben gleichzeitig eine höhere TGF- β 1-Expression. Tumore, die eine niedrigere GDF-15-Expression aufweisen, exprimieren dementsprechend auch wenig TGF- β 1. Diese direkte Korrelation von GDF-15 und TGF- β 1 ist spezifisch für diese eine Isoform und spiegelt sich im Korrelationskoeffizienten von 0,999 (OvCA-Gewebe) und 0,824 (primäre OvCA-Zellen) wieder. Damit wurde zum ersten Mal eine direkte Korrelation zwischen GDF-15 und TGF- β 1 in Tumoren beschrieben. Die Korrelation der GDF-15- und TGF- β 1-Expressionen kann auf einen direkten funktionalen Zusammenhang der beiden verwandten Zytokine hindeuten, wie beispielsweise auf eine mögliche Redundanz oder aber eine gegenseitige Abhängigkeit der beiden Zytokine. Denkbar wäre, dass GDF-15 die Expression von TGF- β 1 im OvCA induziert, v.a. in Anbetracht der verzögerten SMAD-Signaltransduktion von GDF-15 (Abschnitt 3.4.2), was aufgrund der ähnlichen Eigenschaften zu funktional additiven Effekten führen könnte. Klarheit darüber würde eine Genanalyse von GDF-15-behandelten OvCA-Zellen schaffen. Zumindest in NK-Zellen scheint dies nicht der Fall zu sein, da die Genexpressionsanalyse unter GDF-15-Einfluss keine Induktion von TGF- β 1 (oder einer anderen Isoform) zeigte (Abschnitt 3.4.3).

Im Rahmen der Funktionalitätsstudien, wurde die Expression von TGF- β 1, 2 und 3 sowie GDF-15 auch in den etablierten OvCA-Zelllinien SKOV-3, OaW-42, OVCAR-3 und in der Teratom-Zelllinie PA-1 untersucht. Zelllinien verändern häufig ihre Eigenschaften aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks in der langjährigen *in vitro*-Kultur. Bei den OvCA-Zelllinien zeigen sich individuelle Unterschiede in der GDF-15-Expression: während PA-1, SKOV-3 und OaW-42 hohe GDF-15-Expressionslevel aufweisen, ist die Expression in OVCAR-3 gering. Dennoch spiegelt sich das Muster der *in vivo*-Expression von GDF-15, TGF- β 1, 2 und 3 in den OvCA-Zelllinien wieder, was deren Verwendung für Funktionalitätsstudien erlaubte.

GDF-15 wird nicht nur auf mRNA-Ebene induziert, sondern ist auch als Protein im OvCA exprimiert und sezerniert, und wird in seinen Proformen und als aktives Dimer im OvCA-Gewebe und in primären OvCA-Zellen nachgewiesen (Abb. 24 und 28). Allerdings variieren die Stärke der Expression und die Präsenz der einzelnen (Pro-)Formen. Einerseits könnte dies an der unterschiedlichen Qualität der Probenmaterialien liegen, andererseits sind individuelle Unterschiede bei Tumorpatientinnen mit einzubeziehen. Warum GDF-15 im Western Blot auch im gesunden Ovar detektiert wurde, ist unklar, da GDF-15 hier normalerweise nicht exprimiert wird. TGF- β 1 hingegen scheint eine inhibierende Rolle bei der Ovar-Follikelentwicklung und -reifung zu spielen und kann daher auch im gesunden Ovar

detektiert werden. Zudem hemmt es die Proliferation von Ovariepithelien *in vitro* (Havrilesky et al., 1995; Rosairo et al., 2008). Es wäre denkbar, dass GDF-15 ähnlich wie TGF- β 1 eine noch unbekannt Funktion bei der Follikelgenese im gesunden Ovar ausübt und dadurch zyklusabhängig exprimiert wird.

GDF-15 wird erst bei seiner Sekretion durch Furin-ähnliche Proteasen gespalten und damit aktiviert (Bauskin et al., 2000; Uchida et al., 2003). Biologisch aktives GDF-15 liegt also immer in sezernierter Form vor. Im Western Blot von Tumorgewebe kann nicht zwischen intra- und extrazellulärem GDF-15 unterschieden werden. Daher wurde zusätzlich die GDF-15-Expression im Serum von Gesunden und OvCA-Patientinnen, im Aszites sowie *in vitro* im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die höchste Konzentration von GDF-15 ist im OvCA-Aszites nachzuweisen (Median: 1979 pg/ml), in dem aufgrund der Tumornähe GDF-15 und andere vom Tumor sezernierte Faktoren akkumulieren.

Im Serum von OvCA-Patientinnen war der GDF-15-Spiegel signifikant erhöht gegenüber der Konzentration von GDF-15 im Serum gesunder Donoren oder im Serum von Patientinnen mit nicht malignen gynäkologischen Erkrankungen (616 pg/ml vs. 260 pg/ml bzw. 129 pg/ml). GDF-15 wurde bereits als Marker für Tumorerkrankungen vorgeschlagen, u.a. für das Prostata-CA und das Pankreas-CA (Grote and Logsdon, 2007; Koopmann et al., 2006; Selander et al., 2007). Auch für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie als Indikator für Fehlgeburten erwies sich GDF-15 als geeigneter prognostischer Marker (Brown et al., 2003; Carbillon et al., 2004; Kempf et al., 2007; Koopmann et al., 2006; Welsh et al., 2003). Aufgrund der Signifikanz und der Spezifität (maligne vs. benigne Erkrankung) der hier ermittelten GDF-15-Spiegel in OvCA-Seren würde sich GDF-15 auch als Tumormarker für das OvCA zur Abgrenzung von nicht malignen Erkrankungen in Kombination mit anderen Markern (z.B. CA125) anbieten.

Auch *in vitro* wird aktives, dimeres GDF-15 sezerniert. Die Konzentrationen im Zellkulturüberstand von primären OvCA-Zellen und OvCA-Zelllinien sind jedoch weit geringer (Median: 40 bzw. 64 pg/ml). Interessanterweise sezernieren primäre, aus Aszites isolierte OvCA-Zellen nicht signifikant mehr bzw. weniger GDF-15 als etablierte OvCA-Zelllinien, so dass der Verwendung von OvCA-Zelllinien für funktionale Assays nichts entgegenstand. Dennoch gab es individuelle Unterschiede in der Höhe der GDF-15-Konzentrationen: OaW-42 ist diejenige Zelllinie mit der höchsten GDF-15-Konzentration, PA-1 die mit der niedrigsten, obwohl die mRNA-Expression hier induziert ist (Abb. 22 und 29). Damit ist PA-1 ein Beispiel dafür, dass eine hohe Genexpression nicht gleichbedeutend mit einer hohen Proteinexpression ist.

Die Expressionsanalysen identifizieren GDF-15 als einen Faktor, der im OvCA transkriptionell und translational hochreguliert ist. Aufgrund dieser Tatsache ist anzunehmen, dass GDF-15 eine wichtige Rolle bei der OvCA-Genese bzw. -Progression in auto- und/oder parakriner Weise spielt.

4.2 Funktionen von GDF-15 im Ovarialkarzinom

4.2.1 Autokrine Funktion von GDF-15 in OvCA-Zellen

4.2.1.1 Wachstum

In Abschnitt 3.1 wurde gezeigt, dass GDF-15 im OvCA überexprimiert ist. Dies führte zur Frage, welche Funktionen vom Tumor produziertes GDF-15 im OvCA ausübt. Einerseits könnte GDF-15 autokrin als Wachstumsfaktor für den Tumor selbst fungieren und so dessen Progression vorantreiben, andererseits könnte GDF-15 parakrin als immunsuppressiver Faktor die Anti-Tumorimmunantwort behindern und so zum „*tumor immune escape*“ beitragen.

GDF-15 wurde bereits als autokriner Wachstumsfaktor für ein *in vitro*-Modell des oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben (Zhang et al., 2009) und auch im Prostata-CA fungiert GDF-15 *in vitro* als autokriner Wachstumsfaktor, wohingegen es die Prostata-CA Zelllinie LNCaP und eine OvCA-Zelllinie inhibierte (Chen et al., 2007; Kim et al., 2005; Lee et al., 2003; Nazarova et al., 2004). Auch andere Mitglieder der TGF- β -Familie sind dafür bekannt, dass sie das Tumorstadium fördern. Während in gesundem Ovar TGF- β 1 auf die Proliferation von Ovariepithelzellen inhibierend wirkt (Havrilesky et al., 1995), ändert sich im Laufe der Tumorgenese aufgrund von Mutationen im TGF- β -Signalweg die Sensitivität gegenüber der autokrinen TGF- β -Inhibition (Cardillo et al., 1997; Chen et al., 2001; Hempel et al., 2007; Hu et al., 2000; Kadin et al., 1994; Lynch et al., 1998; Schutte et al., 1996; Wang et al., 2000b; Yamada et al., 1999). Gleichzeitig bleiben infiltrierende Immunzellen sensitiv für die TGF- β -Inhibition, so dass diese im Tumormikromilieu inhibiert werden. Dadurch unterstützt TGF- β das maligne Wachstum. TGF- β hat zudem direkten Einfluss auf die Progression des OvCAs, indem es die Invasion und Metastasierung begünstigt (Derynck et al., 2001; Do et al., 2008). Activin A, ein weiteres Mitglied der TGF- β -Superfamilie, hat hingegen eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von Brusttumorzellen *in vitro* bzw. in (Xenograft-)Tumoren *in vivo* (Burdette et al., 2005; Panopoulou et al., 2005).

In Abschnitt 3.2 wurde die autokrine Wirkung von GDF-15 auf die Proliferation, den Metabolismus und auf die Expression von Oberflächenmarkern in einer OvCA-Zelllinie mit niedriger endogener GDF-15-Expression durch die Überexpression von GDF-15 sowie in einer OvCA-Zelllinie mit hoher endogener GDF-15-Expression durch den „*knock-down*“ von GDF-15 untersucht.

Dazu wurden zunächst GDF-15-überexprimierende OVCAR-3 und GDF-15-defiziente OaW-42 sowie nur das Vektorgerüst tragende Kontrollzelllinien hergestellt. OVCAR-3 produziert nur wenig GDF-15 (Abb. 22, 30). Daher wurde diese Zelllinie ausgewählt, um GDF-15 mit den Plasmidsystemen pCDNA3.1-GDF-15 und pIRESeGFP-GDF-15 zu überexprimieren. Da OVCAR-3 mit dem Plasmidsystem pIRESeGFP-GDF-15 mehr als 3,5 Mal so viel GDF-15 sezernierte als die Kontrollzelllinie und damit deutlich mehr als mit dem pCDNA3.1-GDF-15-Plasmidsystem, wurden pIRESeGFP-GDF-15-transfizierte OVCAR-3 (und entsprechende Kontrollen) für funktionale Studien verwendet (Abb. 31).

Im Gegensatz zu OVCAR-3 produzieren OaW-42 viel GDF-15 (Abb. 22, 29, 30). Daher wurde diese Zelllinie ausgewählt, um die GDF-15-Expression stabil mit Hilfe des shRNA-Plasmidsystems

pSUPERpuro-GDF-15 abzuschalten. Die GDF-15-Expression ist in OaW-42 dadurch stabil um mehr als 85% herunterreguliert (Abb. 33).

Durch die luminometrische Messung des BrdU-Einbaus in die DNA während der Zellteilung kann die Zellteilungsrate bestimmt und damit auf die Proliferation der OvCA-Zellen zurückgeschlossen werden. Verglichen mit der Kontrollzelllinie ist die relative Proliferation durch die GDF-15-Überexpression verlangsamt, jedoch nicht komplett gestoppt (Abb. 34). Ähnliches wurde bei der Prostata-CA Zelllinie LNCaP und der Mamma-CA Zelllinie MCF-7 unter GDF-15-Einfluss beobachtet (Lambert et al., 2006; Martinez et al., 2006).

Die Zelldichte ermittelt über einen bestimmten Zeitraum ist indirekt ebenfalls ein Maß für die Zellteilungsrate und damit auch für deren Wachstumsgeschwindigkeit, was mittels Kristallviolett färbung untersucht wurde. Die relative Zelldichte der GDF-15-überexprimierenden OVCAR-3 war nach 24 h um 25% geringer als die der Kontrollzellen (Abb. 37), was die Ergebnisse der Proliferationsbestimmung mittels BrdU-Assay bestätigte. Im Fall von OVCAR-3, die nativ sehr wenig GDF-15 exprimieren, bewirkt demnach eine (artifizielle) endogene GDF-15-Überexpression eine Wachstumsverzögerung.

Im Gegensatz dazu zeigen stabile (und auch transiente) GDF-15-defiziente OvCA-Zellen im Vergleich zu ihren Kontrollen keinen relevanten Unterschied im BrdU-Einbau und damit im Wachstumsverhalten (Abb. 34 und 35). Im Kristallviolettassay war die Zelldichte der GDF-15-defizienten OaW-42 jedoch tendenziell höher als die der Kontrollzellen (Abb. 37), was zunächst im Widerspruch zum BrdU-Assay steht. Dies könnte möglicherweise an einer unterschiedlichen Größe der Zellen oder verminderter Adhärenz liegen, was im Kristallviolettassay, nicht aber im BrdU-Assay zum Tragen käme. Es ist jedoch davon auszugehen, dass GDF-15 in OaW-42 keine wachstumsrelevante Funktion ausübt.

Exogen supplementiertes rekombinantes GDF-15 (rhGDF-15) bewirkt bei allen OvCA-Zelllinien einschließlich OaW-42 eine tendenzielle Wachstumsinhibition (Abb. 38). Dies ist vermutlich auf die hohen, nicht physiologischen Konzentrationen von GDF-15 zurückzuführen. Möglicherweise gibt es auch eine zelltypspezifische optimale GDF-15-Konzentration, bei der sich die Zellen am wohlsten fühlen und auf die sich die Zellen normalerweise einstellen.

Analog zu früheren Befunden (Chen et al., 2007; Lambert et al., 2006; Lee et al., 2003; Martinez et al., 2006; Nazarova et al., 2004; Zhang et al., 2009) kann GDF-15 demnach auch auf OvCA-Zelllinien unterschiedliche, höchstwahrscheinlich zelltypspezifische Wirkungen ausüben. Zellen, die nativ wenig GDF-15 produzieren, reagieren auf die GDF-15-Überexpression mit einer Wachstumsverzögerung aufgrund inhibierender Wirkung durch GDF-15, während die Abschaltung von GDF-15 in OvCA-Zellen mit nativ hoher GDF-15-Expression keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Zellwachstum hat, da diese an hohe GDF-15-Level adaptiert sind.

Tumore sind häufig resistent gegen die Wachstumsinhibition durch TGF- β aufgrund von Mutationen in Komponenten des TGF- β -Signalweges (Harradine and Akhurst, 2006; Piek and Roberts, 2001; Rich et al., 2001). Auch im OvCA können SMAD-Proteine mutiert sein (Wang et al., 2000a; Wang et al., 1999). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch den unterschiedlichen Effekt von GDF-15 auf OVCAR-3 und OaW-42 erklären: während OVCAR-3 auf die durch GDF-15 vermittelte Wachstumsinhibition anspricht, vermutlich aufgrund funktionsfähiger GDF-15-Signalwege und -

Rezeptoren und deswegen auch selbst wenig GDF-15 produziert, führt die ektope GDF-15-Überexpression zu einer Wachstumshemmung. Bei OaW-42 dagegen könnten eine oder mehrere Komponenten des GDF-15-Signalweges durch Mutationen ausgeschaltet oder nur eine geringe Restresponsivität verblieben sein, so dass die endogene GDF-15-Produktion keine inhibierende Wirkung hat. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass alle OvCA-Zelllinien unter exogenem (nicht physiologischem) GDF-15-Einfluss langsamer proliferierten als die entsprechenden unbehandelten Kontrollen. Hier war der Effekt von GDF-15 auf OVCAR-3 am stärksten, während das Wachstum der anderen OvCA-Zelllinien, die endogen mehr GDF-15 produzieren, zwar durch exogenes GDF-15 verlangsamt wurde, jedoch nicht in gleichem Ausmaß wie bei OVCAR-3. Es wäre daher interessant, mögliche GDF-15-Signalkomponenten auf ihre Funktionalität in diesen OvCA-Zelllinien zu untersuchen.

Tendenziell verlangsamt GDF-15 also das Wachstum von OvCA-Zelllinien *in vitro*. Trotzdem ist es *in vivo* im OvCA überexprimiert. Daher muss die GDF-15-Überexpression im OvCA einen anderen Nutzen als den eines autokrinen Wachstumsfaktors haben.

4.2.1.2 Viabilität

Der Metabolismus gibt häufig Aufschluss darüber, wie gut oder schlecht es Zellen geht. Mittels WST Assay, bei dem die Umsetzung des Substrates WST kolorimetrisch bestimmt wird, wurde der Einfluss von GDF-15 auf OvCA-Zelllinien untersucht. Das Tetrazoliumsalz WST kann dabei als Akzeptor in der Atmungskette fungieren (<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1644807a.pdf>). GDF-15-Überexpression in OVCAR-3 erhöht den WST-Umsatz im Vergleich zur Kontrolle, während GDF-15-Defizienz in OaW-42 zu einer verminderten Umsetzung von WST führt (Abb. 36). Da GDF-15 in NK-Zellen zahlreiche Gene der oxidativen Phosphorylierung/Atmungskette (Tab. 51) reguliert, ist es daher durchaus denkbar, dass GDF-15 auch in OvCA-Zellen die Reduktion von WST beeinflussen kann. Die experimentellen Daten zeigen jedenfalls, dass GDF-15 autokrin den Umsatz von WST in OvCA-Zellen stimuliert.

4.2.1.3 Oberflächenmarker

Tumorzellen verändern im Laufe ihres Transformationsprozesses häufig ihr Rezeptorrepertoire im Vergleich zur Ursprungszelle. Besonders häufig werden MHC-I-Moleküle herunterreguliert, um so der antigenspezifischen zytotoxischen Lyse durch CD8⁺-T-Zellen zu entgehen (Seliger et al., 2006). Die „killer cell immunoglobulin-like receptors“ auf NK-Zellen erkennen MHC-I auf der Zelloberfläche von Zielzellen. Werden bestimmte MHC-I-Allele nicht oder in zu geringer Anzahl exprimiert, wird die über diese Rezeptoren vermittelte Inhibition aufgehoben und die Antigen-unabhängige Lyse durch NK-Zellen initiiert (Bubenik, 2004; Koh et al., 2001; Long, 2002; Restifo et al., 1993; Seliger et al., 2006). Generell exprimieren die untersuchten OvCA-Zelllinien MHC-I-Moleküle, allerdings unterschiedlich stark (Abb. 39). Besonders SKOV-3 und OVCAR-3 haben eine hohe MHC-I-Expression. Verglichen

mit der entsprechenden nativen Ursprungszelllinie OVCAR-3 bzw. OaW-42 war die Expressionsstärke bei den stabil transfizierten OVCAR-3 und OaW-42 generell geringer, was auf klonale Artefakte durch die Selektion zurückzuführen sein kann. GDF-15-Überexpression in OVCAR-3 hatte keinen Effekt auf die MHC-I-Expression.

Die GDF-15-Defizienz in OaW-42 führte hingegen autokrin zu einer Erhöhung der MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 40). Umgekehrt vermindert die hohe endogene GDF-15-Expression von OaW-42 demnach die MHC-I-Expression, was die Zellen für einen NK-Zellangriff sensibilisieren kann. Die Genexpressionsanalyse in Immunzellen (Abschnitt 3.4) zeigt ebenfalls, dass bestimmte HLA-Moleküle (in diesem Fall der Klasse MHC-II) sowohl durch GDF-15 als auch durch TGF- β in parakriner Weise herunterreguliert werden können (HLA-DQA1 in CD8⁺-T-Zellen durch TGF- β 1, HLA-DOB in NK-Zellen durch GDF-15); von TGF- β 1 ist zudem bekannt, dass es die MHC-I-Expression im Mausmodell negativ beeinflusst (Geiser et al., 1993).

Exogen supplementiertes rhGDF-15 konnte die MHC-I-Expression auf GDF-15-defizienten OvCA-Zellen jedoch nicht revertieren (Abb. 41). Es ist daher davon auszugehen, dass die endogene GDF-15-Expression wahrscheinlich indirekt die MHC-I-Expression negativ beeinflusst.

Im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen werden Liganden für den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D im Laufe der onkogenen Transformation häufig an der Zelloberfläche hochreguliert (Bubenik, 2004; Cerwenka and Lanier, 2001, 2003; Groh et al., 1996; Koh et al., 2001). Diese sind die MHC-ähnlichen Moleküle MIC-A und -B sowie die ULBP-Moleküle 1-4 (Cerwenka and Lanier, 2001, 2003; Groh et al., 1996). Die Expression der NKG2D-Liganden (NKG2D-L) macht die Tumorzelle anfällig für NK-Zell-vermittelte Lyse. Eine Hypothese, basierend auf Untersuchungen von Bartkova et al. geht davon aus, dass durch Chemotherapie und Bestrahlung NKG2D-Liganden in Tumoren hochreguliert werden können und diese damit sensitiver für eine NK-Zell-vermittelte Lyse werden, was wiederum den Effekt der Chemotherapie immunologisch verstärken würde (Bartkova et al., 2005; Pure et al., 2005).

Die Expression der NKG2D-L schwankt bei den einzelnen primären OvCA-Zellen. Die geringste Expression weist MIC-A auf (Median relative Expression: +5), die höchste ULBP-2 (Median relative Expression: +1800). MIC-B, ULBP-1 und ULBP-3 sind ebenfalls transkriptionell erhöht (Abb. 42). Überraschenderweise zeigt MIC-A transkriptionell keine erhöhte Expression gegenüber gesundem Ovar, während es als Protein der Ligand mit der höchsten Expression auf primären OvCA-Zellen ist. Umgekehrt verhält es sich bei ULBP-1: dieses wird als Protein an der Zelloberfläche von OvCA-Zellen praktisch nicht exprimiert, transkriptionell jedoch ist es induziert.

Die OvCA-Zelllinien spiegeln die Ergebnisse der primären Zellen wieder: die MIC-A-Expression ist nur schwach induziert, während es als Protein auf der Zelloberfläche aller OvCA-Zelllinien stark exprimiert ist ($SFI_{\text{Median}} = 3,1$), wohingegen ULBP-1 transkriptionell induziert, auf der Zelloberfläche als Protein jedoch nicht detektierbar ist (Abb. 43). Dabei ist allerdings zu beachten, dass lediglich zellständige, nicht aber die löslichen NKG2D-L analysiert wurden. Diese Diskrepanz kann somit möglicherweise auf die selektive Abspaltung („*shedding*“) einzelner NKG2D-L zurückzuführen sein. Denkbar wäre auch, dass an der Proteinexpression dieser beiden NKG2D-L noch weitere Regulationsfaktoren auf post-transkriptioneller und post-translationaler Ebene beteiligt sind. Eine mögliche Erklärung könnte eine sehr stabile Proteinexpression von MIC-A sein, mit einer langsamen Protein-„*turn-over*“-Rate. Bei

ULBP-1 ist die Translation der limitierende Faktor. Beispielsweise behindert das Erfordernis von seltenen Aminosäuren die Translationsrate trotz ausreichender mRNA-Expression. Von post-transkriptionellen bzw. post-translationalen Regulationsmechanismen dieser beiden NKG2D-L wurde bislang jedoch nichts berichtet.

Generell ist die NKG2D-L-Expression in den OvCA-Zelllinien etwas stärker als in den primären OvCA-Zellen, was auf den fehlenden immunologischen Selektionsdruck in der Zellkultur zurückzuführen sein könnte. SKOV-3 ist die Zelllinie mit der höchsten Gesamtexpression aller NKG2D-L.

Sowohl primäre OvCA-Zellen aus Asziteskultur als auch OvCA-Zelllinien sind durch die Expression eines oder mehrerer NKG2D-L immunologisch angreifbar. Trotzdem wurden die primären OvCA-Zellen *in vivo* von NK- oder CD8⁺-T-Zellen nicht eliminiert, obwohl diese im Aszites in unmittelbarer Nähe vorhanden sind (Abb. 48). Grund dafür kann ein vom Tumor induziertes, immuninhibitorisches Milieu sein, welches infiltrierte Immunzellen inaktiviert (Nelson and Ganss, 2006). Welche autokrine Rolle vom Tumor produziertes GDF-15 in diesem Zusammenhang hat, wurde anhand von GDF-15-defizienten und GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zelllinien untersucht.

Endogene GDF-15-Überexpression in OVCAR-3 bewirkt eine schwache Herunterregulation der NKG2D-L MIC-A und ULBP-2 im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Anders bei GDF-15-defizienten OaW-42: hier bewirkt die fehlende GDF-15-Expression eine deutliche Induktion aller NKG2D-L an der Zelloberfläche. Nur ULBP-2 ist davon ausgenommen (Abb. 44). Auch transkriptionell sind die NKG2D-L in GDF-15-defizienten Zellen gegenüber den Kontrollen induziert. Bei ULBP-4, das aufgrund des fehlenden Antikörpers bis dato nicht auf Proteinebene untersucht werden konnte, ist die Expression sogar vier Mal so stark (Abb. 45). Nur ULBP-3 ist transkriptionell gegenüber der Kontrolle nicht induziert, wohl aber an der Zelloberfläche, während ULBP-2 zwar transkriptionell induziert ist, nicht aber als Protein. Möglicherweise zeichnen auch hierfür post-transkriptionelle und translationale/post-translationalen Regulationsmechanismen verantwortlich (Cerwenka, 2009; Stern-Ginossar and Mandelboim, 2009).

Was zuvor schon bei der MHC-I-Expression zu beobachten war, gilt auch für die NKG2D-L-Expression: exogen supplementiertes rhGDF-15 bewirkt keine Änderung der NKG2D-L-Expression an der Zelloberfläche. GDF-15 ist demnach kein direkter autokriner Modulator der NKG2D-L-Expression auf OvCA-Zellen. Bislang war bekannt, dass NKG2D-L durch virale oder onkogene Transformation und zellulären Stress bzw. DNA-Schädigung induziert werden (Gasser et al., 2005). Retinsäure und „*heat-shock*“-Proteine als Stresssignale wahrgenommen, können ebenfalls NKG2D-L-Expression induzieren (Jinushi et al., 2003; Venkataraman et al., 2007). Es ist hier zum ersten Mal beschrieben, dass die Ausschaltung eines endogenen Proteins die NKG2D-L-Expression in Ovarialkarzinomzellen reguliert. Ähnliches ist für TGF- β 1 bei Gliomzellen beschrieben (Eisele et al., 2006).

Fehlende GDF-15-Expression in einer Zelle, die normalerweise viel GDF-15 produziert, könnte auch als Stresssignal von der Zelle wahrgenommen werden, was die Induktion der NKG2D-L-Expression zur Folge hätte. Dafür spricht auch, dass exogenes GDF-15 keinen direkten Einfluss auf die NKG2D-L-Expression hat. Denkbar wäre auch ein Einfluss auf die Aktivität von Metalloproteinasen, die NKG2D-L von der Zelloberfläche abspalten (Eisele et al., 2006). Die Expression einiger MMP war zumindest in NK-Zellen durch GDF-15 reduziert (Abschnitt 3.4.3.2.2).

Aus tumorimmunologischer Sicht steigert die GDF-15-Defizienz in OaW-42, die nativ viel GDF-15 sezernieren, über die Induktion von NKG2D-L an der Zelloberfläche die Immunogenität dieser Zelllinie, was sie angreifbar für das Immunsystem macht. Umgekehrt hat die hohe endogene GDF-15-Expression daher auf indirekte Weise einen pro-tumorigenen Effekt.

DNAM-1 ist wie NKG2D ein aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen. Carlsten et al. berichteten von einer dominanten Rolle von DNAM-1 bei der Erkennung von OvCA-Zellen über seine Liganden (Carlsten et al., 2007). Diese sind PRR-2/Nectin-2/CD112 und der Poliovirusrezeptor CD155/PVR-2. Über die Regulation der DNAM-1-Liganden (DNAM-1-L) war bis dato nichts bekannt. In Abschnitt 3.2.2.4 wurde der Einfluss von endogenem GDF-15 auf die Expression von PRR-2 und CD155 auf OvCA-Zellen untersucht. Beide DNAM-1-Liganden werden auf OvCA-Zelllinien exprimiert, jedoch unterschiedlich stark (Abb. 46): PRR-2 ist generell stärker exprimiert als CD155, besonders auf OaW-42 und SKOV-3. CD155 ist hingegen nur auf SKOV-3 und OVCAR-3 nachweisbar.

Endogene GDF-15-Überexpression führt zu keiner Änderung der PRR-2-Expression auf OVCAR-3, die Expression von CD155 wird jedoch tendenziell herunterreguliert (Abb. 47, A, C), was aus tumorimmunologischer Sicht eine Abschwächung der Immunogenität darstellt.

GDF-15-Defizienz dagegen induziert geringfügig die PRR-2-Expression, während die CD155-Expression unverändert bleibt (Abb. 47, B, D). Wenn überhaupt hat endogenes GDF-15, ähnlich wie bei NKG2D-L, vermutlich einen sekundären Effekt auf die Expression der DNAM-1-L.

Zusammenfassend zeigte GDF-15 hier nur einen geringen autokrinen Nutzen für OvCA-Zellen, der die Überexpression von GDF-15 *in vivo* im OvCA erklären könnte. Zudem ist die autokrine Wirkung von GDF-15 auf OvCA-Zellen individuell unterschiedlich und scheint abhängig von der individuellen endogenen GDF-15-Expression der OvCA-Zellen zu sein. Wahrscheinlich über sekundäre Effekte induziert GDF-15-Defizienz in OvCA-Zellen die Expression der Liganden für den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D und erhöht so deren Immunogenität, während die unter GDF-15-Defizienz erhöhte MHC-I-Expression für CTL sensitiviert. Die hohe GDF-15-Expression im OvCA hat daher vermutlich eher einen parakrinen immunmodulatorischen Nutzen als dass sie dem OvCA autokrin dienen würde.

4.2.2 Parakrine Funktion von GDF-15 auf das Immunsystem von Tumorpatientinnen

Viele Mitglieder der TGF- β -Familie, allen voran TGF- β selbst, sind anti-inflammatorische Zytokine, die die Aktivierung von Immunzellen hemmen und eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten vermitteln (Fontana et al., 1992; Moutsopoulos et al., 2008; Torre-Amione et al., 1990). Auch von GDF-15 wird vermutet, dass es, wie TGF- β , inhibierend auf das Immunsystem wirkt und am „*immune escape*“ von Tumoren beteiligt sein kann (Bauskin et al., 2006; Fujita et al., 2009; Grimm et al., 1988; Strelau et al., 2008). Diese Hypothese wurde bisher jedoch nicht experimentell nachgewiesen. In Abschnitt 3.3 wurde die Wirkung von GDF-15 auf Immunzellen *in vitro*, sozusagen von der parakrinen Seite aus Sicht des OvCA untersucht.

Primäre OvCA-Zellen aus Aszites exprimieren NKG2D-L (Abschnitt 3.2), trotzdem wurden sie vom Immunsystem nicht eliminiert. Im Aszites befinden sich neben Tumor- und Bindegewebszellen auch viele Immunzellen. In den untersuchten Aszitesproben wurden CD8⁺-T-, CD4⁺-T-, T_{reg}- sowie NK- und NKT-Zellen nachgewiesen (Abb. 48). Da sowohl NK- als auch CD8⁺-T-Zellen in unmittelbarer Nähe zum Tumor im Aszites vorhanden waren, scheint die Nicht-Eliminierung trotz nachgewiesener Immunogenität der Tumorzellen auf ein inhibitorisches Milieu im OvCA-Aszites zurückzuführen zu sein (Giuntoli et al., 2009), an welchem GDF-15 beteiligt sein könnte. NK-Zellen sind bei einer Tumorummuntherapie von besonderem Interesse, da sie unabhängig von Antigenerkennung aktiviert werden (Robertson and Ritz, 1990) und damit schnell auf veränderte Gegebenheiten reagieren können. Gleichzeitig wirken sie als Immunmodulatoren, indem sie durch die Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen weitere Faktoren der adaptiven und angeborenen Immunität aktivieren und in die Immunreaktion mit einbeziehen (Smyth et al., 2002). NK-Zellen sind daher v.a. zu Beginn der Tumorentstehung für die Eliminierung von Tumorzellen verantwortlich (Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001; Diefenbach and Raulet, 2001; Kelly et al., 2002) und stellen ideale Kandidaten für einen adoptiven Transfer dar. Vor diesem Hintergrund lag der Fokus der parakrinen GDF-15-Untersuchungen auf NK-Zellen.

4.2.2.1 Modulation der NK-Zell-Lyseaktivität durch GDF-15

Die Vermittlung von Zytotoxizität, die Induktion von Zelltod durch Effektorzellen, ist eine wichtige Aufgabe des Immunsystems. CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen sind die zytotoxischen Effektorzellen des Immunsystems, die entartete oder befallene Zellen über verschiedene Mechanismen eliminieren können. Von TGF- β ist die Fähigkeit bekannt, NK- und CD8⁺-T-Zell-Lyse zu inhibieren (Friese et al., 2004; Rook et al., 1986). Auch GDF-15 inhibiert die Lyseaktivität von NK-Zellen gegen OvCA-Zellen *in vitro* (Abb. 49). Die Lyseeffizienz von GDF-15-vorbehandelten NK-Zellen ist um bis zu 40% niedriger als die unbehandelter NK-Zellen. GDF-15 wurde damit zum ersten Mal eine immuninhibitorische Funktion zugewiesen.

Für die Inhibition der NK-Lyse ist es nicht relevant, ob rekombinantes GDF-15 zur Vorbehandlung von NK-Zellen eingesetzt wird oder ob diese mit GDF-15-haltigem Zellkulturüberstand von GDF-15-überexprimierenden OvCA-Zellen vorbehandelt werden. Die Inhibition mit GDF-15-haltigem Zellkulturüberstand ist jedoch geringer, was vermutlich an der niedrigeren nativen GDF-15-Konzentration liegt (Abb. 50). Umgekehrt lysieren NK-Zellen, die mit dem Zellkulturüberstand von GDF-15-„knock-down“-Zellen (stabil und transient) vorbehandelt wurden ihre OvCA-Targets besser als diejenigen, die mit Kontrollüberstand, der sezerniertes GDF-15 enthielt, vorbehandelt wurden (Abb. 50, 52).

Dazu kommt, dass GDF-15-überexprimierende OvCA-Zellen als Targets von unbehandelten NK-Zellen schlechter lysiert werden als die Kontrollzellen (Abb. 51), während GDF-15-defiziente OvCA-Targets (stabil und transient) besser als ihre Kontrollen lysiert werden (Abb. 51, 52). GDF-15-„knock-down“-Zellen weisen eine erhöhte NKG2D-L-Expression (Abb. 44, 45) auf, wodurch sie von NK-Zellen leichter erkannt werden. Das erklärt die effizientere Lyse von GDF-15-defizienten OvCA-Targets durch

NK-Zellen gegenüber den Kontrollen. Die GDF-15-Überexpression bewirkt tendenziell eine Herunterregulation von NKG2D-L von der Zelloberfläche (Abb. 44), was die NK-Lyse erschwert, die nun hauptsächlich über alternative, evtl. sogar weniger effizientere Mechanismen stattfinden muss, insbesondere da NKG2D als einer der wichtigsten aktivierenden NK-Rezeptoren gilt (Bauer et al., 1999).

TGF- β inhibiert die NK-Zell-Lyse durch Modulation des Rezeptors NKG2D (Eisele et al., 2006). Auch der „*macrophage migration inhibitory factor*“ (MIF) kann die Lysefunktion von NK-Zellen gegen OvCA-Zellen über NKG2D-Modulation hemmen (Krockenberger, Dombrowski et al., 2008). Um zu untersuchen, ob GDF-15 die lytische Aktivität von NK-Zellen vorwiegend über die Modulation von NKG2D inhibiert, wurde dieser Rezeptor während der Lyse von OvCA-Zellen blockiert. Unter der Annahme, dass die Vorbehandlung mit GDF-15 in erster Linie die Herunterregulation von NKG2D zur Folge hat, sollten die Unterschiede zwischen NK-Zellen, die mit GDF-15 inkubiert wurden, und unbehandelten NK-Zellen in Gegenwart des blockierenden Antikörpers verschwinden.

In der Tat ist die Lyseaktivität von NK-Zellen, die mit rhGDF-15 vorbehandelt und deren NKG2D-Rezeptor zusätzlich während der Lyse mit Antikörper blockiert wurde, in etwa so hoch wie die Lyseaktivität der NK-Zellen, die nur mit Antikörper oder nur mit rhGDF-15 inhibiert wurden (Abb. 53). Ein additiver Effekt von GDF-15 und NKG2D-Blockade war demnach nicht zu beobachten. Die Erklärung dafür ist, dass GDF-15 die NKG2D-Expression auf NK-Zellen, z.B. durch Herunterregulation der Expression oder Internalisierung, so moduliert, dass die Blockade von NKG2D durch den Antikörper, der dann keine oder nur noch wenige Antigene binden kann, wirkungslos wird und NKG2D nicht mehr zur Lyse beitragen kann.

DNAM-1 ist ein weiterer wichtiger aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen. Carlsten et al. zeigten, dass die NK-Zell-abhängige Lyse von OvCA-Zellen DNAM-1-abhängig verläuft und zusätzlich durch NKG2D komplementiert wird (Carlsten et al., 2007). Daher wurde auch der aktivierende Rezeptor DNAM-1 mittels Antikörper während der NK-Lyse von OvCA-Zellen blockiert. Im Gegensatz zu NKG2D war die Lyseeffizienz von GDF-15-vorbehandelten NK-Zellen mit zusätzlicher DNAM-1-Blockade noch geringer als bei den Kontrollen, die nur mit GDF-15 vorbehandelt wurden bzw. die nur mit DNAM-1-Antikörper blockiert wurden (Abb. 53). Dieser additive Effekt zeigt, dass GDF-15 keinen Einfluss auf die DNAM-1-Expression von NK-Zellen hat.

4.2.2.2 GDF-15-abhängige Rezeptormodulation

Die bis dato neue Eigenschaft von GDF-15, die NK-Lyseaktivität wie sein naher Verwandter TGF- β zu hemmen, wirft die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen auf. Von TGF- β ist bekannt, dass es Rezeptoren wie den aktivierenden Rezeptor NKG2D auf NK- und T-Zellen modulieren kann und damit die Aktivität dieser Zellen verändert (Friese et al., 2004). Verminderte Aktivität ist gleichbedeutend mit geringerer lytischer Funktionalität. Die Ergebnisse der NKG2D-Blockade während der NK-Lyse deuteten bereits an, dass GDF-15, ähnlich wie TGF- β , durch Rezeptormodulation direkten Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen nehmen kann.

Immuneffektorzellen tragen eine Reihe aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die spezifischen Interaktionen der Immunrezeptoren mit ihren Liganden auf infizierten Zellen oder auf Tumorzellen vermitteln aktivierende und/oder hemmende Signale, die die NK-Zelle im Fall der aktivierenden Rezeptoren aktivieren und zur Lyse führen oder im Fall der hemmenden Rezeptoren inhibieren und damit zur Toleranz gegenüber der Liganden-exprimierenden Zelle führen. Ob die NK-Zellen letztendlich aktiviert oder inhibiert werden, entscheidet sich nach der Verarbeitung aller von stimulierten Rezeptoren eingehenden Signale (Smyth et al., 2005). Die Regulation der NK-Aktivität ist sehr komplex und noch nicht komplett verstanden. Die Herunterregulation eines aktivierenden Rezeptors kann durch die Induktion eines anderen aktivierenden Rezeptors kompensiert werden. Andererseits unterliegen die aktivierenden Rezeptoren häufig der Kontrolle eines inhibierenden Rezeptors. Die GDF-15-abhängige Expression der wichtigsten aktivierenden und inhibierenden NK-Rezeptoren wurde in Abschnitt 3.3.3 durchflusszytometrisch untersucht.

Aktivierende Rezeptoren

NKG2D ist einer der wichtigsten aktivierenden NK-Rezeptoren und ein wichtiger co-stimulatorischer Rezeptor für CD8⁺-T-Zellen. Er nimmt eine Hauptfunktion bei der NK-Zell-vermittelten Lyse von Tumorzellen ein, indem er durch Bindung an seine Liganden die Lyse gegen die Tumorzelle einleitet (Jamieson et al., 2002).

Die Behandlung von NK-Zellen mit rhGDF-15 führt zur Herunterregulation von NKG2D von der Zelloberfläche (Abb. 55, 56). Die Herunterregulation von NKG2D ist nicht auf NK-Zellen beschränkt, sondern wird auch bei CD8⁺-T- und NKT-Zellen beobachtet (Abb. 56). Im Vergleich zur TGF- β -vermittelten Herunterregulation war die GDF-15-abhängige NKG2D-Herunterregulation jedoch schwächer. Zum einen war der Effekt geringer und zum anderen waren höhere GDF-15-Konzentrationen nötig, da das verwendete rekombinante GDF-15 erst in weit höheren Konzentrationen als TGF- β biologisch aktiv war (s.a. Abschnitt 2.2). Die GDF-15-abhängige NKG2D-Regulation war zwar konzentrations-, nicht aber zeitabhängig. Wie bei TGF- β ist die NKG2D-Herunterregulation über den beobachteten Zeitraum von 72 h stabil (Abb. 56).

Analog zu TGF- β wurde hier zum ersten Mal gezeigt, dass auch GDF-15 die Expression des Rezeptors NKG2D auf Immunzellen herunterregulieren kann. GDF-15 ist damit erst das zweite TGF- β -Familienmitglied mit dieser Fähigkeit. Activin A, dessen Einfluss auf die Expression verschiedener NK-Rezeptoren kürzlich untersucht wurde, zeigte nur einen geringen Effekt auf die NKG2D-Expression (Robson et al., 2009).

Ein zweiter aktivierender Rezeptor aus der NKG-Familie, NKG2C, der als Heterodimer mit CD94 auf NK-Zellen assoziiert ist, interagiert mit seinem Liganden HLA-E auf Targetzellen. NKG2C wurde auf den untersuchten NK-Zellen jedoch nicht exprimiert und weder durch GDF-15 noch durch TGF- β 1 induziert (Abb. 60). GDF-15 wirkt demnach ebenso wie TGF- β selektiv auf NKG2D und nicht generell auf Mitglieder der NKG-Rezeptorfamilie. Da NKG2C jedoch nicht eigenständig, sondern in Assoziation mit CD94 exprimiert wird, hat GDF-15 im Gegensatz zu TGF- β 1 auf diesen Rezeptor durch die Induktion von CD94 indirekt Einfluss auf NK-Zellen (Abb. 64). Es ist jedoch davon auszugehen, dass

NKG2C nicht zur Aktivierung der NK-Zellaktivität durch GDF-15 beiträgt, da es praktisch nicht exprimiert wird.

Die „*natural cytotoxicity receptors*“ oder auch NKp-Rezeptoren sind weitere aktivierende Rezeptoren, die nur auf NK-Zellen exprimiert werden. Anhand ihres Molekulargewichts unterscheidet man NKp30, NKp44, NKp46 und NKp80. Von TGF- β weiß man, dass es neben NKG2D auch NKp30 herunterregulieren kann (Castriconi et al., 2003), und auch Activin A konnte NKp30 ebenfalls schwach herunterregulieren (Robson et al., 2009). GDF-15 bewirkt allenfalls eine schwache, jedoch keine signifikante Herunterregulation von NKp30, 44 und 80 (Abb. 60). Im Gegensatz zu TGF- β (und Activin A) hat GDF-15 demnach keinen Einfluss auf die Expression der NKp-Rezeptoren.

Als ein weiterer aktivierender NK-Rezeptor vermittelt DNAM-1 *in vitro* die Aktivierung von NK-Zellen gegen CD155/PVR-2- und PRR-2/CD112/Nectin-2-exprimierende Tumorzellen (Bottino et al., 2003; El-Sherbiny et al., 2007), während seine Expression bei der Immunüberwachung *in vivo* v.a. das Spektrum an Zellen erweitert, die durch zytotoxische Immunzellen erkannt und eliminiert werden können (Gilfillan et al., 2008). Carlsten et al. zeigten, dass die NK-Zell-abhängige Lyse von OvCA-Zellen DNAM-1-abhängig verlaufen kann (Carlsten et al., 2007). Beide DNAM-1-Liganden waren auf OvCA-Zelllinien exprimiert (Abb. 46). Endogene GDF-15-Defizienz bewirkt eine leichte Hochregulation von PRR-2 in OaW-42, während GDF-15-Überexpression in OVCAR-3 CD155 tendenziell herunterreguliert. Die Blockade des aktivierenden Rezeptors DNAM-1 hat keinen Einfluss auf die GDF-15-vermittelte Inhibition der NK-Zell-Lyse an OvCA-Zellen (Abschnitt 3.3.2.3), was gegen einen regulierenden Einfluss von GDF-15 auf DNAM-1 spricht. Auch ein direkter Einfluss von GDF-15 auf die Expression von DNAM-1 auf NK-Zellen wurde nicht beobachtet (Abb. 58). Dieser Rezeptor trägt daher vermutlich nicht zur GDF-15-vermittelten Inhibition von NK-Zellen bei.

CD16 ist der schwach affine Fc γ -Rezeptor III, der die Immunglobuline IgG1 und IgG3 erkennt. Besonders bei der ADCC spielt CD16 eine wichtige Rolle, indem er nach IgG-Bindung die lytische Aktivität von NK-Zellen gegen die mit Antikörpern opsonisierte Zelle initiieren kann. Zusätzlich induziert CD16-Aktivierung die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen (Roda et al., 2006b), was sich wiederum immunmodulatorisch auswirkt. Unter TGF- β 1-Einfluss konvertieren CD16⁺-NK-Zellen zu CD16⁻-NK-Zellen (Dasgupta et al., 2005; Keskin et al., 2007). Auf Monozyten wurde hingegen eine TGF- β -abhängige Induktion der CD16-Expression berichtet (Kawanaka et al., 2002; Kruger et al., 1996; Wong et al., 1991). Hier wurde keine Regulation der CD16-Expression auf NK-Zellen durch GDF-15 oder durch TGF- β 1 beobachtet (Abb. 59), was im Gegensatz zu den Daten von Keskin steht. Jedoch war hier die durchflusszytometrisch gemessene CD16-Expression gering, es handelte sich also nicht um CD16⁺-NK-Zellen wie bei Keskin.

Inhibierende Rezeptoren

Da in den „Netto“-Aktivierungsstatus von NK-Zellen Signale von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren gleichermaßen einfließen, wurden auch wichtige inhibitorische NK-Rezeptoren auf GDF-15-abhängige Regulation untersucht.

NKG2A ist ein inhibierender Rezeptor aus der NKG-Familie. NKG2A ist auf NK- und T-Zellen exprimiert und assoziiert mit dem Rezeptor CD94. Der Ligand dieses Rezeptorkomplexes ist der gleiche wie für NKG2C/CD94, HLA-E, welches auf vielen Zellen und Geweben, u.a. Tumoren, exprimiert ist (Wei and Orr, 1990; Wischhusen et al., 2007).

Im Gegensatz zu NKG2C war NKG2A zwar auf NK-Zellen exprimiert, jedoch wurde keine Regulation durch GDF-15 oder TGF- β 1 beobachtet (Abb. 60). Gunturi et al. berichteten, dass TGF- β 1 die Expression von NKG2A/CD94 auf murinen CD8⁺-T-Zellen, nicht jedoch auf NK-Zellen, induzieren kann (Bertone et al., 1999; Gunturi et al., 2005).

CD94 war durch GDF-15 zwar nur schwach, aber signifikant induziert (Abb. 64). CD94 selbst besitzt keine Signalweiterleitungsfunktion, es kann also nur in Abhängigkeit seines Assoziationspartners, NKG2A oder NKG2C, Signale weiterleiten. Über die Induktion der CD94 Expression hat GDF-15 also einen indirekten Einfluss auf die Aktivität von NKG2A, was zur Inhibition der NK-Zellen beitragen kann, insbesondere, da es im Gegensatz zu NKG2C exprimiert ist.

Wichtige inhibitorische NK-Rezeptoren sind die „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIR). KIR-Liganden sind die HLA-I-Antigene, die auf allen kernhaltigen Körperzellen vorkommen. Zur KIR-Familie gehören sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren, die sich alle durch den Besitz von mindestens einer Ig-Domäne auszeichnen. In Tab. 33 sind die wichtigsten KIR zusammengefasst. Nicht jeder Mensch exprimiert das gleiche Spektrum an KIR auf seinen NK-Zellen, so dass donorspezifische Unterschiede auftreten (Gardiner, 2008; Valiante et al., 1997).

Die Abb. 61 und 62 verdeutlichen, dass die KIR-Expression (generell und speziell die der KIR CD158a/h, e und i) durch GDF-15 nicht beeinflusst wird. TGF- β hingegen induziert schwach die KIR-Expression auf NK-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass TGF- β die Expression von CD158 herunterreguliert (Shin et al., 2004). In welcher Form sich dies auf den Aktivierungsstatus von NK-Zellen auswirkt, ist schwer zu beurteilen, da die KIR-Familie sowohl inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren einschließt. Um genauen Aufschluss über die Regulation der einzelnen KIR durch TGF- β zu erhalten, müsste dies für jeden Rezeptor einzeln untersucht werden.

Der inhibierende Rezeptor „leukocyte antigene Ig like receptor 1“ (LAIR-1), auch als CD305 bekannt, wird auf NK-Zellen durch GDF-15 zwar schwach, aber im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen signifikant induziert (Abb. 63). CD305 vermittelt die Bindung an Kollagen (Lebbink et al., 2006) und initiiert die Blockade von NK-Zellen durch Bindung an seine Kollagenliganden wie EpCAM, auf Tumorzellen (Lebbink et al., 2006; Meyaard, 2008; Meyaard et al., 2001). Auch CD8⁺-T-Zellen werden *in vitro* durch „crosslinking“ mittels CD305-Antikörper gehemmt (Meyaard, 2008; Meyaard et al., 1997; Meyaard et al., 1999).

Die Induktion von CD305 durch GDF-15 auf NK-Zellen erhöht das Potential, hemmende Signale durch Kollagenbindung (z.B. über EpCAM) zu empfangen und damit aktivierende Signale abzuschwächen, wodurch NK-Zellfunktionen letztendlich blockiert werden. Tumorzellen regulieren die Expression von CD305-Liganden (ECM- und Transmembrankollagen) auf ihrer Zelloberfläche hoch, so dass infiltrierende Immunzellen mit CD305 nach Kontakt mit Kollagen inhibiert werden (Lebbink et al., 2006; Meyaard, 2008; Meyaard et al., 2001). Primäre, aus Aszites isolierte OvCA-Zellen exprimieren

EpCAM-1, was *in vivo* zur Blockade von CD305-positiven NK-Zellen führen kann. CD305-Aktivierung führt *in vitro* zur Freisetzung von TGF- β 1 (Saverino et al., 2002), was die immuninhibitorische Wirkung zusätzlich verstärken kann.

Die Ergebnisse der Rezeptormodulation deuten darauf hin, dass GDF-15 den Aktivierungsstatus von NK-Zellen hemmt. Dies spiegelt sich auch in der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 wieder. CD69 ist ein Rezeptor, der nach Aktivierung auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen an der Oberfläche hochreguliert wird. Auf ruhenden Immunzellen wurde CD69 nicht detektiert. CD25, die Alphakette des IL-2-Rezeptors, ist exprimiert auf aktivierten T-, B- und NK-Zellen sowie auf T_{reg} und DC. Während CD69 auf einer großen Anzahl von TIL exprimiert wird, ist die Expression von CD25 auf eine geringe Anzahl von TIL beschränkt und korreliert gut mit dem anti-tumorigenen Potenzial und dem Aktivierungsstatus von T-Zellen (Ladanyi et al., 2004). Wie aufgrund der bisherigen Daten zu erwarten war, sind CD25 und CD69 unter GDF-15- und auch unter TGF- β 1-Einfluss nicht induziert (Abb. 65), NK-Zellen also nicht aktiviert.

Die Rezeptoranalyse zeigt viele Analogien zwischen den verwandten Zytokinen TGF- β 1 und GDF-15 auf. Am deutlichsten zeigt sich die Analogie bei der Herunterregulation des aktivierenden Rezeptors NKG2D. Hier ist lediglich die Stärke der Herunterregulation verschieden, was in der biologischen Aktivität der rekombinanten Zytokine begründet sein kann. Alle weiteren aktivierenden Rezeptoren werden durch GDF-15 und TGF- β 1 nicht beeinflusst. Einzige Ausnahme: NKp30, dessen Expression von TGF- β 1, nicht jedoch von GDF-15 herunterreguliert wird. Die inhibitorischen Rezeptoren CD94 und CD305 werden durch GDF-15 induziert; welche Wirkung TGF- β auf diese hat, wurde hier nicht analysiert (Tab. 52: Analogie der Rezeptorregulation von GDF-15 und TGF- β 1).

Tab. 52: Analogie der Rezeptorregulation von GDF-15 und TGF- β 1.

	Rezeptor	GDF-15	TGF- β 1	Referenz
aktivierend	NKG2D	↓	↓	(Friese et al., 2004)
	NKG2C	-	-	
	DNAM-1	-	-	
	NKp30	-	↓	(Castriconi et al., 2003)
	NKp44, 46, 80	-	-	
	CD16	-	-	(Dasgupta et al., 2005; Keskin et al., 2007)
inhibierend	NKG2A	-	-	(Bertone et al., 1999; Gunturi et al., 2005)
	KIR	-	↑	(Shin et al., 2004)
	CD305	↑	n.a.	
	CD94	↑	n.a.	

n.a.=nicht analysiert

Zusammengefasst wirkt GDF-15 durch den Einfluss auf verschiedene aktivierende und inhibierende NK-Rezeptoren wie TGF- β immuninhibierend, was es als parakrinen Immunmodulator mit Nutzen für den „*tumor immune escape*“ kennzeichnet.

4.2.2.3 Lysefunktionalität unter GDF-15-Einfluss

Die zytotoxische Eigenschaft von NK-Zellen beruht auf der Induktion von Apoptose durch Todesliganden (FasL, TRAIL) sowie durch die Wirkung lytischer Granula bzw. deren Inhalt, Granzyme A und B sowie Granulysin und Perforin. Granzyme sind Serin-Proteasen, die im Fall von Granzym A Caspase-unabhängig Apoptose induzieren und im Fall von Granzym B über die Aktivierung von Caspase-3 Apoptose einleiten (Salvesen and Riedl, 2008; Waterhouse et al., 2006). Der Mechanismus der Granulawirkung ist noch nicht ganz aufgeklärt. Diskutiert werden aufgrund verschiedener Befunde drei Theorien, die Aufnahme über Perforinporenbildung (Liu et al., 1995a; Liu et al., 1995b), die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-abhängige Aufnahme (Motyka et al., 2000) bzw. die Ca^{2+} -abhängige Aufnahme von Granzym B (Keefe et al., 2005; Trapani and Sutton, 2003; Trapani et al., 2003) (siehe auch Abschnitt 3.3.4.2). Unabhängig von der Theorie sind für die lytische Wirkung Perforin und Granzyme notwendig. Insbesondere bei Perforin-„knock-out“-Mäusen wurde eine vermehrte Tumorentstehung nachgewiesen, was maßgeblich dazu beigetragen hat, dass die Überwachungsfunktion des Immunsystems gegenüber Tumoren heute kaum noch angezweifelt wird (Smyth et al., 2000).

GDF-15 hatte keine signifikante Auswirkung auf die Perforinexpression, jedoch war die Granzym B (GranB)-Expression durch GDF-15 in NK-Zellen signifikant reduziert (Abb. 67). Auch TGF- β reduzierte tendenziell die GranB-Expression in polyklonalen NK-Zellen. Die Reduktion der lytischen Granula schränkt die Lysefunktion der NK-Zellen drastisch ein. Neben Perforin und GranB sind weitere lytische Enzyme in Granula enthalten (GranA und Granulysin), die hier nicht analysiert wurden und auf die GDF-15 möglicherweise keinen Einfluss hat, so dass diese den Verlust von GranB neutralisieren könnten. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Fähigkeit von GDF-15, die GranB-Expression zu hemmen, mit zur inhibitorischen Wirkung von GDF-15 beiträgt.

CD107a, ein lysosomales Membranprotein, wird wie CD107b und CD63 an der Oberfläche von Zellen nach Degranulation exprimiert (Betts et al., 2003; Chan and Kaur, 2007). Die Expression von CD107a an der Zelloberfläche ist daher proportional zur Freisetzung des Granulainhalts und damit zur zytotoxischen Funktion von NK-Zellen. Es wurde tendenziell weniger CD107a unter GDF-15- und v.a. unter TGF- β 1-Einfluss (TGF- β 1: $p=0,06$; GDF-15: $p=0,19$) an der Oberfläche von aktivierten (p)NK-Zellen detektiert (Abb. 68). Demnach war auch die Granulafreisetzung eingeschränkt und damit die Lysefunktion der NK-Zellen durch TGF- β 1 (und schwach durch GDF-15) gehemmt. Der Effekt von GDF-15 auf die Granulafreisetzung kann nichtsdestotrotz mit zur gesamten Immuninhibition von GDF-15 beitragen.

Damit wurde gezeigt, dass GDF-15 über zwei Mechanismen die Lysefunktionalität von aktivierten NK-Zellen einschränkt: über die Reduktion der GranB-Expression und über die verringerte Freisetzung lytischer Granula.

4.2.2.4 GDF-15 und Immunzellapoptose

Spezifische Apoptoseinduktion in Tumorzellen ist ein wichtiges Ziel der Tumorthherapie (Fulda et al., 2002; Rohn et al., 2001). Andererseits können Tumore dadurch, dass sie Liganden für Todesrezeptoren exprimieren, Apoptose in Todesrezeptor-tragenden infiltrierenden Immunzellen auslösen (Bennett et al., 1998; O'Connell et al., 1997; Strand et al., 1996; Whiteside, 2002). Mitglieder der TGF- β -Superfamilie können sowohl anti- als auch pro-apoptotische Funktionen ausüben (Huang et al., 2000; Sanchez-Capelo, 2005; Schuster and Kriegstein, 2002; Valderrama-Carvajal et al., 2002). Dies ist in erster Linie vom Zelltyp und dem Zellzyklus- bzw. dem Tumorstadium abhängig (Siegel and Massague, 2003). GDF-15 hatte auf verschiedene Tumore eine pro-apoptotische und damit anti-tumorigene Wirkung (Baek et al., 2001; Baek et al., 2002a; Jang et al., 2004; Kim et al., 2008a; Kim et al., 2005; Pang et al., 2007). Andererseits gibt es Beobachtungen, die GDF-15 eine anti-apoptotische bzw. pro-tumorigene Rolle im Tumor zuschreiben (Appierto et al., 2007; Kim et al., 2008a; Kim et al., 2008b; Lim et al., 2007; Pang et al., 2007; Shin et al., 2008). Über die in dieser Arbeit zum ersten Mal untersuchte apoptotische Wirkung von GDF-15 auf Immunzellen war bislang nichts bekannt.

rhGDF-15 und rhTGF- β 1 induzieren per se keine Apoptose in Immunzellen (Abb. 69). Wenn die Apoptose jedoch mit FasL in Immunzellen induziert wird, verstärkt GDF-15, nicht jedoch TGF- β 1, die FasL-induzierte Apoptose im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 70). Dieser Effekt ist spezifisch für die FasL-induzierte Apoptose, da TNF- α - und TRAIL-induzierte Apoptose unbeeinflusst von GDF-15 ist (Abb. 71).

In vivo wird FasL von Tumorzellen, aber auch von aktivierten Immunzellen selbst exprimiert, entweder membranständig oder als löslicher FasL („soluble FasL“, sFasL) (Bennett et al., 1998; O'Connell et al., 1997; Screpanti et al., 2001; Strand et al., 1996; Whiteside, 2002). Reife NK-Zellen töten ihr Ziel hauptsächlich über Fas und Perforin (Zamai et al., 1998). Restifo beschrieb, dass FasL von aktivierten Lymphozyten in CD95-exprimierenden Lymphozyten Apoptose induziert (O'Connell et al., 2001; Restifo, 2000, 2001). Dieser Vorgang wird als „activation-induced cell death“ (AICD) oder als fratricide Apoptose bezeichnet, da sie unter gleichartigen Zellen stattfindet. In der Immunzellhomöostase spielt diese Art der induzierten Apoptose bei der Eindämmung der Immunantwort nach erfolgreicher Antigen-Eliminierung eine wichtige Rolle (Brunner et al., 1995; Callard et al., 2003; Ju et al., 1995; Krammer, 2000).

Durch Blockade von FasL und TRAIL wurde der Einfluss von GDF-15 auf die fratricide Apoptose *in vitro* untersucht. Generell war die gegenseitige Apoptoseinduktion unter den Immunzellen *in vitro* gering. Weder die Blockade von FasL noch von TRAIL änderte den Anteil der apoptotischen Immunzellen, noch war die AICD über FasL bzw. TRAIL von GDF-15 beeinflusst (Abb. 72). TNF- α -induzierte Apoptose wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht, doch höchstwahrscheinlich spielt GDF-15 keine Rolle bei der AICD von Immunzellen.

Auf der Suche nach dem Mechanismus der von GDF-15 verstärkten, FasL induzierten Apoptose wurde die Expression des FasL-Rezeptors CD95/Fas auf Immunzellen untersucht. Es zeigte sich, dass GDF-15 signifikant die Expression von Fas auf der Oberfläche von Immunzellen induziert (Abb.

73). Auch TGF- β 1 induziert schwach, aber nicht signifikant dessen Expression. Durch Bindung des Fas-Liganden an seinen Rezeptor kommt es unter GDF-15-Einfluss daher zur verstärkten Apoptose in Immunzellen *in vitro*.

Von Tumoren ist bekannt, dass sie FasL sowohl membranständig als auch löslich produzieren. Auch im OvCA wird Fas und FasL exprimiert, wobei Fas in Borderline-Tumoren und FasL im malignen OvCA induziert ist (Das et al., 2000; Rabinowich et al., 1998; van Haaften-Day et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass der Mechanismus der GDF-15-abhängigen Induktion von Fas *in vivo* im OvCA ebenfalls zum Tragen kommt. Damit ist eine weitere immunmodulatorische Funktion von GDF-15 aufgedeckt, die zur Inhibition des Immunsystems und damit zum „*tumor immune escape*“ *in vivo* beitragen kann.

Keinen Einfluss hatte GDF-15 auf die Expression der „*death receptors*“ DR4 und DR5 in Immunzellen. Die generell sehr geringe Expression von DR4 und DR5 erklärt auch die Beobachtung, dass TRAIL keine Apoptose in Immunzellen induzieren kann (Abb. 74).

Zusammengefasst beruht die GDF-15-abhängige Inhibition der NK-Lyseaktivität auf mehreren Säulen: der Modulation von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren auf der NK-Oberfläche, der Regulation der Granulaexpression und -freisetzung und schließlich auf der Verstärkung der FasL-induzierten Apoptose durch Induktion von Fas auf Immunzellen.

Für die Lyse von GDF-15-sezernierenden OvCA-Zellen muss die NK-Zelle daher auf GDF-15-unabhängigen Mechanismen, z.B. über DNAM-1 zurückgreifen. Die beobachtete Restaktivität der NK-Zellen gegen OvCA-Targets im Lyseassay (Abb. 49) beruht auf diesen verbleibenden GDF-15-unabhängigen Zytotoxizitätsmechanismen.

4.3 GDF-15-abhängige Signaltransduktion und Genexpression

Die Kenntnis von Signaltransduktionsmechanismen kann Grundlage sein für mögliche Angriffspunkte neuer Tumorthérapien. Daher ist es wichtig, die Wirkweise von GDF-15 in OvCA-Zellen selbst, aber v.a. auch in Immunzellen zu analysieren. Die TGF- β -Signaltransduktion ist gut entschlüsselt und läuft v.a. über die SMAD-Proteine (Massague et al., 2000). Aber auch SMAD-unabhängige Signalwege sind bekannt (Abb. 75; Ago and Sadoshima, 2006). Aufgrund der funktionalen Analogie von TGF- β und GDF-15 war es denkbar, dass die Vermittlung ihrer Wirkung über ähnliche Wege auf und in Zellen verläuft. Die Signaltransduktion von GDF-15 in Anlehnung an TGF- β wurde in Abschnitt 3.4 untersucht.

4.3.1 Signaltransduktion in Ovarialkarzinomzellen

Zunächst sollte die Wirkung von GDF-15 in einem funktionalen TGF- β -Bioassay untersucht werden. Biologisch aktives TGF- β kann in der TGF- β -sensitiven Lungenepithelzelllinie CCL-64 detektiert werden, die mit Wachstumsarrest auf TGF- β reagiert. Im Gegensatz zu rhTGF- β 1 hat rhGDF-15 jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation von CCL-64-Zellen (Abb. 76). Die Wirkmechanismen von TGF- β und GDF-15 sind demnach in dieser Zelllinie verschieden. Möglich wäre auch, dass der bis dato unbekannte GDF-15-Rezeptor auf dieser Zelllinie oder aber GDF-15-abhängige Signalkomponenten von CCL-64 nicht exprimiert werden und deshalb kein Effekt zu beobachten ist.

Ein erster Anhaltspunkt für GDF-15-Signaltransduktion in OvCA-Zellen ergab sich aus der Analyse von TGF- β -sensitiven Reportergenen. Diese überwiegend SMAD-abhängigen Reporter-elemente werden aktiviert, wenn die zu untersuchende Substanz, hier GDF-15, SMAD-Signalkomponenten in der Zelle aktiviert. Die SMAD-Reporter-elemente (p3TP, p154xSBR, pMBE6, pSBE2) wurden, wie erwartet, von TGF- β in OvCA-Zellen, z.T. zelltypspezifisch induziert. Der c-myc-Repressionsreporter, der Antioxidant-Reporter und der TGF- β -Gen-Reporter wurden dagegen durch TGF- β 1 in OvCA-Zellen reprimiert. Auch GDF-15 aktivierte einige, aber nicht alle SMAD-abhängigen Reporter-elemente (p3TP, p154xSBR, pMBE6) zelltypspezifisch in OvCA-Zelllinien (Abb. 77). Der c-myc-Repressionsreporter wurde im Gegensatz zu TGF- β durch GDF-15 schwach induziert, während analog zu TGF- β der Antioxidant-Reporter und der TGF- β -Gen-Reporter im Vergleich zur Kontrolle reprimiert wurden.

Die Reporteranalysen sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass GDF-15 in OvCA-Zellen über SMAD-Signaltransduktion betreiben kann. Auch Activin A sowie BMPs wirken über SMAD-Aktivierung (Robson et al., 2009). Dass GDF-15 über SMAD2/3-Signaltransduktion betreiben kann, ist bereits von Kardiomyozyten bekannt, die ebenfalls nach GDF-15-Behandlung über SMAD2/3 Signale weiterleiten (Kempf et al., 2006). Welche SMAD-Proteine GDF-15 in OvCA-Zellen aktiviert, konnte in diesem Assay nur indirekt bestimmt werden. Da es sich jedoch um TGF- β -Reporter-gene handelt, die über SMAD2/3-Signaltransduktion laufen, aktiviert GDF-15 mit hoher Wahrscheinlichkeit wie TGF- β SMAD2/3-Proteine in OvCA-Zellen.

Alternativ zur SMAD-Signaltransduktion können TGF- β -Signale über eine Aktivierung von JNK, p38, PI3K/AKT und ERK laufen (Abb. 13 Alternative Signaltransduktion von TGF- β) (Engel et al., 1999; Hanafusa et al., 1999). Auch GDF-15 kann SMAD-unabhängig Signaltransduktion betreiben. AKT-Aktivierung führte in Brusttumor-zellen einerseits zu einer Induktion der Expression von GDF-15, andererseits verlängerte das durch AKT induzierte GDF-15 die ERK-1-Aktivierung (Wollmann et al., 2005). Diese Ergebnisse stellen GDF-15 in Brusttumor-zellen als Mediator des AKT- und ERK-Signalweges dar. AKT ist eine wichtige Serin-Threonin-Kinase, die das Zellüberleben reguliert und daher in einigen Tumoren konstitutiv aktiviert ist, u.a. im OvCA und Mamma-CA (Bellacosa et al., 1995; Hutchinson et al., 2004; Sun et al., 2001). In Abschnitt 3.4.1 wurde gezeigt, dass AKT durch GDF-15 in OvCA-Zellen phosphoryliert und damit aktiviert wird (Abb. 78). Allerdings ist die Stärke des

von GDF-15 induzierten Signals in den untersuchten Zelllinien verschieden. Die Zelllinie, die am meisten GDF-15 produziert (OaW-42), zeigt das stärkste Signal nach Zugabe von exogenem GDF-15, diejenige mit der niedrigsten GDF-15-Produktion (OVCAR-3) das schwächste. Hohe GDF-15-Produktion kann demnach zur autokrinen AKT-Aktivierung in OvCA-Zellen führen, was das Überleben der Zellen sicher stellt. Wahrscheinlich haben OvCA-Zellen, die wenig GDF-15 produzieren, andere Mechanismen entwickelt, die zum Überleben der Zellen beitragen. In einer Studie von Kim et al. wurde gezeigt, dass GDF-15 AKT und ERK-1/2 über die Aktivierung von ErbB2 in Brusttumorzellen und gastrointestinalen Tumorzellen aktiviert (Kim et al., 2008d). ErbB2/Her2/neu ist in vielen Tumoren überexprimiert, so auch im OvCA (Allgayer et al., 2000; Slamon et al., 1989). Signaltransduktion von GDF-15 über diesen Rezeptor und anschließende AKT/ERK-Phosphorylierung wäre daher denkbar. GDF-15-defiziente OaW-42 zeigen im Gegensatz zu den ursprünglichen OaW-42 eine konstitutive AKT-Aktivierung, die unabhängig von GDF-15 ist und durch rhGDF-15 auch nicht weiter induziert wird (Abb. 79). Möglicherweise reagiert die Tumorzelle mit kompensatorischen Mechanismen auf die Herunterregulation von GDF-15, was sich u.a. in der konstitutiven AKT-Phosphorylierung äußert.

Auch die 46 kDa-Form der Stress-assoziierten Kinase JNK wurde analog zu TGF- β 1 unter GDF-15-Einfluss in SKOV-3 aktiviert, jedoch nur bei hohen Konzentrationen (Abb. 80). Die JNK-Aktivierung war zudem zelltypspezifisch. Inwieweit der JNK-Signalweg daher *in vivo* eine Rolle bei der GDF-15-Signaltransduktion spielt, ist fraglich. Andererseits ist bekannt, dass GDF-15 über JNK-Aktivierung im OvCA induziert werden kann (Appierto et al., 2009). Möglicherweise ist dies ein Indiz für einen autokrinen Regulationskreis.

4.3.2 Signaltransduktion in Immunzellen

Von der Wirkung und Signaltransduktion von GDF-15 in Immunzellen war, im Gegensatz zu Tumoren, bis dato nichts bekannt. Für das OvCA konnte gezeigt werden, dass GDF-15 SMAD-Reportergene aktivieren und damit wie TGF- β diesen Signalweg nutzen kann. Von GDF-15 wurde berichtet, dass es für seine inhibitorische Funktion in Tumorzellen ebenfalls den TGF- β -Signaltransduktionsweg benutzt (Tan et al., 2000). Auch in neonatalen Kardiomyozyten und Prostata-CA-Zellen wurde eine Beteiligung der SMAD-Proteine bei der GDF-15-Signaltransduktion beobachtet (Vanhara et al., 2009; Xu et al., 2006b). Aufgrund der Analogie zu TGF- β und der bekannten Daten war die Beteiligung von SMAD-Proteinen bei der GDF-15-Signaltransduktion in Immunzellen daher sehr wahrscheinlich.

In Abschnitt 3.4.2 wurde gezeigt, dass GDF-15 in Immunzellen SMAD2/3 aktivieren kann (Abb. 81, 82). Die Phosphorylierung von Signalproteinen ist ein schneller Prozess, der bereits nach wenigen Minuten erfolgen kann. Bei TGF- β erfolgt die SMAD2/3-Phosphorylierung in Immunzellen bereits innerhalb der ersten 5 Minuten. Im Gegensatz zu TGF- β wird SMAD2/3 durch GDF-15 aber erst nach mehr als 24 h phosphoryliert, bleibt dafür aber über 72 h hinaus stabil. Dies spricht gegen eine direkte Phosphorylierung durch GDF-15. Es ist daher wahrscheinlich, dass GDF-15 sekundär die SMAD2/3-Phosphorylierung induziert, evtl. durch Induktion eines Proteins aus der TGF- β -Superfamilie, vielleicht

sogar TGF- β selbst, was sich jedoch zumindest in NK-Zellen nicht bestätigte (Abschnitt 3.4.3). Die Signaltransduktionsanalysen zeigen, dass GDF-15 zeitlich verzögert über den TGF- β -Signalweg wirkt, was die schwächere immuninhibitorische Eigenschaft im Vergleich zu TGF- β 1 möglicherweise erklären könnte.

GDF-15 als eigenständiger Faktor innerhalb der TGF- β -Superfamilie, mit Eigenschaften von TGF- β und BMP, könnte auch analog zu den BMPs Signaltransduktion betreiben. SMAD1/5/8, welche typischerweise durch Mitglieder der BMP phosphoryliert werden, werden durch GDF-15 in Immunzellen jedoch nicht aktiviert (Abb. 83). In Kardiomyozyten hingegen konnte GDF-15 *in vitro* sowohl SMAD2/3 als auch SMAD1/5/8 phosphorylieren (Kempf et al., 2006).

In Immunzellen schien TGF- β 1 ebenfalls die Phosphorylierung von SMAD1/5/8 zu bewirken (Abb. 83), gleiches wurde bereits in Kardiomyozyten beobachtet. Die Aktivierung von SMAD1/5/8 durch TGF- β 1 in Immunzellen könnte jedoch auf sekundäre Effekte durch BMPs zurückzuführen sein. In Abschnitt 3.4.3 wurde gezeigt, dass TGF- β 1-Behandlung von NK-Zellen zur Induktion der BMP8a-Expression führt, welches dann möglicherweise autokrin SMAD1/5/8 aktiviert (Tab. 36).

TGF- β kann alternativ zum SMAD-Signalweg auch andere Signalwege aktivieren, u.a. AKT/PKB oder JNK (Abb. 75). In Mamma-CA-Zellen und auch im OvCA verlief die GDF-15-Signaltransduktion über AKT-Phosphorylierung (Kim et al., 2008d; Wollmann et al., 2005, Abschnitt 3.4.1). In Immunzellen jedoch hat GDF-15 keinen Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung (Abb. 84) und auch ERK-1/2, welches in Brusttumorzellen *in vitro* durch GDF-15 aktiviert wurde (Subramaniam et al., 2003; Wollmann et al., 2005), ist in Immunzellen unter GDF-15-Einfluss nicht aktiviert. AKT-Signaltransduktion durch GDF-15 erfolgt demnach zelltyp- und zellartspezifisch.

Die p38/MAPK gehört wie JNK ebenfalls zur Gruppe der „mitogen-activated protein kinases“ und wird unter Zellstress aktiviert. TGF- β kann alternativ zu SMAD auch über p38 Signale weiterleiten (Santander and Brandan, 2006). In der Prostata-Zelllinie LNCaP wurde GDF-15-abhängige Aktivierung von p38 und SMAD2/3 berichtet (Vanhara et al., 2009). In Kardiomyozyten hingegen konnte durch GDF-15 keine p38-Aktivierung beobachtet werden (Kempf et al., 2006). In Immunzellen aktiviert GDF-15 ebenfalls spezifisch die p38/MAPK, während TGF- β keinen Einfluss auf die p38-Aktivierung hat (Abb. 85). Auch hier spiegelt sich die zelltyp- und zellartspezifische Signaltransduktion von GDF-15 wieder. Durch Aktivierung der p38/MAPK kann GDF-15 in viele zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Wachstum, Apoptose oder Inflammation der Immunzellen eingreifen (Wagner and Nebreda, 2009).

Die „JUN-amino-terminal kinase“ (JNK) wird durch verschiedene zelluläre Stressfaktoren, z.B. Zytokine und Wachstumsfaktoren, aktiviert. In SKOV-3-Zellen war die 46 kDa große Bande von JNK unter TGF- β - und GDF-15-Einfluss induziert. In Immunzellen wurde dagegen eine Induktion der 54 kDa-Bande bei TGF- β 1 und bei hohen GDF-15-Konzentrationen beobachtet (Abb. 86). GDF-15 könnte daher in die zelluläre Aktivität der Immunzellen über JNK, das beim Zellwachstum, im

Metabolismus, in der Apoptose und bei der DNA-Reparatur involviert ist, regulierend eingreifen (Johnson and Nakamura, 2007).

Ein besonders wichtiger Signalweg in Immunzellen ist der JAK-STAT-Signalweg. Nach Bindung von Zytokinen an ihre Rezeptoren wird JAK über Phosphorylierung aktiviert. JAK wiederum aktiviert STAT-Proteine, die die Signale bis in den Kern weiterleiten. In vielen Tumoren, in denen STAT3 die Apoptose und Zellproliferation beeinflusst, wurde es konstitutiv aktiviert gefunden (Alvarez et al., 2006; Klampfer, 2006; Yin et al., 2006). Die immuninhibitorische Wirkung lässt vermuten, dass GDF-15 direkten Einfluss auf wichtige Immunsignalwege wie den JAK-STAT-Signalweg hat. Es konnte jedoch keine Aktivierung von STAT1 oder STAT3 in Immunzellen unter GDF-15- oder TGF- β -Einfluss beobachtet werden (Abb. 87).

Zusammengefasst zeigen sich einige Unterschiede bei der Signaltransduktion von GDF-15 und TGF- β 1 in Immunzellen. GDF-15 aktiviert ähnlich wie TGF- β SMAD2/3 in Immunzellen, höchstwahrscheinlich aber infolge eines sekundären Effekts, da die Phosphorylierung erst nach 24 h auftritt. Das steht anderen Aussagen entgegen, die SMAD-Phosphorylierung durch GDF-15 bereits nach wenigen Minuten beobachteten (Kempf et al., 2006), was die zellspezifische Wirkung dieses Zytokins verdeutlicht. Analog zu TGF- β wird unter GDF-15-Einfluss die 54 kDa große JNK-Bande phosphoryliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass GDF-15, nicht jedoch TGF- β 1, die p38/MAPK in Immunzellen aktiviert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass GDF-15 sehr zellspezifisch wirkt, was mit dem intrazellulären Vorhandensein von Adaptormolekülen oder „downstream“-Signalmolekülen in den verschiedenen Zelltypen zusammenhängen kann. Möglicherweise sind noch weitere Faktoren wie Differenzierungsstadium der Zelle oder das Mikromilieu mitentscheidend dafür, welcher Signalweg durch GDF-15 in der Zelle aktiviert wird.

Um einen Einblick in die GDF-15-abhängige Immunrezeptoraktivierung zu bekommen, wurden GDF-15- (und TGF- β -) behandelte Immunzellen im „*Human Phospho-Immuneceptor-Array*“ (R&D Systems) untersucht. 59 Immunrezeptoren mit ITAM/ITIM-Signaldomäne konnten so zeitgleich untersucht werden. Die Art der Aktivierung (direkte Wirkung zurückzuführen auf das Zytokin per se oder indirekte Wirkung über sekundäre Effekte) kann mit diesem Array jedoch nicht nachvollzogen werden, da alle zum Zeitpunkt der Analyse phosphorylierten Rezeptoren detektiert werden. Durch die kurze Inkubationszeit der Immunzellen mit den Zytokinen (20 min) sollte jedoch überwiegend die direkte Wirkung auf die Rezeptoren beobachtet worden sein. Nichtsdestotrotz könnten in der kurzen Zeitspanne bereits sekundäre Effekte auftreten.

Generell zeigt sich ein ähnliches Aktivierungsmuster der Immunrezeptoren durch TGF- β 1 und GDF-15, was die Analogie der beiden Zytokine verdeutlicht. Unterschiede waren marginal und primär in der Stärke der Signale verschieden (Abb. 88). Beide Zytokine aktivierten sowohl inhibierende wie auch aktivierende Rezeptoren.

Die „*sialic acid binding Ig-like lectins*“ (Siglec) sind Transmembranrezeptoren der Ig-Superfamilie. Sie binden Kohlenhydrate und vermitteln darüber Zelladhäsion (Crocker et al., 1998; Crocker and Varki, 2001). Siglec-2, -5, -7 und -10 waren nach TGF- β 1- bzw. GDF-15-Behandlung aktiviert. Diese gehören, außer Siglec-2, der CD33-Gruppe von inhibierenden Siglec-Rezeptoren mit ITIM-Domäne an. Ihre Aktivierung verstärkt den immuninhibitorischen Effekt der beiden Zytokine.

Die „*Ig-like transcripts*“ (ILT)-Rezeptorfamilie ist auch bekannt als CD85-Rezeptorfamilie oder „*leukocyte Ig-like receptors*“ (LILR) und besteht aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. ILT-2 und -3 vermitteln inhibitorische Signale nach Bindung ihrer Liganden, den MHC-Klasse I-Molekülen (Allan et al., 2000); ILT-6 besitzt keine zytoplasmatische Domäne zur Signalweiterleitung und ist wahrscheinlich ein löslicher Rezeptor (Wisniewski et al., 2003). Die Behandlung von Immunzellen mit GDF-15 bzw. TGF- β 1 aktiviert mit ILT-2 und -3 weitere inhibitorische Rezeptoren in Immunzellen, die mit zum gesamtimmuninhibitorischen Effekt beitragen können, wenn die Targetzellen HLA-I-Moleküle exprimieren (Long, 2002), was für OvCA-Zellen gezeigt wurde (Abschnitt 3.2.2.4.1).

CEACAM-1/CD66a war durch GDF-15 und TGF- β 1 in PBL ebenfalls aktiviert. Es vermittelt über homo- und heterophile Interaktionen Zelladhäsion und reguliert Immunantworten, u.a. inhibiert es die Zytotoxizität von NK-Zellen (Markel et al., 2002). Die Aktivierung von CEACAM-1 durch GDF-15 bzw. TGF- β 1 kann somit zur insgesamt hemmenden Wirkung von GDF-15 bzw. TGF- β 1 auf Immunzellen beitragen.

Die CD2-zugehörige „*signaling lymphocyte activation molecule*“ (SLAM)-Rezeptorfamilie besteht aus Typ I-Transmembranrezeptoren mit Ig-Domäne. Mitglieder der SLAM-Familie sind SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME und CD2F-10 (Stark and Watzl, 2006; Veillette, 2006; Veillette and Latour, 2003). Ihre Deregulation scheint bei der „*X-linked lymphoproliferative disease*“ (XLP) involviert zu sein (Bottino et al., 2001).

TGF- β 1 und GDF-15 induzieren die Phosphorylierung von SLAMF-4/2B4 und SLAMF-8/BLAME. SLAMF-8 scheint bei der B-Zell-Entwicklung eine Rolle zu spielen (Kingsbury et al., 2001). Über die Aktivierung durch ein Zytokin der TGF- β -Familie und die Folge ist bislang nichts bekannt. SLAMF-4/2B4 kann sowohl aktivierende als auch inhibierende Signale an die Zelle vermitteln, was abhängig ist von Expressionslevel, Vernetzung und vom Vorhandensein bestimmter Signaladaptormoleküle von 2B4 (Chlewicki et al., 2008; Veillette, 2006). Es kann daher keine klare Aussage über die Wirkung der durch GDF-15- bzw. TGF- β 1-induzierten Aktivierung von 2B4 und SLAMF-8 in Immunzellen gemacht werden.

„*Triggering receptor expressed on myeloid cells*“ (TREM) sind eine weitere Klasse von aktivierenden Rezeptoren, die auf fast allen Subklassen von Immunzellen vertreten sind. Sie vermitteln Zell-Zell-Adhäsion und im Fall von TREM-2 auch die spezifische Aktivierung von T-Zellen über die Bindung an B7-H3 (Hashiguchi et al., 2008). Diese aktivierenden Rezeptoren waren unter GDF-15- bzw. TGF- β 1-

Einfluss in Immunzellen phosphoryliert, was der immuninhibierenden Situation durch GDF-15 bzw. TGF- β 1 entgegen wirken kann.

Fc γ RIII ist auch als CD16 bekannt. In der Durchflusszytometrie war CD16 unter GDF-15-Einfluss auf der Oberfläche von NK-Zellen nicht reguliert (Abb. 59). CD16 ist besonders bei der antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) von Bedeutung. Es bindet den Fc-Teil von IgG1 und IgG3 auf opsonierten Zellen oder Mikroben und leitet aktivierende Signale an NK-Zellen weiter, welche dann über zytotoxische Mechanismen die opsonierte Zelle vernichten können. ADCC spielt bei der Tumorabwehr eine wichtige Rolle. Die Wirkung inhibitorischer Signale blockiert die Aktivierung von NK-Zellen durch CD16. CD16 ist durch TGF- β 1 und GDF-15 im Immunrezeptor Array phosphoryliert und aktiviert. Seine Expression an der Zelloberfläche ist jedoch nicht beeinflusst (Abschnitt 3.3).

Die CD16-Aktivierung allein führt nicht zur Expansion von NK-Zellen (Robertson et al., 1996a). Zudem scheint die Aktivierung von CD16 im gegebenen Kontext nicht ausreichend, um NK-Zellen in zytotoxisch aktive Immuneffektorzellen zu verwandeln und die zytotoxische Hemmung durch GDF-15 bzw. TGF- β 1 zu überwinden.

Der SHP-2-Rezeptor zeigt unter GDF-15- bzw. TGF- β 1-Einfluss im Vergleich zur Kontrolle als einziger Rezeptor ein schwächeres Signal. SHP-2 ist eine „*Src homology domain (SH2) containing*“ Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP). Da PTP der Wirkung von Protein-Tyrosin-Kinasen, die im Tumorkontext häufig dereguliert sind, entgegenwirken, werden sie als Tumorsuppressoren angesehen. SHP2 kann jedoch die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren positiv regulieren und daher auch onkogen wirken (Chan et al., 2008b; Ostman et al., 2006). SHP-2 ist in Immunzellen ein wichtiges Adaptormolekül für viele Zytokin- und Wachstumsfaktorsignalwege, u.a. für die STAT-Signaltransduktion (Xu and Qu, 2008). SHP-2 ist außerdem notwendig für die Differenzierung von T_H-Zellen zu T_{H1}-Zellen und Unterdrückung der T_{H2}-Differenzierung (Salmond et al., 2005). Inhibition von SHP-2 durch GDF-15 und TGF- β 1 behindert die STAT-Signaltransduktion (siehe auch Abschnitt 3.4) und kann die T_{H2}-Differenzierung begünstigen, was mit zur inhibitorischen Wirkung der beiden Zytokine beitragen kann.

Grundlegende Unterschiede im Phosphorylierungsmuster von GDF-15 und TGF- β 1 in Immunzellen ergaben sich bei den aktivierenden Rezeptoren DNAM-1, KIR2DL4, NTB-A/SLAMF6 und CD84/SLAMF5 sowie bei den inhibierenden Rezeptoren Dectin-1 (CLEC-7a), LAIR-1/CD305 und PECAM/CD31, die nur bei GDF-15 ein Signal ergaben, nicht jedoch bei TGF- β . Dagegen war NKp30 nur unter TGF- β -Einfluss in Immunzellen phosphoryliert nicht jedoch mit GDF-15 (Abb. 88).

Dectin-1 (CLEC-7a) ist ein β -Glucan-Rezeptor, der bei der angeborenen Immunität, insbesondere bei Pilzinfektionen eine Rolle spielt. Dectin-1-Aktivierung durch Zymosan kann u.a. TGF- β in Makrophagen induzieren und dadurch ein immuntolerantes Milieu erzeugen (Dillon et al., 2006). Eine Aktivierung von TGF- β -Familienmitgliedern war bislang nicht bekannt. Möglicherweise kann Dectin-1-Aktivierung durch GDF-15 ebenfalls die Produktion von TGF- β in Immunzellen auslösen und so eine Immuntoleranz bewirken.

Über die Signaltransduktion von DNAM-1 ist noch nicht viel bekannt. In der Durchflusszytometrie konnte keine Expressionsänderung dieses aktivierenden Rezeptors durch GDF-15 festgestellt werden. Seine Liganden PRR-2 und CD155 waren im OvCA exprimiert und unter GDF-15-Einfluss z.T. reguliert. Im Immunrezeptor Array wurde DNAM-1-Phosphorylierung unter GDF-15-Einfluss nachgewiesen. GDF-15 bewirkt demnach die Aktivierung von DNAM-1, ohne jedoch seine Expression an der Zelloberfläche zu verändern. Allerdings muss die Aktivierung von DNAM-1 der inhibierenden Wirkung von GDF-15 untergeordnet sein, da sie für die NK-Zytotoxizität ohne Konsequenz blieb. Andererseits wurde im Immunrezeptor Array die Gesamt-PBL-Population untersucht und nicht einzelne Immunzellsubpopulationen. Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, entfaltet GDF-15 seine Wirkung sehr zelltypspezifisch. Da die Quelle der DNAM-1-Phosphorylierung nicht genau bestimmbar ist, kann es durchaus sein, dass GDF-15 auf bestimmten Immunzellpopulationen DNAM-1 aktiviert.

KIR2DL4 nimmt eine besondere Stellung unter den KIR-Rezeptoren ein. KIR2DL4 wirkt aktivierend trotz intrazellulärer ITIM-Domäne. Nach Bindung an HLA-G vermittelt KIR2DL4 aktivierende Signale an die NK-Zelle, trotzdem hat KIR2DL4 generell die Fähigkeit auch inhibitorisch zu wirken. So konnte eine KIR2DL4-Mutante ohne Aktivierungssignal die Signaltransduktion des aktivierenden Rezeptors CD16 hemmen (Faure and Long, 2002). In der Durchflusszytometrie war die Expression einzelner KIR auf der Zelloberfläche durch GDF-15 nicht reguliert. GDF-15 bewirkt jedoch die Phosphorylierung von KIR2DL4 im Immunrezeptor Array. Interessanterweise ist der Ligand von KIR2DL4, HLA-G unter GDF-15-Einfluss in NK-Zellen induziert (Abschnitt 3.4.3), was die Aktivierung von KIR2DL4 im Immunrezeptor Array erklären kann. Ob KIR2DL4 im untersuchten Kontext der aktivierenden oder inhibierenden Seite zuzuordnen ist, kann nicht eindeutig geklärt werden. Generell ist die Wirkung von GDF-15 bzgl. der NK-Zytotoxizität inhibierend. Eine mögliche Signalinhibition durch KIR2DL4 wäre daher durchaus wahrscheinlich. Andererseits bewirkt die KIR2DL4-abhängige Aktivierung von NK-Zellen zwar die IFN- γ -Produktion, nicht aber die Aktivierung der Zytotoxizität von NK-Zellen (Rajagopalan et al., 2001). Zudem ist die KIR2DL4-abhängige IFN- γ -Produktion in NK-Zellen abhängig von der p38/MAPK, die ebenfalls durch GDF-15 aktiviert wird (Abschnitt 3.4.2, Rajagopalan et al., 2001). Ein Zusammenhang von GDF-15-abhängiger IFN- γ -Produktion über die Aktivierung von KIR2DL4 und p38/MAPK wäre denkbar. Um genaueren Aufschluss darüber zu bekommen, müsste die IFN- γ Produktion in NK-Zellen in Abhängigkeit von KIR2DL4 und p38/MAPK unter GDF-15-Einfluss untersucht werden.

SLAMF5 und SLAMF6 gehören der Familie der „*signaling lymphocyte activation molecule*“ von aktivierenden Immunrezeptoren an (s.o.). SLAMF5/CD84 bindet an CD84 auf benachbarten Zellen, aktiviert dadurch T-Zellen und induziert die IFN- γ -Sekretion (Tangye et al., 2003; Yan et al., 2007). SLAMF6/NTB-A ist ein Zytotoxizitäts-induzierender Rezeptor auf NK-Zellen, der NTB-A auf anderen NK-Zellen bindet und somit die Zytotoxizität innerhalb der NK-Zellpopulation verstärkt und zusätzlich die IFN- γ -Sekretion und NK-Proliferation beeinflusst (Flaig et al., 2004; Stark and Watzl, 2006). Beide waren unter GDF-15-, nicht aber unter TGF- β 1-Einfluss phosphoryliert. Allerdings war ihre Wirkung nicht stark genug, um den hemmenden Einfluss von GDF-15 im Zytotoxizitätsassay zu überwinden.

CD305/LAIR-1, ist ein inhibierender Rezeptor, der auf vielen Immunzellen, u.a. auch auf NK- und T-Zellen zu finden ist. Die Aktivierung von CD305 inhibiert die NK-Zytotoxizität. Ligand für CD305 ist Kollagen, z.B. Epcam, das auch von Tumorzellen exprimiert wird. CD305 vermittelt über Kollagen die Bindung an die ECM und erleichtert damit die Einwanderung ins Gewebe. Gleichzeitig vermittelt diese Interaktion inhibitorische Signale an die einwandernde Zelle, wodurch die Immunantwort reguliert wird (Meyaard, 2008). Auf NK-Zellen war CD305 durch GDF-15 zwar schwach aber signifikant induziert (Abb. 63). Im Immunrezeptor-Array ist CD305 unter GDF-15-Einfluss phosphoryliert. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass GDF-15 über die Expression und Aktivierung dieses inhibierenden Rezeptors die NK-Zellzytotoxizität moduliert.

CD31/PECAM-1 besitzt eine intrazelluläre ITIM-Domäne und vermittelt darüber inhibierende Signale an Immunzellen. Daneben vermittelt CD31 als Adhäsionsmolekül die Bindung von Leukozyten an Endothelien, was die Einwanderung ins Gewebe erleichtert (Jackson, 2003; Poggi et al., 1996). GDF-15 bewirkt die Phosphorylierung von CD31, was die Inhibition von NK-Zellen mit beeinflussen kann.

Der einzige Immunrezeptor, der unter TGF- β 1-Einfluss, nicht aber unter GDF-15-Einfluss, in Immunzellen phosphoryliert ist, ist NKp30. Seine Expression wird von TGF- β 1 in Immunzellen herunterreguliert (Castriconi et al., 2003). Gleichzeitig wird NKp30 jedoch unter TGF- β 1-Einfluss phosphoryliert, was in dem Fall nicht zur Aktivierung, sondern zur Herunterregulation bzw. Rezeptorinternalisation führt.

GDF-15 bewirkt einerseits die Phosphorylierung aktivierender Rezeptoren, andererseits aber auch die von inhibitorischen Rezeptoren. Die Aktivierung von Immunzellen, insbesondere von NK-Zellen, ist sehr komplex reguliert. Das Mikromilieu und der Zelltyp bzw. der Differenzierungsstatus mögen zusätzlich einen Einfluss auf die Gesamtwirkung von GDF-15 haben. Viele aktivierende Signale sind inhibitorischen Signalen untergeordnet (Lanier, 2001; Takai and Ono, 2001). In inhibitorischen Synapsen, den Kontaktregionen zwischen NK-Zellen und Zielzellen, können auch aktivierende Rezeptoren lokalisiert sein. Im Gegensatz zur Annahme, dass die Ausbildung einer inhibitorischen Synapse zur Blockade des Aktinzytoskeletts führt, womit die Versammlung von aktivierenden Rezeptoren in Clustern an der Oberfläche verhindert wird, zeigten Schleinitz et al. 2008, dass die Ausbildung einer inhibitorischen Synapse nicht zur Blockade der aktivierenden Rezeptoren über die Blockade des Aktingerüsts führt. Stattdessen wird die Signalweiterleitung von aktivierten NK-Zell-aktivierenden Rezeptoren intrazellulär über die Rekrutierung von Signaladaptoren blockiert (Schleinitz et al., 2008). Denkbar wäre daher, dass die Blockade der inhibierenden Rezeptoren auf die Signaltransduktion der aktivierenden Rezeptoren erst „spät“ eingreift, nachdem einige frühe Adaptormoleküle bereits phosphoryliert wurden (beispielsweise ITAMs, die direkt am aktivierten Rezeptor phosphoryliert werden) und aktivierende Signale bereits ein Stück weit die Aktivierungskaskade weitergeleitet wurden. Dadurch können aktivierende Rezeptoren in einem Assay der Momentaufnahme wie dem Immunrezeptor-Array aktiviert erscheinen, ohne aber ihr Signal bis zum Ziel weitergeleitet zu haben.

Gerade bei NK-Zellen spielen aktivierende und inhibierende Immunrezeptoren zusammen. Der genaue Aktivierungsmechanismus von NK-Zellen ist bislang nicht bekannt, von vielen Rezeptoren wird allerdings angenommen, dass ihre Aktivierung ausreichend für die Initiation der NK-Zell-Zytotoxizität ist. Bislang ist jedoch kein einzelner Rezeptor aufgefallen, dessen Expression dafür unabdingbar wäre (Long, 2002).

4.3.3 GDF-15- und TGF- β -abhängige Genregulation in Immunzellen

Welche Gene in Immunzellen durch GDF-15 induziert bzw. herunterreguliert werden, wurde in Analogie zu TGF- β 1 in Abschnitt 3.4.3 untersucht. Mit Hilfe von cDNA-Microarrays wurde die Genexpression in NK- und CD8⁺-T-Zellen nach 24 h TGF- β 1-Behandlung bzw. in NK-Zellen nach 6 h und 24 h GDF-15-Behandlung untersucht. Interessanterweise zeigt sich TGF- β 1 hier wieder als das potentere Zytokin, das im Vergleich zu GDF-15 deutlich mehr Gene in NK-Zellen im gleichen Zeitraum reguliert (Abb. 89). Nach 6 h waren kaum Gene reguliert, erst nach 24 h zeigte sich die Auswirkung der GDF-15-Behandlung in NK-Zellen.

4.3.3.1 TGF- β -abhängige Genregulation in NK- und CD8⁺-T-Zellen

Das durch TGF- β 1 am stärksten induzierte Gen in NK-Zellen ist der IL-1R Typ II. Dieser bindet die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β . Durch hohe IL-1RII Expression werden diese Zytokine präferentiell von NK-Zellen gebunden, was diese aktivieren kann.

Auch IL-22Ra2 und IL-9R sind durch TGF- β 1 hochreguliert, ebenso BMP-Rezeptoren (BMPRIa, BMPRII) aus der TGF- β -Superfamilie. Dagegen sind IL-2RA, IL-8RA und IL-12RB2 durch TGF- β 1 in NK-Zellen inhibiert. Besonders der IL-2R ist wichtig für die Aktivierung von ruhenden NK-Zellen um zytotoxisch aktiviert zu werden. Durch die Herunterregulation des Rezeptors ist die NK-Zelle nur eingeschränkt aktivierbar.

Generell ist die Expression auffallend vieler Chemokinrezeptoren hochreguliert (CCR3/ 8/ 10, CXCR3, CXCR4, CSF3R), während die Expression von Chemokinen (CXCL10, CCL18, CCL23, CXCL9, CXCL11) eher herunterreguliert ist. Demnach verändert TGF- β 1 den NK-Zell-Phänotyp von „(Chemokin)Signalsendern“ zu passiven „(Chemokin)Signalempfängern“ und greift damit in das immunmodulatorische Potential von NK-Zellen ein.

TGF- β 1 reguliert die Expression seiner Isoform TGF- β 2, nicht jedoch die von TGF- β 3, in NK-Zellen hoch. Die Wirkung von TGF- β 2 ist der von TGF- β 1 sehr ähnlich. Damit wird der immuninhibitorische Effekt von TGF- β 1 zusätzlich verstärkt. Aus der TGF- β -Superfamilie sind neben TGF- β 2 auch BMP8a und Inhibin- β e induziert. BMP8a gehört der BMP-Familie an und spielt eine Rolle bei der Plazentaentwicklung und bei der Spermatogenese (Zhao et al., 1996; Zhao et al., 1998). Außerdem

scheint es bei der Chondrogenese beteiligt zu sein (Cameron et al., 2009). Welche Funktion BMP8a in NK-Zellen ausüben könnte, ist unbekannt.

Die am stärksten herunterregulierten Gene sind Lymphotoxin- β (LTB), TNF- α und IFN- γ , die allesamt stark immunaktivierend sind. Mit der TNF- α - und IFN- γ -Produktion legt TGF- β wichtige immunmodulatorische Werkzeuge von NK-Zellen lahm.

Die große Spannbreite an induzierten und gehemmten Zytokin- und Chemokingenen spiegelt die immunmodulatorische Eigenschaft von TGF- β wieder und ist auch in der „*Pathway Analyse*“ zu sehen. Mit die meisten von TGF- β 1 deregulierten Gene in NK-Zellen sind an Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktionen beteiligt. Damit greift TGF- β 1 massiv in die NK-Zell-Interaktionsfähigkeit ein.

Neben Zytokinen/Chemokinen reguliert TGF- β 1 v.a. Gene, die in NK-Zellen an der MAPK-Signaltransduktion beteiligt sind (Tab. 48) und nimmt damit Einfluss auf die möglichen Signaltransduktionsmechanismen in NK-Zellen. So sind z.B. MAPK1, MAP3K4, MAP4K3 und MAP2K6 induziert, MAP3K8 und MAPK13 jedoch inhibiert. STAT1 wird durch TGF- β 1 nicht aktiviert. Die Genexpressionsanalyse zeigt zudem, dass TGF- β 1 die Expression von STAT1 herunterreguliert, was den JAK-STAT-Signalweg zusätzlich blockiert.

Eine weitere Gruppe von Genen, die durch TGF- β 1 in NK-Zellen reguliert wird, ist maßgeblich am Zellzyklus beteiligt. Darunter z.B. die „*cyclin-dependent kinase inhibitors*“ (CDKN) CDKN1A, -2A, -1BC, die „*cyclin-dependent kinases*“ (CDK) CDK1, CDK4 sowie die Replikationsfaktoren CDC6 und CDC45. TGF- β 1 greift demnach modulierend in wichtige zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion und Zellzyklus ein und moduliert diese.

NK-Zellen vermitteln viele ihrer Funktionen über direkte Zellkontakte, für die Oberflächenmarker, Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptoren verantwortlich sind. Viele Oberflächenmoleküle werden in NK-Zellen durch TGF- β 1 reguliert. Induziert sind u.a. CD9, welches Zelladhäsion über Integrinbindung vermittelt, und CD6, das CD166 bindet und ein co-stimulierender Rezeptor auf Lymphozyten ist (Aruffo et al., 1997). Beide Gene erscheinen, aufgrund ihrer aktivierenden Natur, auf den ersten Blick nicht an der TGF- β 1-vermittelten Immunsuppression beteiligt zu sein.

Die Expression u.a. der Rezeptoren LAIR-2, einiger CD300-Rezeptoren, von KIR2DL5A sowie von CD36, CD63, CD55, CD74 und CD274 war dagegen unter TGF- β 1-Einfluss reprimiert. LAIR2 antagonisiert die inhibitorische Wirkung von LAIR-1/CD305 durch kompetitive Hemmung (Lebbink et al., 2006), daher ist seine Herunterregulation durch TGF- β 1 nicht überraschend und kann mit zur inhibitorischen Wirkung von TGF- β 1 beitragen.

CD74 ist die „*invariant chain*“ des MHC-II-Moleküls (Stein et al., 2007). Seine verminderte Expression verhindert auch den Zusammenbau funktionaler MHC-II-Moleküle, was zur Verringerung der MHC-II-

Expression führt, so dass weniger Antigen an CD4⁺-T-Zellen präsentiert wird. Diese Funktion ist v.a. bei professionellen APC von Bedeutung.

CD274 oder B7-H1 bindet an seinen Rezeptor PD-1 und hemmt so die T-Zell-Antwort (Chen, 2004). In verschiedenen Tumoren ist B7-H1 überexprimiert, was zum „*tumor immune escape*“ beiträgt (Dong et al., 2002). Saudemont et al. beobachteten, dass die Expression von B7-H1 auf NK-Zellen T-Zellen aktiviert, was im Gegensatz zu früheren Beobachtungen steht. NK-Zell-B7-H1 aktiviert T-Zellen über einen alternativen, nicht PD-1-vermittelten Signalweg (Saudemont et al., 2005). Die Herunterregulation der B7-H1-Expression in NK-Zellen steht in diesem Zusammenhang ganz im Sinne der bereits bekannten TGF- β -vermittelten Immunsuppression.

Besonders wichtig im immunmodulatorischen Kontext ist die Eigenschaft von TGF- β 1 die Expression von Granzym A und B sowie Granulysin in NK-Zellen zu blockieren, was die zytotoxische Fähigkeit massiv einschränkt. Auch auf Proteinebene war diese Inhibition durch TGF- β 1 zu beobachten (Abschnitt 3.3.4).

Allerdings ist der Mannose-6-Phosphat Rezeptor, der eine Rolle bei der GranB-Aufnahme spielt (Motyka et al., 2000) herunterreguliert, was die Lyse durch andere zytotoxische Effektoren behindert.

Besonders interessant ist die Regulation von Apoptose-assoziierten Genen in NK-Zellen. Dabei induziert bzw. hemmt TGF- β 1 jeweils sowohl pro- wie auch anti-apoptotische Gene.

Induziert sind die pro-apoptotischen Gene BMF, PERP, BCOR und PDCD4 und die anti-apoptotischen Gene BCL6 und ApoC1 (Tab. 38); gehemmt sind dagegen die Expression der pro-apoptotischen Gene BRCA2 und APITD1 und die der anti-apoptotischen Gene BCL7B und BCL2A1. Damit bestätigt sich, dass TGF- β 1 sowohl pro- wie auch anti-apoptotische Eigenschaften besitzt (Huang et al., 2000; Schuster et al., 2002a,b; Wildey et al., 2003). Welche Auswirkung die Regulation dieser Apoptose-assoziierten Gene durch TGF- β 1 hat, ist vermutlich stark abhängig vom zellulären Kontext.

Eine große Gruppe von TGF- β 1-regulierten Genen sind Kalzium-assoziierte Gene, z.B. Gene für Kalziumkanäle und -rezeptoren sowie verschiedene kalziumabhängige Proteinkinasen (Tab. 37). Kalzium ist ein wichtiges zelluläres Signalmolekül, das an vielen essentiellen Prozessen beteiligt ist. Eine kalziummodulierende Eigenschaft von TGF- β wurde bereits für Osteoblasten beschrieben, wo es Ca²⁺-Influx bewirkt (Nesti et al., 2007; Rodland et al., 1990). In NK-Zellen greift TGF- β vermutlich in die Regulation von Kalzium als „*second messenger*“ ein.

In CD8⁺-T-Zellen sind durch TGF- β 1 überwiegend die gleichen Gene reguliert wie in NK-Zellen, vornehmlich Gene, die an Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktionen und an der Apoptose beteiligt sind. Eine interessante Ausnahme ist IL-2, das in CD8⁺-T-Zellen induziert ist. IL-2 ist ein wichtiger Wachstums- und Aktivierungsfaktor für T-, NK- und NKT-Zellen, daher ist es überraschend, dass TGF- β 1 seine Expression induziert (IL-2 ist das am stärksten induzierte Gen in CD8⁺-T-Zellen), wo TGF- β

doch überwiegend immuninhibitorisch wirkt. Allerdings ist IL-2 auch ein Wachstums- und Aktivierungsfaktor für T_{reg} , welche wiederum immuninhibitorisch wirken.

Zusammengefasst ergab die Genexpressions- und die „*Pathway Analyse*“, dass TGF- β 1 massiv in die wichtigsten zellulären Vorgänge von NK- (und CD8⁺-T-) Zellen eingreift, u.a. in die Apoptose, in den Zellzyklus und in die MAPK-Signaltransduktion. Zusätzlich verändert TGF- β 1 über die Regulation von Chemokinen, Zytokinen und deren Rezeptoren sowie weitere Oberflächenrezeptoren deren Möglichkeit zur Zellkommunikation und -interaktion. Direkten Einfluss nimmt TGF- β 1 auf die Zytotoxizität von NK-Zellen durch die Suppression lytischer Enzyme. Im Gesamten spiegelt die Genregulation die immuninhibitorische Wirkung von TGF- β 1 auf NK- (und CD8⁺-T-) Zellen wieder.

4.3.3.2 GDF-15-abhängige Genregulation in NK-Zellen

Nach 6 h Inkubation war die Wirkung von GDF-15 auf die Genexpression noch nicht voll entfaltet, dementsprechend waren nur wenige Gene reguliert. Diese konzentrieren sich im Kalziumsignalweg und im Fettsäuremetabolismus. Außer Hämoglobin und IL-22RA1 sind zu dem Zeitpunkt keine weiteren immunologisch interessanten Gene reguliert. Während TGF- β 1 IL-22RA2 induziert, ist durch GDF-15 ein anderer IL-22-Rezeptor, nämlich IL-22RA1, inhibiert. IL-22 ist ein Zytokin der IL-10-Familie. Es wird von aktivierten T-Zellen gebildet und inhibiert die IL-4-Produktion, was die T_{H2} -Antwort beeinflusst (Xie et al., 2000). Außerdem spielt es eine Rolle bei der Infektabwehr (Aujla et al., 2008; Zheng et al., 2008). IL22RA1 bildet einen Komplex mit IL-10R2 und bindet das von T-Zellen gebildete IL-22, das IL-10 funktional sehr ähnlich ist (de Oliveira Neto et al., 2008). Im malignen Lymphom „*anaplastic lymphoma kinase (ALK)(+), anaplastic large cell lymphoma*“ (ALK(+))ALCL ist STAT3 konstitutiv aktiviert, was auf eine Aktivierung des IL-22-Signalwegs und veränderte IL-22RA1-Expression auf ALK(+))ALCL-Zellen zurückzuführen ist (Bard et al., 2008). Der autokrine IL-22/IL-22R1-Signalweg scheint maßgeblich an der Tumorigenität bestimmter Tumore beteiligt zu sein (Bard et al., 2008; Ziesche et al., 2007). Die erhöhte IL22R1-Expression kann zur Verstärkung der IL-22-vermittelten Wirkung über den STAT3-Signalweg führen. Allerdings war STAT3 in Immunzellen nicht aktiviert (Abschnitt 3.4). Daher ist unklar, welche Funktion die GDF-15-abhängige Induktion von IL-22RA1 hat.

Generell waren sehr viel weniger immunrelevante Gene, unabhängig ob inhibitorischer oder aktivierender Art, durch GDF-15 in NK-Zellen reguliert als durch TGF- β 1 zum gleiche Zeitpunkt.

Nach 24 h GDF-15-Inkubation sind überwiegend Gene reguliert, die an der oxidativen Phosphorylierung (u.a. CytP450, CYB5R3), und - wie bei TGF- β 1 - an der Apoptose (u.a. BCL-2, Harakiri) und dem MAPK-Signalweg (u.a. MAPK8, MAPK8IP3) beteiligt sind. Doch obwohl TGF- β 1 und GDF-15 Gene ansprechen, die in gleichen Signalwegen konzentriert sind, sind die einzelnen Gene verschieden. Einzig CD55, APOL6 und Caspase-8 sind von beiden Zytokinen in NK-Zellen gleich herunterreguliert. Aufgrund der ähnlichen immunmodulatorischen Eigenschaften und zumindest

teilweise ähnlichen Signaltransduktionswege von TGF- β 1 und GDF-15 ist dieser Befund der unterschiedlichen Genregulation durchaus überraschend.

Am stärksten induziert GDF-15 die Expression von CD86 in NK-Zellen. CD86 (B7.2) ist ein co-stimulatorisches Molekül der B7-Familie, das normalerweise von APC exprimiert wird (Ohnuma et al., 2004). Die Bindung von CD86 an seinen Rezeptor CD28 auf T-Zellen induziert als sekundäres Signal nach der Antigenbindung die T-Zell-Zytotoxizität (Gonzalo et al., 2001). Diese Funktion würde der beobachteten Immunität von GDF-15 entgegen wirken. Andererseits bindet CD86 auch an den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 (CD152) und zwar mit einer 20 Mal höheren Affinität als an CD28 (Rudd et al., 2009; Janeway Immunologie, 5.Aufl 2002). Diese Bindung behindert die Aktivierungsfähigkeit von NK- bzw. T-Zellen und könnte damit den „*tumor immune escape*“ unterstützen.

Siglec-11, neben CD86 das am zweitstärksten induzierte Gen, gehört der „*sialic acid binding Ig-like lectins*“ (Siglec)-Familie von Transmembranrezeptoren an. Sie binden Kohlenhydrate und vermitteln darüber Zelladhäsion (Crocker et al., 1998; Crocker and Varki, 2001). Siglec-11 gehört der CD33-Familie von inhibitorischen Siglecs an. Normalerweise wird es auf PBL nicht exprimiert (Angata et al., 2007; Angata and Varki, 2000). Über seine genaue Funktion ist bislang nichts bekannt.

Interessanterweise war HLA-G, ein nicht klassisches MHC-Molekül, das normalerweise in „immunprivilegierten“ Geweben, z.B. in der Plazenta, vorkommt, mit am stärksten induziert (Ellis et al., 1986). In Trophoblasten wurde zum ersten Mal seine immunitätshemmende Funktion auf NK-Zellen beschrieben (Rouas-Freiss et al., 1997a; Rouas-Freiss et al., 1997b). HLA-G wird von vielen Tumoren, aber auch von infiltrierenden Immunzellen exprimiert (Ibrahim et al., 2004). Aufgrund seiner immunitätshemmenden Eigenschaft wurde ihm eine wichtige Rolle beim „*tumor immune escape*“ zugeschrieben, u.a. durch die Induktion von CD3⁺CD4^{low}- und CD3⁺CD8^{low}-T_{reg} (Rouas-Freiss et al., 2005; Rouas-Freiss et al., 2007). Dadurch und durch die Bindung an seinen Rezeptor KIR2DL4, der auch im Immunorezeptor-Array aktiviert war, kann es zur Immunitätshemmung beitragen.

Das durch GDF-15 am stärksten herunterregulierte Gen ist (wie auch bei TGF- β 1 in CD8⁺-T-Zellen) Caspase-8. Caspase-8 ist eine Cystein-Protease, die in der DR-vermittelten Apoptose als Bestandteil des „*death inducing signaling complex*“ (DISC) und Initiator der Caspase-Kaskade eine wichtige Zellfunktion einnimmt (Krammer, 2000). Bei DR-Aktivierung wird pro-Caspase-8 zum DISC rekrutiert, wo die Oligomerisierung die Autokatalyse zu aktiver Caspase-8 bewirkt (Boatright and Salvesen, 2003a, b). Die aktivierte Caspase-8 vermittelt zellspezifisch Apoptose über direkte Caspase-3-Aktivierung, wobei der mitochondriale Apoptoseweg noch verstärkend aktiviert werden kann (Barnhart et al., 2003). Eine weitere Funktion ist Apoptose-unabhängig: Caspase-8 spielt eine Rolle bei der Aktivierung naiver T-, B- und NK-Zellen (Chun et al., 2002). Immunzellen, deren Caspasen blockiert waren, zeigten gestörte Aktivierung und Proliferation (Falk et al., 2004; Olson et al., 2003). Die Herunterregulation von Caspase-8 in NK- und CD8⁺-T-Zellen hat demnach zwei inhibitorische Auswirkungen: zum einen ist die Signalweiterleitung von apoptotischen „*death receptors*“ blockiert und

Caspase-8-abhängige Apoptose in den Zellen inhibiert. Zum anderen behindert die verminderte Caspase-8-Expression die Aktivierung und die Proliferation der Zellen. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass Caspase-8 sowohl durch GDF-15-Einfluss als auch durch TGF- β 1-Einfluss das am stärksten herunterregulierte Gen ist.

Das Apolipoprotein L6 (ApoL6) ist ein weiteres pro-apoptotisches Gen, das durch GDF-15 und TGF- β 1 in NK-Zellen inhibiert ist. ApoL6 ist ein „*BH3-only*“-Protein und ein Homolog von BCL2 (Liu et al., 2005). BCL2-Familienmitglieder regulieren alle apoptotischen Wege und wirken entweder pro- (BAX, BID, NOXA, PUMA, BAD) oder anti- (BCL2, BCL_{xL}) apoptotisch. „*BH3-only*“-Proteine enthalten nur die BCL2-Homologiedomäne der BCL2-Familie und vermitteln Proteininteraktionen zwischen den BCL2-Homologen, regulieren die Dimerisierung und spielen eine Rolle bei der Porenbildung durch BCL2-Homologe (Huang and Strasser, 2000). Überexprimiertes ApoL6 induziert den mitochondrialen Apoptoseweg und zusätzlich Caspase-8-Aktivität (Liu et al., 2005). Außerdem interagiert ApoL6 mit Lipid-„*second messenger*“ und koppelt diese so an die Apoptose. GDF-15 inhibiert mit ApoL6 die Expression eines weiteren pro-apoptotischen Gens in NK-Zellen und verdeutlicht damit seine Funktion als Apoptoseregulator.

Neben Caspase-8 und ApoL6 sind weitere Gene, die an der Apoptose beteiligt sind, herunterreguliert. Darunter befinden sich sowohl pro- (BAX, Harakiri, APAF1, CIDEA) wie auch anti-apoptotische (BCL2, BCL2L1) Gene. Ein direkter funktionaler Zusammenhang zwischen der Genregulation der pro- bzw. anti-apoptotischen Gene zur verminderten NK-Zytotoxizität lässt sich nicht eindeutig feststellen.

Mit BMP8a ist die Expression eines TGF- β -Familienmitgliedes in GDF-15-behandelten NK-Zellen herunterreguliert. Im Gegensatz zu GDF-15 induziert TGF- β 1 die Expression von BMP8a. BMP8a spielt eine Rolle bei der Plazentaentwicklung und bei der Spermatogenese (Zhao et al., 1996; Zhao et al., 1998). Der Zusammenhang mit der durch GDF-15 vermittelten Herunterregulation in NK-Zellen ist unklar.

Weitere inhibierte Gene sind die Fc-Rezeptoren für IgA und IgM, das MHC-II-Molekül HLA-DOB, der Komplementproteinrezeptor C5aR1, der FGF-Rezeptor 3 sowie CD55, das dritte Gen, neben Caspase-8 und ApoL6, das durch GDF-15 und TGF- β 1 in NK-Zellen gleich reguliert wird. CD55 oder „*decay-accelerating factor*“ (DAF) ist ein Regulator der Komplementaktivität. CD55 bewirkt den Zerfall des C3/C5-Konvertase-Komplexes der Komplementimmunität (Brodbeck et al., 1996), was die Komplementaktivität des alternativen Weges hemmt. Außerdem inhibiert CD55 direkt die NK-Zellaktivität (Finberg et al., 1992). In vielen Tumoren wurde CD55-Expression nachgewiesen, u.a. beim OvCA (Bjorge et al., 1997). Bislang wurde angenommen, dass CD55 vom Tumor selbst produziert wird (Mikesch et al., 2006), was hier nicht weiter untersucht wurde. Diese Daten zeigen jedoch, dass GDF-15 bzw. TGF- β 1 die Expression von CD55 in NK-Zellen herunterreguliert, was widersprüchlich zur der im Allgemeinen immuninhibitorischen Wirkung von TGF- β 1 und GDF-15 ist, da CD55 immuninhibitorisch und pro-tumorigen wirkt (Loberg et al., 2006).

Die Genanalyse verdeutlicht die Einflussnahme von GDF-15 auf wichtige zelluläre Prozesse wie die Apoptose, die oxidative Phosphorylierung und den MAPK-Signalweg. Generell sind überwiegend, aber nicht ausschließlich Gene reguliert, die die immuninhibitorische Wirkung von GDF-15 verstärken.

4.4 Funktionale Analogie von GDF-15 und TGF- β

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GDF-15 ein weiteres Zytokin aus der TGF- β -Superfamilie mit immuninhibitorischer Eigenschaft ist, das Analogien zum nah verwandten TGF- β aufweist. Die aus Tumorsicht parakrine Wirkung von TGF- β 1 und GDF-15 ist immunmodulatorisch betrachtet sehr ähnlich. Möglicherweise handelt es sich bei den nah verwandten Zytokinen um redundante Proteine, die sich bei gleichzeitiger Expression ergänzen und funktional addieren können. Im OvCA waren beide überexprimiert, GDF-15 jedoch stärker, was zumindest in diesem Zusammenhang auf die prominentere Rolle hindeutet. Andererseits sprechen die korrelierenden Expressionen dafür, dass GDF-15 benötigt wird, damit TGF- β seine volle Wirkung entfalten kann. Dennoch ist bei der Microarray-Analyse keine Regulation der TGF- β -Gene durch GDF-15 in NK-Zellen beobachtet worden, lediglich eine Regulation von Genen des TGF- β -Signalweges (Tab. 51). Bei der Signaltransduktion wurde die Gesamt-Lymphozytenpopulation (PBL) eingesetzt, so dass möglicherweise eine andere Subpopulation durch GDF-15 initiiert, TGF- β produziert.

Die funktionale Analogie spiegelt sich wieder im Mechanismus der Lyseinhibition von NK-Zellen. TGF- β 1 und GDF-15 regulieren beide den NKG2D-Rezeptor von der Oberfläche herunter und reduzieren die Expression von lytischen Proteinen. Zumeist ist die Wirkung von TGF- β 1 stärker als die von GDF-15. Das kompensiert GDF-15 jedoch durch die Induktion der inhibitorischen Rezeptoren CD305 und CD94. Insbesondere bei der Apoptoseinduktion trennen sich die Gemeinsamkeiten auf: während TGF- β 1 keinen Einfluss auf die FasL-vermittelte Apoptose hat, verstärkt GDF-15 diese über die Induktion des Fas-Rezeptors auf Immunzellen.

Die Signaltransduktion von TGF- β 1 und GDF-15 in Immun- und OvCA-Zellen ist überwiegend ähnlich, so dass die fast grundlegend verschiedene Genregulation in NK-Zellen überrascht. Insgesamt nur drei Gene sind durch TGF- β 1 und GDF-15 gleich reguliert: CD55, Caspase-8 und das Apolipoprotein L6, die beiden letztgenannten sind Apoptose-assoziierte Gene. Die geringe Übereinstimmung bei der Genregulation in Immunzellen spricht ganz deutlich dafür, dass beide Zytokine intrazellulär andere Funktionen initiieren, was auch für divergente Eigenschaften außerhalb der Zelle sprechen würde, die hier vielleicht nicht aufgedeckt wurden. Trotz der unterschiedlichen Genregulation in NK-Zellen konzentrieren sich die regulierten Gene in gleichen Signalwegen, v.a. in der Apoptose und der MAPK-Signaltransduktion, zwei essentiellen zellulären Vorgängen. Während TGF- β 1 zusätzlich überwiegend Gene des Zellzyklus beeinflusst, sind es bei GDF-15 Gene der oxidativen Phosphorylierung.

Unabhängig von der gemeinsamen inhibitorischen Wirkung auf NK-Zellen ist die Wirkung beider Zytokine auf andere Immunzellen zu betrachten. Viele der bekannten TGF- β -Eigenschaften sind

zelltypspezifisch, gleiches gilt für GDF-15, so dass bei anderen Zellen weitere funktionale Unterschiede auftreten könnten.

4.5 Zusammenfassung: Immuninhibitorische Wirkung von GDF-15

In dieser Arbeit wurden wichtige Eigenschaften von GDF-15 charakterisiert. GDF-15 ist im OvCA überexprimiert und findet sich im Tumorgewebe, in Tumorzellen, im Aszites und im Serum von OvCA-Patientinnen. Er wirkt nicht als autokriner Wachstumsfaktor für OvCA-Zellen *in vitro*, seine Defizienz bewirkt jedoch die Induktion von NKG2D-Liganden auf der Zelloberfläche von OvCA-Zellen. GDF-15 ist aus Sicht des Tumors vielmehr ein parakriner Faktor mit immuninhibitorischer Wirkung auf NK-Zellen. Basierend auf mehreren Säulen - der Rezeptormodulation, der Apoptoseregulation und der Lyseinhibition - greift GDF-15 inhibierend in die zytotoxische Funktion von NK-Zellen ein (Abb. 96: Hypothetische Wirkung von GDF-15 *in vivo*). Dies charakterisiert zum ersten Mal eine Eigenschaft von GDF-15, die seine Expression in vielen Tumoren erklären könnte. Der Mechanismus der Immuninhibition ist in vielen, aber nicht in allen untersuchten Bereichen analog zu TGF- β . Für die Übertragung seiner Wirkung auf NK-Zellen benutzt GDF-15 teilweise die gleichen Signalwege wie TGF- β . Ausnahmen sind jedoch die verzögerte SMAD2/3-Signaltransduktion und die Aktivierung von p38/MAPK. Die Genregulation ist völlig verschieden von TGF- β , allerdings finden sich die regulierten Gene in gleichen Funktionalitätsclustern. Die immuninhibitorische Eigenschaft von GDF-15 kann auch *in vivo* mitverantwortlich sein für den „*immune escape*“ des OvCAs (und anderen GDF-15-produzierenden Tumoren) und sollte somit als potentielles neues Ziel in der Tumorummuntherapie gegen das OvCA *in vivo* evaluiert werden.

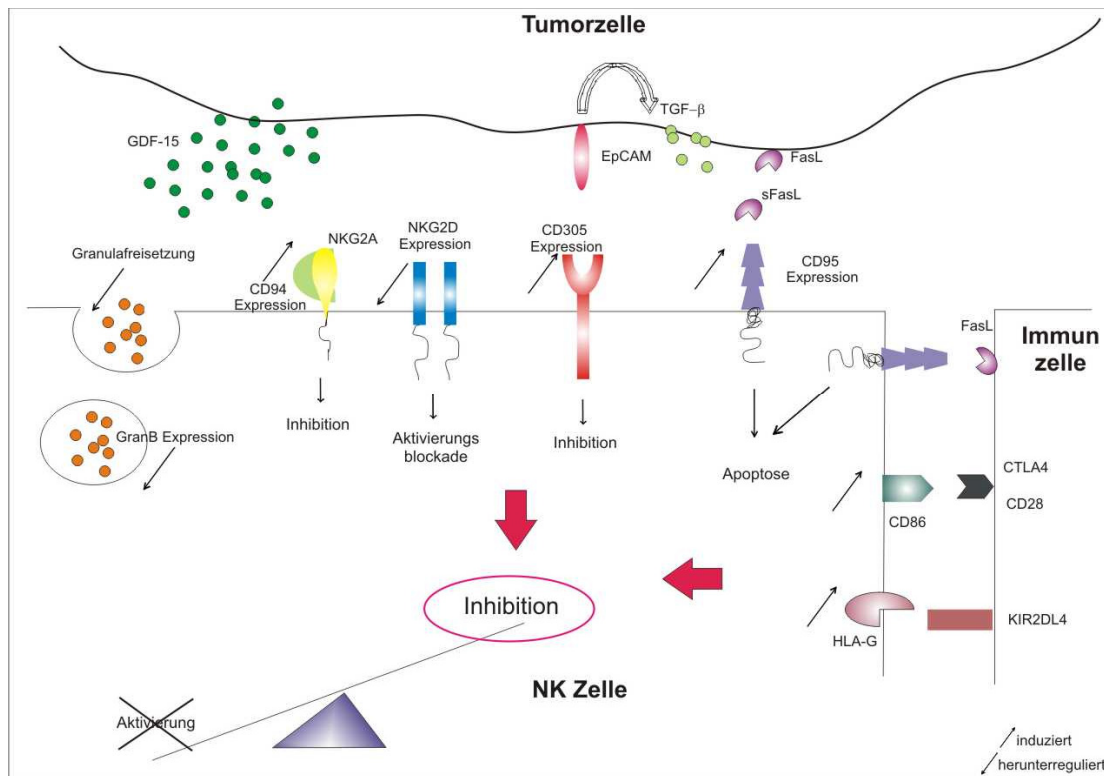


Abb. 96: Hypothetische Wirkung von GDF-15 *in vivo* (basierend auf den *in vitro*-Daten dieser Arbeit). GDF-15 wird im OvCA überexprimiert und wirkt direkt auf lokale NK-Zellen. Diese werden über mehrere GDF-15-abhängige Mechanismen inhibiert und können nicht mehr zur Anti-Tumorimmunität beitragen. Durch Rezeptormodulation verschiebt GDF-15 den Aktivierungsstatus von NK-Zellen hin in Richtung Inhibition: durch Herunterregulation von NKG2D, einem der wichtigsten aktivierenden NK-Rezeptoren, blockiert GDF-15 die Aktivierung von NK-Zellen. Zusätzlich werden inhibitorische Rezeptoren an der Oberfläche hochreguliert (CD305, CD94 in Assoziation mit NKG2A). Das Ergebnis ist eine inhibierte NK-Zelle, die Tumorzellen toleriert. Durch direkten Eingriff von GDF-15 in die NK-Zytotoxizität über die Modulation der lytischen Granula ist selbst eine aktivierte NK-Zelle nicht mehr voll funktionsfähig, was die generelle Lyseeffizienz gegen Tumorzellen herabsetzt. Durch Induktion von Fas auf NK-Zellen sensitiviert GDF-15 die NK-Zelle für FasL-induzierte Apoptose durch Tumorzellen oder durch benachbarte Immunzellen. Die NK-Zell-Apoptose verringert den Pool an zytotoxischen Zellen im Tumor. Durch die Regulation immunrelevanter Gene wie HLA-G und CD86 bewirkt GDF-15 die Sensitivierung von NK-Zellen gegenüber immunmodulatorischen Mechanismen anderer lokaler Immunzellen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick: Mögliche Tumorimmuntherapie gegen GDF-15

GDF-15 wird sezerniert und kann dadurch leicht im Serum oder im Aszites von OvCA-Patientinnen nachgewiesen werden. Damit könnte es nicht nur als prognostischer oder diagnostischer Marker dienen, sondern zudem ein geeignetes Ziel für die Immuntherapie gegen GDF-15-überexprimierende OvCA sein. Das Ausschalten von GDF-15, z.B. über blockierende Antikörper, könnte die immunologische Situation im OvCA verbessern.

NK-Zellen eignen sich aufgrund ihrer direkten Antigen-unabhängigen Aktivierung besonders für die Tumortherapie. Durch ihre Fähigkeit zahlreiche immunaktivierende Zytokine zu produzieren, die die Aktivierung weiterer Immunzellen mit sich bringen, sind sie zudem wichtige Immunmodulatoren. Gleichzeitig gibt es auch limitierende Eigenschaften von NK-Zellen, wie die Notwendigkeit von „*homing*“-Signalen zur Einwanderung ins Gewebe (Terme et al., 2008a,b) oder von starken Aktivierungssignalen durch andere hämatopoetische Zellen (Long, 2002). North et al. zeigten jedoch, dass Tumore selbst aktivierende Signale an NK-Zellen vermitteln und so Lyse auslösen können, selbst bei gleichzeitiger Expression von inhibierenden Liganden (North et al., 2007).

Eine Hypothese, basierend auf Untersuchungen von Bartkova et al. geht davon aus, dass durch Chemotherapie und Bestrahlung NKG2D-Liganden in Tumoren induziert werden können und diese damit sensitiver für eine NK-Zell-vermittelte Lyse werden, was wiederum den Effekt der Chemotherapie immunologisch verstärken würde und für NK-Zellen als (unterstützendes) Mittel der Tumortherapie im OvCA sprechen würde (Bartkova et al., 2005; Pure et al., 2005). Ebenfalls für NK-Zellen spricht, dass die Selektion von Tumorzellen durch NK-Zellen zu einer Anreicherung von Tumorstammzellen führen kann (Reim, Dombrowski et al., 2009). Die so selektionierten immunresistenten und tumorigenen Tumorstammzellen könnten dann spezifisch eliminiert werden (Beier et al. 2008), um eine dauerhafte Tumorregression zu erzielen.

Genau Kenntnis der GDF-15-Signalkomponenten vorausgesetzt, könnten analog zu Shah et al. nach erfolgreicher Chemotherapie autologe NK-Zellen von OvCA-Patientinnen, deren GDF-15-Signalweg *ex vivo* mutiert und die zusätzlich aktiviert wurden, in der anschließenden Immuntherapie eingesetzt werden (Shah and Lee, 2000). Diese wären dann resistent gegen die GDF-15-vermittelte Inhibition und könnten so den verbleibenden Tumor angreifen.

GDF-15 präsentierte sich hier als bedeutender immunmodulierender Faktor des OvCA, der *in vivo* mit hoher Wahrscheinlichkeit eine wichtige Funktion in der Tumorprogression einnimmt. Da GDF-15-Überexpression in immer mehr Tumoren festgestellt wird, ist es von großer Bedeutung seine Funktion im Tumorkontext genau zu entschlüsseln, insbesondere im Hinblick auf mögliche neue Angriffspunkte für experimentelle Tumor(immun)therapien.

Diese Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag bei der Ergründung der Rolle von GDF-15 in Tumoren und verhilft zu einem besseren Verständnis für immunmodulatorische Mechanismen im Ovarialkarzinom.

5 ANHANG

5.1 Abkürzungen

Tab. 53: Abkürzungen Chemikalien.

Abkürzung	Chemikalie
7-AAD	7-aminoactinomycin D
Amp/ Amp ^R	Ampicillin/ Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CFSE	Carboxylfluorescein succinimidylester
Cy3	Cy-Chrome 3 (Farbstoff)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-desoxy-nukleosid-tri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horse radish peroxidase)
HSA	Humanes Serumalbumin
KV	Kristallviolett
LB	Luria-Bertani
MetOH	Methanol
MMP	Magermilchpulver
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
M-TBST	Milch-TBST
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phythämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristoyl-13-acetat

PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
SDS	Natrium-dodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
TBST	TBS-Tween
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS-TMBSA	Tris-Tween20-Magermilchpulver-BSA (Blocking-Reagenz)

Tab. 54: Abkürzungen Begriffe.

Abkürzung	Begriff
Abb.	Abbildung
ADCC	„antibody dependent cell-mediated cytotoxicity“
AK	Antikörper
ALK	„Activin-like receptor“
BMP	„bone morphogenetic protein“
Bp	Basenpaare
bsp.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
CD	„cluster of cifferentiation“
CMV	Cytomegalievirus
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTL	„cytotoxic T lymphocytes“
DISC	„death-inducing signaling complex“
DR4, 5	Death Receptor 4, 5
ECM	Extrazelluläre Matrix
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
et al.	und andere (et alii)
E:T ratio	Effektor:Target Verhältnis
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FADD	„Fas-associated death domain“
FasL	Fas Ligand
FATAL	„fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis“
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GDF-15	„growth and differentiation factor-15“
GFP	„green fluorescent protein“
ggf.	gegebenenfalls

GranB	Granzym B
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IRES	<i>„internal ribosome entry site“</i>
ITAM	<i>„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“</i>
ITIM	<i>„immunoglobulin–like tyrosine-based inhibitory motif“</i>
JAK	Janus Kinase
JNK	<i>„Jun amino terminal kinase“</i>
KIR	<i>„killer cell immunoglobulin-like receptor“</i>
k.o.	<i>„knock-out“</i>
KV	Kristallviolett
LAMP-1	<i>„lysosome-associated membrane protein 1“</i>
MACS	<i>„magnetic activated cell sorting“</i>
Mamma-CA	Mammakarzinom (Brustkrebs)
MAPK	<i>„mitogen-activated protein kinase“</i>
MHC	<i>„major histocompatibility complex“</i>
MIC-A, -B	<i>„MHC class I chain related -A, -B“</i>
MIC-1	<i>„macrophage inhibitory cytokine 1“</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NK	Natürliche Killerzelle
NKG2D	<i>„natural killer group 2D“</i>
NSAID	<i>„non-steroidal anti-inflammatory drugs“</i>
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
OvCA	Ovarialkarzinom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	<i>„peripheral blood lymphocytes“</i>
PBMC	<i>„peripheral blood mononuclear cells“</i>
PCR	<i>„polymerase chain reaction“</i>
pNK	Polyklonale NK Zellen
qRT-PCR	Semi-quantitative Real Time PCR
rel.	relativ
RGA	Reportergen-Analyse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNAi	<i>„Interfering“</i> Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>„short interfering“</i> RNA
SFI	<i>„specific fluorescence index“</i>
SFM	Serum-freies Medium
SN	Überstand (supernatant)
sog.	sogenannte

STAT	„ <i>signal transducers and activators of transcription</i> “
TAA	„ <i>tumor associated antigen</i> “
TβR	TGF-β-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TGF-β	„ <i>transforming growth factor β</i> “
TRAIL	„ <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> “
TIL/TIM	Tumor-infiltrierende Lymphozyten/ -Makrophagen
TNF-α	„ <i>tumor necrosis factor α</i> “
T _{reg}	Regulatorische T-Lymphozyten
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
VitD3	Vitamin D3
vs	versus
z.B.	zum Beispiel

Tab. 55: Abkürzungen Einheiten.

Abkürzung	Einheit
A	Ampere
Bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
g	Gramm
Da	Dalton
h	hours (Stunden)
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
μ	mikro-
m	milli-
min	Minute
ml	Milliliter
Mio	Millionen
mM	millimolar
nM	nanomolar
RLU	“relative light units
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SFI	specific fluorescent intensity
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt

5.2 Quellenverzeichnis

5.2.1 Literaturquellen

Aabo, K., Adams, M., Adnitt, P., Alberts, D.S., Athanazziou, A., Barley, V., Bell, D.R., Bianchi, U., Bolis, G., Brady, M.F., Brodovsky, H.S., Bruckner, H., Buyse, M., Canetta, R., Chylak, V., Cohen, C.J., Colombo, N., Conte, P.F., Crowther, D., Edmonson, J.H., Gennatas, C., Gilbey, E., Gore, M., Guthrie, D., Yeap, B.Y., and et al. (1998). Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. *Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. Br J Cancer* 78, 1479-1487.

Adib, T.R., Henderson, S., Perrett, C., Hewitt, D., Bourmpoulia, D., Ledermann, J., and Boshoff, C. (2004). Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays. *Br J Cancer* 90, 686-692.

Ago, T., and Sadoshima, J. (2006). GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. *Circ Res* 98, 294-297.

Albertoni, M., Shaw, P.H., Nozaki, M., Godard, S., Tenan, M., Hamou, M.F., Fairlie, D.W., Breit, S.N., Paralkar, V.M., de Tribolet, N., Van Meir, E.G., and Hegi, M.E. (2002). Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* 21, 4212-4219.

Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 53, 904-910.

Allan, D.S., McMichael, A.J., and Braud, V.M. (2000). The ILT family of leukocyte receptors. *Immunobiology* 202, 34-41.

Allavena, P., Sica, A., Vecchi, A., Locati, M., Sozzani, S., and Mantovani, A. (2000). The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev* 177, 141-149.

Allgayer, H., Babic, R., Gruetzner, K.U., Tarabichi, A., Schildberg, F.W., and Heiss, M.M. (2000). c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 18, 2201-2209.

Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294, 15-22.

Alvarez, J.V., Greulich, H., Sellers, W.R., Meyerson, M., and Frank, D.A. (2006). Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 66, 3162-3168.

Alvarez, Y., Tang, X., Coligan, J.E., and Borrego, F. (2008). The CD300a (IRp60) inhibitory receptor is rapidly up-regulated on human neutrophils in response to inflammatory stimuli and modulates CD32a (FcγRIIIa) mediated signaling. *Mol Immunol* 45, 253-258.

Angata, T., Tabuchi, Y., Nakamura, K., and Nakamura, M. (2007). Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* 17, 838-846.

Angata, T., and Varki, A. (2000). Siglec-7: a sialic acid-binding lectin of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology* 10, 431-438.

- Appierto, V., Tiberio, P., Villani, M.G., Cavadini, E., and Formelli, F. (2009). PLAB induction in fenretinide-induced apoptosis of ovarian cancer cells occurs via a ROS-dependent mechanism involving ER stress and JNK activation. *Carcinogenesis* 30, 824-831.
- Appierto, V., Villani, M.G., Cavadini, E., Gariboldi, M., De Cecco, L., Pierotti, M.A., Lambert, J.R., Reid, J., Tiberio, P., Colombo, N., and Formelli, F. (2007). Analysis of gene expression identifies PLAB as a mediator of the apoptotic activity of fenretinide in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 26, 3952-3962.
- Aruffo, A., Bowen, M.A., Patel, D.D., Haynes, B.F., Starling, G.C., Gebe, J.A., and Bajorath, J. (1997). CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 18, 498-504.
- Aruga, A., Aruga, E., Tanigawa, K., Bishop, D.K., Sondak, V.K., and Chang, A.E. (1997). Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J Immunol* 159, 664-673.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
- Auersperg, N., Ota, T., and Mitchell, G.W. (2002). Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer* 12, 691-703.
- Auersperg, N., Wong, A.S., Choi, K.C., Kang, S.K., and Leung, P.C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22, 255-288.
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J.L., Dubin, P.J., Pilewski, J.M., Myerburg, M.M., Mason, C.A., Iwakura, Y., and Kolls, J.K. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14, 275-281.
- Baek, K.E., Yoon, S.R., Kim, J.T., Kim, K.S., Kang, S.H., Yang, Y., Lim, J.S., Choi, I., Nam, M.S., Yoon, M., and Lee, H.G. (2009). Upregulation and secretion of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in gastric cancers. *Clin Chim Acta* 401, 128-133.
- Baek, S.J., Horowitz, J.M., and Eling, T.E. (2001). Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 276, 33384-33392.
- Baek, S.J., Kim, J.S., Moore, S.M., Lee, S.H., Martinez, J., and Eling, T.E. (2005). Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol Pharmacol* 67, 356-364.
- Baek, S.J., Okazaki, R., Lee, S.H., Martinez, J., Kim, J.S., Yamaguchi, K., Mishina, Y., Martin, D.W., Shoieb, A., McEntee, M.F., and Eling, T.E. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 131, 1553-1560.
- Baek, S.J., Wilson, L.C., and Eling, T.E. (2002a). Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis* 23, 425-434.
- Baek, S.J., Wilson, L.C., Lee, C.H., and Eling, T.E. (2002b). Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 1126-1131.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.

- Balmanno, K., and Cook, S.J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16, 368-377.
- Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B., and Kurrey, N.K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 65, 3025-3029.
- Barber, A., Zhang, T., and Sentman, C.L. (2008). Immunotherapy with chimeric NKG2D receptors leads to long-term tumor-free survival and development of host antitumor immunity in murine ovarian cancer. *J Immunol* 180, 72-78.
- Bard, J.D., Gelebart, P., Anand, M., Amin, H.M., and Lai, R. (2008). Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 22, 1595-1603.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., and Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864-870.
- Bartlett, J.M., Langdon, S.P., Scott, W.N., Love, S.B., Miller, E.P., Katsaros, D., Smyth, J.F., and Miller, W.R. (1997). Transforming growth factor-beta isoform expression in human ovarian tumours. *Eur J Cancer* 33, 2397-2403.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Bauskin, A.R., Brown, D.A., Junankar, S., Rasiyah, K.K., Eggleton, S., Hunter, M., Liu, T., Smith, D., Kuffner, T., Pankhurst, G.J., Johnen, H., Russell, P.J., Barret, W., Stricker, P.D., Grygiel, J.J., Kench, J.G., Henshall, S.M., Sutherland, R.L., and Breit, S.N. (2005). The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res* 65, 2330-2336.
- Bauskin, A.R., Brown, D.A., Kuffner, T., Johnen, H., Luo, X.W., Hunter, M., and Breit, S.N. (2006). Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* 66, 4983-4986.
- Bauskin, A.R., Zhang, H.P., Fairlie, W.D., He, X.Y., Russell, P.K., Moore, A.G., Brown, D.A., Stanley, K.K., and Breit, S.N. (2000). The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J* 19, 2212-2220.
- Beier, D., Rohrl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., and Beier, C.P. (2008). Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 68, 5706-5715.
- Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Benedetti Panici, P., Mancuso, S., Neri, G., and Testa, J.R. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64, 280-285.
- Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., and Duke, R.C. (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377, 630-632.
- Bennett, M.W., O'Connell, J., O'Sullivan G, C., Roche, D., Brady, C., Kelly, J., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1999a). Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut* 44, 156-162.

- Bennett, M.W., O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Brady, C., Roche, D., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1998). The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 160, 5669-5675.
- Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., Soper, J.T., Dodge, R., Clarke-Pearson, D.L., Marks, P., and et al. (1990a). Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50, 4087-4091.
- Berchuck, A., Olt, G.J., Everitt, L., Soisson, A.P., Bast, R.C., Jr., and Boyer, C.M. (1990b). The role of peptide growth factors in epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 75, 255-262.
- Berchuck, A., Rodriguez, G., Olt, G., Whitaker, R., Boente, M.P., Arrick, B.A., Clarke-Pearson, D.L., and Bast, R.C., Jr. (1992). Regulation of growth of normal ovarian epithelial cells and ovarian cancer cell lines by transforming growth factor-beta. *Am J Obstet Gynecol* 166, 676-684.
- Bertone, S., Schiavetti, F., Bellomo, R., Vitale, C., Ponte, M., Moretta, L., and Mingari, M.C. (1999). Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29, 23-29.
- Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., and Koup, R.A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281, 65-78.
- Biade, S., Marinucci, M., Schick, J., Roberts, D., Workman, G., Sage, E.H., O'Dwyer, P.J., Livolsi, V.A., and Johnson, S.W. (2006). Gene expression profiling of human ovarian tumours. *Br J Cancer* 95, 1092-1100.
- Bierie, B., and Moses, H.L. (2006a). TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 29-40.
- Bierie, B., and Moses, H.L. (2006b). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 506-520.
- Bignotti, E., Tassi, R.A., Calza, S., Ravaggi, A., Romani, C., Rossi, E., Falchetti, M., Odicino, F.E., Pecorelli, S., and Santin, A.D. (2006). Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. *Gynecol Oncol* 103, 405-416.
- Billestrup, N., Gonzalez-Manchon, C., Potter, E., and Vale, W. (1990). Inhibition of somatotroph growth and growth hormone biosynthesis by activin in vitro. *Mol Endocrinol* 4, 356-362.
- Bjorge, L., Hakulinen, J., Wahlstrom, T., Matre, R., and Meri, S. (1997). Complement-regulatory proteins in ovarian malignancies. *Int J Cancer* 70, 14-25.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003a). Caspase activation. *Biochem Soc Symp*, 233-242.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003b). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-731.
- Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24, 175-208.
- Boon, T., and van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183, 725-729.
- Bootcov, M.R., Bauskin, A.R., Valenzuela, S.M., Moore, A.G., Bansal, M., He, X.Y., Zhang, H.P., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K., Walsh, B.J., Nicholson, R.C., Fairlie, W.D., Por, S.B., Robbins, J.M., and Breit, S.N. (1997).

MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11514-11519.

Borrego, F., Masilamani, M., Kabat, J., Sanni, T.B., and Coligan, J.E. (2005). The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Mol Immunol* 42, 485-488.

Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M., and Moretta, A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 198, 557-567.

Bottner, M., Laaff, M., Schechinger, B., Rappold, G., Unsicker, K., and Suter-Crazzolara, C. (1999). Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* 237, 105-111.

Bottone, F.G., Jr., Baek, S.J., Nixon, J.B., and Eling, T.E. (2002). Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *J Nutr* 132, 773-778.

Boyd, J.A., and Kaufman, D.G. (1990). Expression of transforming growth factor beta 1 by human endometrial carcinoma cell lines: inverse correlation with effects on growth rate and morphology. *Cancer Res* 50, 3394-3399.

Boyle, G.M., Pedley, J., Martyn, A.C., Banducci, K.J., Strutton, G.M., Brown, D.A., Breit, S.N., and Parsons, P.G. (2009). Macrophage inhibitory cytokine-1 is overexpressed in malignant melanoma and is associated with tumorigenicity. *J Invest Dermatol* 129, 383-391.

Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (1998). Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. *Blood* 92, 4248-4255.

Brennan, J., Norris, D.P., and Robertson, E.J. (2002). Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev* 16, 2339-2344.

Bristow, R.E., Baldwin, R.L., Yamada, S.D., Korc, M., and Karlan, B.Y. (1999). Altered expression of transforming growth factor-beta ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma. *Cancer* 85, 658-668.

Brodbeck, W.G., Liu, D., Sperry, J., Mold, C., and Medof, M.E. (1996). Localization of classical and alternative pathway regulatory activity within the decay-accelerating factor. *J Immunol* 156, 2528-2533.

Brown, C.E., Wright, C.L., Naranjo, A., Vishwanath, R.P., Chang, W.C., Olivares, S., Wagner, J.R., Bruins, L., Raubitschek, A., Cooper, L.J., and Jensen, M.C. (2005). Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing. *J Immunol Methods* 297, 39-52.

Brown, D.A., Bauskin, A.R., Fairlie, W.D., Smith, M.D., Liu, T., Xu, N., and Breit, S.N. (2002a). Antibody-based approach to high-volume genotyping for MIC-1 polymorphism. *Biotechniques* 33, 118-120, 122, 124 passim.

Brown, D.A., Breit, S.N., Buring, J., Fairlie, W.D., Bauskin, A.R., Liu, T., and Ridker, P.M. (2002b). Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *Lancet* 359, 2159-2163.

Brown, D.A., Moore, J., Johnen, H., Smeets, T.J., Bauskin, A.R., Kuffner, T., Weedon, H., Milliken, S.T., Tak, P.P., Smith, M.D., and Breit, S.N. (2007). Serum macrophage inhibitory cytokine 1 in rheumatoid arthritis: a potential marker of erosive joint destruction. *Arthritis Rheum* 56, 753-764.

- Brown, D.A., Stephan, C., Ward, R.L., Law, M., Hunter, M., Bauskin, A.R., Amin, J., Jung, K., Diamandis, E.P., Hampton, G.M., Russell, P.J., Giles, G.G., and Breit, S.N. (2006). Measurement of serum levels of macrophage inhibitory cytokine 1 combined with prostate-specific antigen improves prostate cancer diagnosis. *Clin Cancer Res* 12, 89-96.
- Brown, D.A., Ward, R.L., Buckhaults, P., Liu, T., Romans, K.E., Hawkins, N.J., Bauskin, A.R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Breit, S.N. (2003). MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 9, 2642-2650.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F., and et al. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444.
- Bruns, P.(1887). Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwülste. *Beiträge zur Klinischen Chirurgie* 3: 443-466.
- Bubenik, J. (2004). MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *Int J Oncol* 25, 487-491.
- Burdette, J.E., Jeruss, J.S., Kurley, S.J., Lee, E.J., and Woodruff, T.K. (2005). Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. *Cancer Res* 65, 7968-7975.
- Burnet, F.M. (1967). Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1, 1171-1174.
- Caduff, R.F., Svoboda-Newman, S.M., Ferguson, A.W., Johnston, C.M., and Frank, T.S. (1999). Comparison of mutations of Ki-RAS and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors. *Am J Surg Pathol* 23, 323-328.
- Callard, R.E., Stark, J., and Yates, A.J. (2003). Fratricide: a mechanism for T memory-cell homeostasis. *Trends Immunol* 24, 370-375.
- Cameron, T.L., Belluoccio, D., Farlie, P.G., Brachvogel, B., and Bateman, J.F. (2009). Global comparative transcriptome analysis of cartilage formation in vivo. *BMC Dev Biol* 9, 20.
- Cao, X., and Chen, D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 357, 1-8.
- Carbillon, L., Benzacken, B., and Uzan, M. (2004). MIC 1 concentration as a predictor of first-trimester miscarriage. *Lancet* 363, 1238-1239; author reply 1239.
- Cardillo, M.R., Yap, E., and Castagna, G. (1997). Molecular genetic analysis of TGF-beta1 in ovarian neoplasia. *J Exp Clin Cancer Res* 16, 49-56.
- Carlsten, M., Bjorkstrom, N.K., Norell, H., Bryceson, Y., van Hall, T., Baumann, B.C., Hanson, M., Schedvins, K., Kiessling, R., Ljunggren, H.G., and Malmberg, K.J. (2007). DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res* 67, 1317-1325.
- Casagrande, J.T., Louie, E.W., Pike, M.C., Roy, S., Ross, R.K., and Henderson, B.E. (1979). "Incessant ovulation" and ovarian cancer. *Lancet* 2, 170-173.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4120-4125.
- Cerwenka, A. (2009). New twist on the regulation of NKG2D ligand expression. *J Exp Med* 206, 265-268.

- Cerwenka, A., Baron, J.L., and Lanier, L.L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11521-11526.
- Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2001). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 181, 158-169.
- Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2003). NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 61, 335-343.
- Chan, C.J., Andrews, D.M., and Smyth, M.J. (2008a). Can NK cells be a therapeutic target in human cancer? *Eur J Immunol* 38, 2964-2968.
- Chan, G., Kalaitzidis, D., and Neel, B.G. (2008b). The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27, 179-192.
- Chan, K.S., and Kaur, A. (2007). Flow cytometric detection of degranulation reveals phenotypic heterogeneity of degranulating CMV-specific CD8+ T lymphocytes in rhesus macaques. *J Immunol Methods* 325, 20-34.
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6, 15-25.
- Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 336-347.
- Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 419-424.
- Chen, S.J., Karan, D., Johansson, S.L., Lin, F.F., Zeckser, J., Singh, A.P., Batra, S.K., and Lin, M.F. (2007a). Prostate-derived factor as a paracrine and autocrine factor for the proliferation of androgen receptor-positive human prostate cancer cells. *Prostate* 67, 557-571.
- Chen, T., Triplett, J., Dehner, B., Hurst, B., Colligan, B., Pemberton, J., Graff, J.R., and Carter, J.H. (2001). Transforming growth factor-beta receptor type I gene is frequently mutated in ovarian carcinomas. *Cancer Res* 61, 4679-4682.
- Chen, Y.G., Lui, H.M., Lin, S.L., Lee, J.M., and Ying, S.Y. (2002). Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med (Maywood)* 227, 75-87.
- Chen, Y.G., Wang, Q., Lin, S.L., Chang, C.D., Chuang, J., and Ying, S.Y. (2006). Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 534-544.
- Chen, Y.L., Lin, P.C., Chen, S.P., Lin, C.C., Tsai, N.M., Cheng, Y.L., Chang, W.L., Lin, S.Z., and Harn, H.J. (2007b). Activation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase revealed a isochoihulactone-triggered apoptotic pathway in human lung cancer A549 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 323, 746-756.
- Chenau, J., Michelland, S., de Fraipont, F., Josserand, V., Coll, J.L., Favrot, M.C., and Seve, M. (2009). The cell line secretome, a suitable tool for investigating proteins released in vivo by tumors: application to the study of p53-modulated proteins secreted in lung cancer cells. *J Proteome Res* 8, 4579-4591.
- Chlewicki, L.K., Velikovskiy, C.A., Balakrishnan, V., Mariuzza, R.A., and Kumar, V. (2008). Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J Immunol* 180, 8159-8167.

- Choi, K.C., Kang, S.K., Nathwani, P.S., Cheng, K.W., Auersperg, N., and Leung, P.C. (2001a). Differential expression of activin/inhibin subunit and activin receptor mRNAs in normal and neoplastic ovarian surface epithelium (OSE). *Mol Cell Endocrinol* 174, 99-110.
- Choi, K.C., Kang, S.K., Tai, C.J., Auersperg, N., and Leung, P.C. (2001b). The regulation of apoptosis by activin and transforming growth factor-beta in early neoplastic and tumorigenic ovarian surface epithelium. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2125-2135.
- Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T.P., Straus, S.E., and Lenardo, M.J. (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419, 395-399.
- Clark, G.J., Ju, X., Tate, C., and Hart, D.N. (2009). The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. *Trends Immunol* 30, 209-217.
- Clarke, D.C., and Liu, X. (2008). Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends Cell Biol* 18, 430-442.
- Coley, W.B. (1893). II. Hawkins on Tubercular Peritonitis. *Ann Surg* 17, 462-464.
- Coley, W.B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123-133.
- Crocker, P.R., Clark, E.A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J.H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R.L., Sgroi, D.C., Stamenkovic, K., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T.K., van der Merwe, P.A., Watt, S.M., and Varki, A. (1998). Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8, v.
- Crocker, P.R., and Varki, A. (2001). Siglecs in the immune system. *Immunology* 103, 137-145.
- Cumont, M.C., Monceaux, V., Viollet, L., Lay, S., Parker, R., Hurtrel, B., and Estaquier, J. (2007). TGF-beta in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell Death Differ* 14, 1747-1758.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L., and Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10, 942-949.
- Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., David, O., Burow, M., Gordon, A., Dhurandhar, N., Myers, L., Berggren, R., Hemminki, A., Alvarez, R.D., Emilie, D., Curiel, D.T., Chen, L., and Zou, W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9, 562-567.
- Dai, Z., Turtle, C.J., Booth, G.C., Riddell, S.R., Gooley, T.A., Stevens, A.M., Spies, T., and Groh, V. (2009). Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *J Exp Med* 206, 793-805.

- Damstrup, L., Rygaard, K., Spang-Thomsen, M., and Skovgaard Poulsen, H. (1993). Expression of transforming growth factor beta (TGF beta) receptors and expression of TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3 in human small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 67, 1015-1021.
- Danila, D.C., Inder, W.J., Zhang, X., Alexander, J.M., Swearingen, B., Hedley-Whyte, E.T., and Klibanski, A. (2000). Activin effects on neoplastic proliferation of human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1009-1015.
- Das, H., Koizumi, T., Sugimoto, T., Chakraborty, S., Ichimura, T., Hasegawa, K., and Nishimura, R. (2000). Quantitation of Fas and Fas ligand gene expression in human ovarian, cervical and endometrial carcinomas using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Cancer* 82, 1682-1688.
- Dasgupta, S., Bhattacharya-Chatterjee, M., O'Malley, B.W., Jr., and Chatterjee, S.K. (2005). Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *J Immunol* 175, 5541-5550.
- Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- Davis, J.E., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2001). Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity. *Eur J Immunol* 31, 39-47.
- de Oliveira Neto, M., Ferreira, J.R., Jr., Colau, D., Fischer, H., Nascimento, A.S., Craievich, A.F., Dumoutier, L., Renaud, J.C., and Polikarpov, I. (2008). Interleukin-22 forms dimers that are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains. *Biophys J* 94, 1754-1765.
- de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6, 24-37.
- Debatin, K.M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53, 153-159.
- Derynck, R., Gelbart, W.M., Harland, R.M., Heldin, C.H., Kern, S.E., Massague, J., Melton, D.A., Mlodzik, M., Padgett, R.W., Roberts, A.B., Smith, J., Thomsen, G.H., Vogelstein, B., and Wang, X.F. (1996). Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 87, 173.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Di Simone, N., Crowley, W.F., Jr., Wang, Q.F., Sluss, P.M., and Schneyer, A.L. (1996). Characterization of inhibin/activin subunit, follistatin, and activin type II receptors in human ovarian cancer cell lines: a potential role in autocrine growth regulation. *Endocrinology* 137, 486-494.
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165-171.
- Diefenbach, A., and Raulet, D.H. (2001). Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 181, 170-184.
- Dietl, J., Engel, J.B., and Wischhusen, J. (2007). The role of regulatory T cells in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 17, 764-770.

- Dietl, J., Horny, H.P., Ruck, P., and Kaiserling, E. (1993). Dysgerminoma of the ovary. An immunohistochemical study of tumor-infiltrating lymphoreticular cells and tumor cells. *Cancer* 71, 2562-2568.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., Kasprovicz, D.J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D., and Pulendran, B. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116, 916-928.
- Ding, Q., Mracek, T., Gonzalez-Muniesa, P., Kos, K., Wilding, J., Trayhurn, P., and Bing, C. (2009). Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes. *Endocrinology* 150, 1688-1696.
- Ding, W., Tang, Q., Espina, V., Liotta, L.A., Mauger, D.T., and Mulder, K.M. (2005). A transforming growth factor-beta receptor-interacting protein frequently mutated in human ovarian cancer. *Cancer Res* 65, 6526-6533.
- Do, T.V., Kubba, L.A., Du, H., Sturgis, C.D., and Woodruff, T.K. (2008). Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cancer Res* 6, 695-705.
- Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Ruzicka, T., and Schaubert, J. (2010). Control of cutaneous antimicrobial peptides by vitamin D3. *Arch Dermatol Res*. Epub ahead of print.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., and Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.
- du Bois, A., Luck, H.J., Bauknecht, T., Meier, W., Richter, B., Kuhn, W., Quaas, J., and Pfisterer, J. (1999a). First-line chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and carboplatin for advanced ovarian cancer: a phase I/II study of the Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 17, 46-51.
- du Bois, A., Neijt, J.P., and Thigpen, J.T. (1999b). First line chemotherapy with carboplatin plus paclitaxel in advanced ovarian cancer--a new standard of care? *Ann Oncol* 10 Suppl 1, 35-41.
- Dubeau, L. (1999). The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol* 72, 437-442.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329-360.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., and Levy, D.E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443-450.
- Ehrlich, P. (1909). Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5, 273-290.
- Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M., and Friese, M.A. (2006). TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 129, 2416-2425.

- El-Sherbiny, Y.M., Meade, J.L., Holmes, T.D., McGonagle, D., Mackie, S.L., Morgan, A.W., Cook, G., Feyler, S., Richards, S.J., Davies, F.E., Morgan, G.J., and Cook, G.P. (2007). The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res* 67, 8444-8449.
- Eling, T.E., Baek, S.J., Shim, M., and Lee, C.H. (2006). NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J Biochem Mol Biol* 39, 649-655.
- Elliott, R.L., and Blobe, G.C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 23, 2078-2093.
- Ellis, J.H., Burden, M.N., Vinogradov, D.V., Linge, C., and Crowe, J.S. (1996). Interactions of CD80 and CD86 with CD28 and CTLA4. *J Immunol* 156, 2700-2709.
- Ellis, S.A., Sargent, I.L., Redman, C.W., and McMichael, A.J. (1986). Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 59, 595-601.
- Eltabbakh, G.H., Yadav, P.R., and Morgan, A. (1999). Clinical picture of women with early stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 75, 476-479.
- Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K., and Moses, H.L. (1999). Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 274, 37413-37420.
- Eskelinen, E.L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* 27, 495-502.
- Fairlie, W.D., Moore, A.G., Bauskin, A.R., Russell, P.K., Zhang, H.P., and Breit, S.N. (1999). MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol* 65, 2-5.
- Fairlie, W.D., Russell, P.K., Wu, W.M., Moore, A.G., Zhang, H.P., Brown, P.K., Bauskin, A.R., and Breit, S.N. (2001a). Epitope mapping of the transforming growth factor-beta superfamily protein, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1): identification of at least five distinct epitope specificities. *Biochemistry* 40, 65-73.
- Fairlie, W.D., Zhang, H.P., Wu, W.M., Pankhurst, S.L., Bauskin, A.R., Russell, P.K., Brown, P.K., and Breit, S.N. (2001b). The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion. *J Biol Chem* 276, 16911-16918.
- Falk, M., Ussat, S., Reiling, N., Wesch, D., Kabelitz, D., and Adam-Klages, S. (2004). Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol* 173, 5077-5085.
- Fathalla, M.F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2, 163.
- Faure, M., and Long, E.O. (2002). KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168, 6208-6214.
- Feeley, K.M., and Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 38, 87-95.
- Fehleisen F. (1882). Über die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und die Übertragbarkeit auf den Menschen. *Dtsch Med Wochenschrift*, 8: 553-554.
- Ferrini, S., Prigione, I., Miotti, S., Ciccone, E., Cantoni, C., Chen, Q., Colnaghi, M.I., and Moretta, L. (1991). Bispecific monoclonal antibodies directed to CD16 and to a tumor-associated antigen induce target-cell lysis by resting NK cells and by a subset of NK clones. *Int J Cancer* 48, 227-233.

- Finberg, R.W., White, W., and Nicholson-Weller, A. (1992). Decay-accelerating factor expression on either effector or target cells inhibits cytotoxicity by human natural killer cells. *J Immunol* 149, 2055-2060.
- Finke, J.H., Zea, A.H., Stanley, J., Longo, D.L., Mizoguchi, H., Tubbs, R.R., Wiltrout, R.H., O'Shea, J.J., Kudoh, S., Klein, E., and et al. (1993). Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 53, 5613-5616.
- Flaig, R.M., Stark, S., and Watzl, C. (2004). Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* 172, 6524-6527.
- Fontana, A., Constam, D.B., Frei, K., Malipiero, U., and Pfister, H.W. (1992). Modulation of the immune response by transforming growth factor beta. *Int Arch Allergy Immunol* 99, 1-7.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R., and Nunez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10, 241-247.
- French, L.E., and Tschopp, J. (2002). Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* 12, 51-55.
- Friese, M.A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., and Weller, M. (2004). RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 64, 7596-7603.
- Frolik, C.A., Dart, L.L., Meyers, C.A., Smith, D.M., and Sporn, M.B. (1983). Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3676-3680.
- Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A.S., and Colonna, M. (2004). Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* 172, 3994-3998.
- Fujita, T., Teramoto, K., Ozaki, Y., Hanaoka, J., Tezuka, N., Itoh, Y., Asai, T., Fujino, S., Kontani, K., and Ogasawara, K. (2009). Inhibition of transforming growth factor-beta-mediated immunosuppression in tumor-draining lymph nodes augments antitumor responses by various immunologic cell types. *Cancer Res* 69, 5142-5150.
- Fukuda, J., Ito, I., Tanaka, T., and Leung, P.C. (1998). Cell survival effect of activin against heat shock stress on OVCAR3. *Life Sci* 63, 2209-2220.
- Fulda, S., and Debatin, K.M. (2006). 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene* 25, 5125-5133.
- Fulda, S., Wick, W., Weller, M., and Debatin, K.M. (2002). Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 8, 808-815.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., and Pages, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Gardiner, C.M. (2008). Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *Int J Immunogenet* 35, 1-8.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186-1190.

- Geiser, A.G., Burmester, J.K., Webbink, R., Roberts, A.B., and Sporn, M.B. (1992). Inhibition of growth by transforming growth factor-beta following fusion of two nonresponsive human carcinoma cell lines. Implication of the type II receptor in growth inhibitory responses. *J Biol Chem* 267, 2588-2593.
- Geiser, A.G., Letterio, J.J., Kulkarni, A.B., Karlsson, S., Roberts, A.B., and Sporn, M.B. (1993). Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9944-9948.
- Genestier, L., Kasibhatla, S., Brunner, T., and Green, D.R. (1999). Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med* 189, 231-239.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J.Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchencker, W., Martin, F., and Zitvogel, L. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202, 1075-1085.
- Gilfillan, S., Chan, C.J., Cella, M., Haynes, N.M., Rapaport, A.S., Boles, K.S., Andrews, D.M., Smyth, M.J., and Colonna, M. (2008). DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med* 205, 2965-2973.
- Giuntoli, R.L., 2nd, Webb, T.J., Zoso, A., Rogers, O., Diaz-Montes, T.P., Bristow, R.E., and Oelke, M. (2009). Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* 29, 2875-2884.
- Golstein, P. (1997). Controlling cell death. *Science* 275, 1081-1082.
- Gonzalo, J.A., Delaney, T., Corcoran, J., Goodearl, A., Gutierrez-Ramos, J.C., and Coyle, A.J. (2001). Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 166, 1-5.
- Gordon, I.O., and Freedman, R.S. (2006). Defective antitumor function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 12, 1515-1524.
- Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7, 1118-1122.
- Graichen, R., Liu, D., Sun, Y., Lee, K.O., and Lobie, P.E. (2002). Autocrine human growth hormone inhibits placental transforming growth factor-beta gene transcription to prevent apoptosis and allow cell cycle progression of human mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 277, 26662-26672.
- Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T., and Thun, M. (2001). Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51, 15-36.
- Grimm, E.A., Crump, W.L., 3rd, Durett, A., Hester, J.P., Lagoo-Deenadlayan, S., and Owen-Schaub, L.B. (1988). TGF-beta inhibits the in vitro induction of lymphokine-activated killing activity. *Cancer Immunol Immunother* 27, 53-58.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12445-12450.

- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2, 255-260.
- Grote, T., and Logsdon, C.D. (2007). Progress on molecular markers of pancreatic cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 23, 508-514.
- Gunturi, A., Berg, R.E., Crossley, E., Murray, S., and Forman, J. (2005). The role of TCR stimulation and TGF-beta in controlling the expression of CD94/NKG2A receptors on CD8 T cells. *Eur J Immunol* 35, 766-775.
- Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N.F., Pluddemann, A., Charles, K., Gordon, S., and Balkwill, F.R. (2006). Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol* 176, 5023-5032.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274, 27161-27167.
- Harradine, K.A., and Akhurst, R.J. (2006). Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease. *Ann Med* 38, 403-414.
- Hashiguchi, M., Kobori, H., Ritprajak, P., Kamimura, Y., Kozono, H., and Azuma, M. (2008). Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10495-10500.
- Havrilesky, L., Darcy, M., Hamdan, H., Priore, R.L., Leon, J., Bell, J., and Berchuck, A. (2003). Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 21, 3814-3825.
- Havrilesky, L.J., Hurteau, J.A., Whitaker, R.S., Elbendary, A., Wu, S., Rodriguez, G.C., Bast, R.C., Jr., and Berchuck, A. (1995). Regulation of apoptosis in normal and malignant ovarian epithelial cells by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 55, 944-948.
- Hayes, V.M., Severi, G., Southey, M.C., Padilla, E.J., English, D.R., Hopper, J.L., Giles, G.G., and Sutherland, R.L. (2006). Macrophage inhibitory cytokine-1 H6D polymorphism, prostate cancer risk, and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1223-1225.
- Hempel, N., How, T., Dong, M., Murphy, S.K., Fields, T.A., and Blobel, G.C. (2007). Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. *Cancer Res* 67, 5231-5238.
- Herbst, A.L. (1994). The epidemiology of ovarian carcinoma and the current status of tumor markers to detect disease. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1099-1105; discussion 1105-1097.
- Hibbs, K., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Casey, R.C., Bureson, K.M., Oegema, T.R., Jr., Thiele, J.J., Grindle, S.M., Bliss, R.L., and Skubitz, A.P. (2004). Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol* 165, 397-414.
- Holschneider, C.H., and Berek, J.S. (2000). Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 19, 3-10.
- Horiuchi, A., Itoh, K., Shimizu, M., Nakai, I., Yamazaki, T., Kimura, K., Suzuki, A., Shiozawa, I., Ueda, N., and Konishi, I. (2003). Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: a clinicopathological approach. *Gynecol Oncol* 88, 309-317.

- Hromas, R., Hufford, M., Sutton, J., Xu, D., Li, Y., and Lu, L. (1997). PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim Biophys Acta* 1354, 40-44.
- Hsiao, E.C., Koniaris, L.G., Zimmers-Koniaris, T., Sebald, S.M., Huynh, T.V., and Lee, S.J. (2000). Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol* 20, 3742-3751.
- Hu, W., Wu, W., Nash, M.A., Freedman, R.S., Kavanagh, J.J., and Verschraegen, C.F. (2000). Anomalies of the TGF-beta postreceptor signaling pathway in ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res* 20, 729-733.
- Huang, C.Y., Beer, T.M., Higano, C.S., True, L.D., Vessella, R., Lange, P.H., Garzotto, M., and Nelson, P.S. (2007). Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15. *Clin Cancer Res* 13, 5825-5833.
- Huang, D.C., and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.
- Huang, S., Van Arsdall, M., Tedjarati, S., McCarty, M., Wu, W., Langley, R., and Fidler, I.J. (2002). Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst* 94, 1134-1142.
- Huang, Y., Hutter, D., Liu, Y., Wang, X., Sheikh, M.S., Chan, A.M., and Holbrook, N.J. (2000). Transforming growth factor-beta 1 suppresses serum deprivation-induced death of A549 cells through differential effects on c-Jun and JNK activities. *J Biol Chem* 275, 18234-18242.
- Hutchinson, J.N., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R., and Muller, W.J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* 64, 3171-3178.
- Hwu, P., and Freedman, R.S. (2002). The immunotherapy of patients with ovarian cancer. *J Immunother* 25, 189-201.
- Ibrahim, E.C., Aractingi, S., Allory, Y., Borrini, F., Dupuy, A., Duvillard, P., Carosella, E.D., Avril, M.F., and Paul, P. (2004). Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer* 108, 243-250.
- Ioannides, C.G., Platsoucas, C.D., Rashed, S., Wharton, J.T., Edwards, C.L., and Freedman, R.S. (1991a). Tumor cytotoxicity by lymphocytes infiltrating ovarian malignant ascites. *Cancer Res* 51, 4257-4265.
- Ioannides, C.G., Rashed, S., Fisk, B., Fan, D., Itoh, K., and Freedman, R.S. (1991b). Lymphocytes infiltrating ovarian malignant ascites: modulation of IL-2-induced proliferation by IL-4 and of selective increase in CD8+ T cells by TNF-alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 10, 307-315.
- Ito, M., Minamiya, Y., Kawai, H., Saito, S., Saito, H., Nakagawa, T., Imai, K., Hirokawa, M., and Ogawa, J. (2006). Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol* 176, 5637-5643.
- Jackson, D.E. (2003). The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett* 540, 7-14.
- Jacobs, I.J., Rivera, H., Oram, D.H., and Bast, R.C., Jr. (1993). Differential diagnosis of ovarian cancer with tumour markers CA 125, CA 15-3 and TAG 72.3. *Br J Obstet Gynaecol* 100, 1120-1124.

- Jacobs, I.J., Skates, S.J., MacDonald, N., Menon, U., Rosenthal, A.N., Davies, A.P., Woolas, R., Jeyarajah, A.R., Sibley, K., Lowe, D.G., and Oram, D.H. (1999). Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* 353, 1207-1210.
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W., and Schmidt, R.E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 31, 3121-3127.
- Jager, D., Jager, E., and Knuth, A. (2001). Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol* 54, 669-674.
- Jakowlew, S.B., Moody, T.W., and Mariano, J.M. (1997). Transforming growth factor-beta receptors in human cancer cell lines: analysis of transcript, protein and proliferation. *Anticancer Res* 17, 1849-1860.
- Jalkanen, S., and Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817-825.
- Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R., and Raulet, D.H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19-29.
- Jang, C.W., Chen, C.H., Chen, C.C., Chen, J.Y., Su, Y.H., and Chen, R.H. (2002). TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 4, 51-58.
- Jang, T.J., Kang, H.J., Kim, J.R., and Yang, C.H. (2004). Non-steroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1) expression is closely related to death receptor-4 and -5 induction, which may explain sulindac sulfide induced gastric cancer cell apoptosis. *Carcinogenesis* 25, 1853-1858.
- Jang, T.J., Kim, N.I., and Lee, C.H. (2006). Proapoptotic activity of NAG-1 is cell type specific and not related to COX-2 expression. *Apoptosis* 11, 1131-1138.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., and Thun, M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 106-130.
- Jin, Z., and El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4, 139-163.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Hiramatsu, N., Sakamori, R., Yamaguchi, S., and Hayashi, N. (2005). Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 43, 1013-1020.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Kimura, R., Miyagi, T., Mochizuki, K., Sasaki, Y., and Hayashi, N. (2003). Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* 104, 354-361.
- Johnen, H., Lin, S., Kuffner, T., Brown, D.A., Tsai, V.W., Bauskin, A.R., Wu, L., Pankhurst, G., Jiang, L., Junankar, S., Hunter, M., Fairlie, W.D., Lee, N.J., Enriquez, R.F., Baldock, P.A., Corey, E., Apple, F.S., Murakami, M.M., Lin, E.J., Wang, C., During, M.J., Sainsbury, A., Herzog, H., and Breit, S.N. (2007). Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med* 13, 1333-1340.
- Johnson, G.L., and Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1341-1348.
- Ju, S.T., Panka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z., and Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373, 444-448.

- Kabawat, S.E., Bast, R.C., Jr., Welch, W.R., Knapp, R.C., and Bhan, A.K. (1983). Expression of major histocompatibility antigens and nature of inflammatory cellular infiltrate in ovarian neoplasms. *Int J Cancer* 32, 547-554.
- Kadara, H., Schroeder, C.P., Lotan, D., Pisano, C., and Lotan, R. (2006). Induction of GDF-15/NAG-1/MIC-1 in human lung carcinoma cells by retinoid-related molecules and assessment of its role in apoptosis. *Cancer Biol Ther* 5, 518-522.
- Kadin, M.E., Cavaille-Coll, M.W., Gertz, R., Massague, J., Cheifetz, S., and George, D. (1994). Loss of receptors for transforming growth factor beta in human T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6002-6006.
- Karan, D., Chen, S.J., Johansson, S.L., Singh, A.P., Paralkar, V.M., Lin, M.F., and Batra, S.K. (2003). Dysregulated expression of MIC-1/PDF in human prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 598-604.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., and Makino, H. (2002). CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 2578-2586.
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 23, 249-262.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163, 1037-1050.
- Kelly, J.M., Darcy, P.K., Markby, J.L., Godfrey, D.I., Takeda, K., Yagita, H., and Smyth, M.J. (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol* 3, 83-90.
- Kempf, T., Eden, M., Strelau, J., Naguib, M., Willenbockel, C., Tongers, J., Heineke, J., Kotlarz, D., Xu, J., Molkentin, J.D., Niessen, H.W., Drexler, H., and Wollert, K.C. (2006). The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 98, 351-360.
- Kempf, T., Sinning, J.M., Quint, A., Bickel, C., Sinning, C., Wild, P.S., Schnabel, R., Lubos, E., Rupprecht, H.J., Munzel, T., Drexler, H., Blankenberg, S., and Wollert, K.C. (2009). Growth-differentiation factor-15 for risk stratification in patients with stable and unstable coronary heart disease: results from the AtheroGene study. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 286-292.
- Kempf, T., von Haehling, S., Peter, T., Allhoff, T., Cicoira, M., Doehner, W., Ponikowski, P., Filippatos, G.S., Rozenyrt, P., Drexler, H., Anker, S.D., and Wollert, K.C. (2007). Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50, 1054-1060.
- Kempf, T., and Wollert, K.C. (2009a). Growth-differentiation factor-15 in heart failure. *Heart Fail Clin* 5, 537-547.
- Kempf, T., and Wollert, K.C. (2009b). Growth differentiation factor-15: a new biomarker in cardiovascular disease. *Herz* 34, 594-599.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

- Keskin, D.B., Allan, D.S., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Koopman, L.A., and Strominger, J.L. (2007). TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3378-3383.
- Khan, S.Q., Ng, K., Dhillon, O., Kelly, D., Quinn, P., Squire, I.B., Davies, J.E., and Ng, L.L. (2009). Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 30, 1057-1065.
- Khong, H.T., and Restifo, N.P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005.
- Kim, C.H., Kim, M.Y., Moon, J.Y., Hwang, J.W., Lee, S.Y., Joo, Y.M., Han, S.I., Park, H.G., and Kang, H.S. (2008b). Implication of NAG-1 in synergistic induction of apoptosis by combined treatment of sodium salicylate and PI3K/MEK1/2 inhibitors in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 75, 1751-1760.
- Kim, J.H., Chang, J.H., Rhee, K.H., Yoon, J.H., Kwon, S.H., Song, K., Lee, K.W., Cho, C.I., Jeon, J.H., and Kim, K.S. (2008a). Cyclooxygenase inhibitors induce apoptosis in sinonasal cancer cells by increased expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene. *Int J Cancer* 122, 1765-1773.
- Kim, J.H., Kim, K.Y., Jeon, J.H., Lee, S.H., Hwang, J.E., Lee, J.H., Kim, K.K., Lim, J.S., Kim, K.I., Moon, E.Y., Lee, H.G., Ryu, J.H., and Yang, Y. (2008d). Adipocyte culture medium stimulates production of macrophage inhibitory cytokine 1 in MDA-MB-231 cells. *Cancer Lett* 261, 253-262.
- Kim, J.S., Baek, S.J., Sali, T., and Eling, T.E. (2005). The conventional nonsteroidal anti-inflammatory drug sulindac sulfide arrests ovarian cancer cell growth via the expression of NAG-1/MIC-1/GDF-15. *Mol Cancer Ther* 4, 487-493.
- Kim, K.K., Lee, J.J., Yang, Y., You, K.H., and Lee, J.H. (2008c). Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 704-712.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Arihiro, K. (2006). Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 66, 5527-5536.
- Kingsbury, G.A., Feeney, L.A., Nong, Y., Calandra, S.A., Murphy, C.J., Corcoran, J.M., Wang, Y., Prabhu Das, M.R., Busfield, S.J., Fraser, C.C., and Villeval, J.L. (2001). Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol* 166, 5675-5680.
- Kingsley, D.M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8, 133-146.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611-620.
- Kiyozuka, Y., Nakagawa, H., Senzaki, H., Uemura, Y., Adachi, S., Teramoto, Y., Matsuyama, T., Bessho, K., and Tsubura, A. (2001). Bone morphogenetic protein-2 and type IV collagen expression in psammoma body forming ovarian cancer. *Anticancer Res* 21, 1723-1730.
- Klampfer, L. (2006). Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 107-121.
- Koh, C.Y., Blazar, B.R., George, T., Welniak, L.A., Capitini, C.M., Raziuddin, A., Murphy, W.J., and Bennett, M. (2001). Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood* 97, 3132-3137.

- Kohler, M.F., Kerns, B.J., Humphrey, P.A., Marks, J.R., Bast, R.C., Jr., and Berchuck, A. (1993a). Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 81, 643-650.
- Kohler, M.F., Marks, J.R., Wiseman, R.W., Jacobs, I.J., Davidoff, A.M., Clarke-Pearson, D.L., Soper, J.T., Bast, R.C., Jr., and Berchuck, A. (1993b). Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 1513-1519.
- Koniaris, L.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Zeh, H.J., Perez, E., Jin, X.L., Maley, W.R., Zabari, G., Bartlett, D.L., Khanna, A., Franceschi, D., and Schoeniger, L.O. (2005). Pancreaticoduodenectomy in the presence of superior mesenteric venous obstruction. *J Gastrointest Surg* 9, 915-921.
- Koopmann, J., Rosenzweig, C.N., Zhang, Z., Canto, M.I., Brown, D.A., Hunter, M., Yeo, C., Chan, D.W., Breit, S.N., and Goggins, M. (2006). Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. *Clin Cancer Res* 12, 442-446.
- Krammer, P.H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71, 163-210.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krockenberger, M., Dombrowski, Y., Weidler, C., Ossadnik, M., Honig, A., Hausler, S., Voigt, H., Becker, J.C., Leng, L., Steinle, A., Weller, M., Bucala, R., Dietl, J., and Wischhusen, J. (2008). Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D. *J Immunol* 180, 7338-7348.
- Kruger, M., Van de Winkel, J.G., De Wit, T.P., Coorevits, L., and Ceuppens, J.L. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor down-regulates CD14 expression on monocytes. *Immunology* 89, 89-95.
- Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Zhu, G., Mottram, P., Xu, H., Chen, L., and Zou, W. (2006). Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 177, 40-44.
- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 770-774.
- Kupryjanczyk, J., Thor, A.D., Beauchamp, R., Merritt, V., Edgerton, S.M., Bell, D.A., and Yandell, D.W. (1993). p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4961-4965.
- Kvale, G., Heuch, I., Nilssen, S., and Beral, V. (1988). Reproductive factors and risk of ovarian cancer: a prospective study. *Int J Cancer* 42, 246-251.
- Ladanyi, A., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Gaudi, I., and Timar, J. (2004). T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 10, 521-530.
- Lambert, J.R., Kelly, J.A., Shim, M., Huffer, W.E., Nordeen, S.K., Baek, S.J., Eling, T.E., and Lucia, M.S. (2006). Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *J Cell Physiol* 208, 566-574.
- Lane, A.H., Lee, M.M., Fuller, A.F., Jr., Kehas, D.J., Donahoe, P.K., and MacLaughlin, D.T. (1999). Diagnostic utility of Mullerian inhibiting substance determination in patients with primary and recurrent granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol* 73, 51-55.
- Lanier, L.L. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359-393.

- Lanier, L.L. (2001). Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr Opin Immunol* 13, 326-331.
- Lanier, L.L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 15, 308-314.
- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495-502.
- Lanier, L.L., Kipps, T.J., and Phillips, J.H. (1985). Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J Exp Med* 162, 2089-2106.
- Larche, M., Till, S.J., Haselden, B.M., North, J., Barkans, J., Corrigan, C.J., Kay, A.B., and Robinson, D.S. (1998). Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J Immunol* 161, 6375-6382.
- Lawton, L.N., Bonaldo, M.F., Jelenc, P.C., Qiu, L., Baumes, S.A., Marcelino, R.A., de Jesus, G.M., Wellington, S., Knowles, J.A., Warburton, D., Brown, S., and Soares, M.B. (1997). Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 203, 17-26.
- Le Drean, E., Vely, F., Olcese, L., Cambiaggi, A., Guia, S., Krystal, G., Gervois, N., Moretta, A., Jotereau, F., and Vivier, E. (1998). Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 28, 264-276.
- Lebbink, R.J., de Ruiter, T., Adelmeijer, J., Brenkman, A.B., van Helvoort, J.M., Koch, M., Farndale, R.W., Lisman, T., Sonnenberg, A., Lenting, P.J., and Meyaard, L. (2006). Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med* 203, 1419-1425.
- Lebbink, R.J., van den Berg, M.C., de Ruiter, T., Raynal, N., van Roon, J.A., Lenting, P.J., Jin, B., and Meyaard, L. (2008). The soluble leukocyte-associated Ig-like receptor (LAIR)-2 antagonizes the collagen/LAIR-1 inhibitory immune interaction. *J Immunol* 180, 1662-1669.
- Lee, D.H., Yang, Y., Lee, S.J., Kim, K.Y., Koo, T.H., Shin, S.M., Song, K.S., Lee, Y.H., Kim, Y.J., Lee, J.J., Choi, I., and Lee, J.H. (2003). Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res* 63, 4648-4655.
- Lee, J.C., Lee, K.M., Kim, D.W., and Heo, D.S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* 172, 7335-7340.
- Lee, P.P., Yee, C., Savage, P.A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J.S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P.D., Roederer, M., and Davis, M.M. (1999). Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 5, 677-685.
- Lenardo, M., Chan, K.M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17, 221-253.
- Lepage, C., Bouvier, A.M., Binquet, C., Dancourt, V., Coatmeur, O., and Faivre, J. (2006). Are the recommendations of the French consensus conference on the management of colon cancer followed up? *Eur J Cancer Prev* 15, 295-300.
- Letterio, J.J., and Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16, 137-161.

- Li, H., Dakour, J., Guilbert, L.J., Winkler-Lowen, B., Lyall, F., and Morrish, D.W. (2005). PL74, a novel member of the transforming growth factor-beta superfamily, is overexpressed in preeclampsia and causes apoptosis in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3045-3053.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24, 99-146.
- Li, P.X., Wong, J., Ayed, A., Ngo, D., Brade, A.M., Arrowsmith, C., Austin, R.C., and Klamut, H.J. (2000). Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem* 275, 20127-20135.
- Liao, N.S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253, 199-202.
- Lim, J.H., Park, J.W., Min, D.S., Chang, J.S., Lee, Y.H., Park, Y.B., Choi, K.S., and Kwon, T.K. (2007a). NAG-1 up-regulation mediated by EGR-1 and p53 is critical for quercetin-induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis* 12, 411-421.
- Lim, Y.J., Rhee, J.C., Bae, Y.M., and Chun, W.J. (2007b). Celecoxib attenuates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT-15 and HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 13, 1947-1952.
- Lin, E.Y., and Pollard, J.W. (2004). Role of infiltrated leucocytes in tumor growth and spread. *Br J Cancer* 90, 2053-2058.
- Lindmark, F., Zheng, S.L., Wiklund, F., Bensen, J., Balter, K.A., Chang, B., Hedelin, M., Clark, J., Stattin, P., Meyers, D.A., Adami, H.O., Isaacs, W., Gronberg, H., and Xu, J. (2004). H6D polymorphism in macrophage-inhibitory cytokine-1 gene associated with prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 1248-1254.
- Liu, C.C., Persechini, P.M., and Young, J.D. (1995a). Perforin and lymphocyte-mediated cytolysis. *Immunol Rev* 146, 145-175.
- Liu, C.C., Walsh, C.M., and Young, J.D. (1995b). Perforin: structure and function. *Immunol Today* 16, 194-201.
- Liu, S.J., Tsai, J.P., Shen, C.R., Sher, Y.P., Hsieh, C.L., Yeh, Y.C., Chou, A.H., Chang, S.R., Hsiao, K.N., Yu, F.W., and Chen, H.W. (2007). Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol* 82, 354-360.
- Liu, T., Bauskin, A.R., Zaunders, J., Brown, D.A., Pankhurst, S., Russell, P.J., and Breit, S.N. (2003). Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* 63, 5034-5040.
- Liu, Z., Lu, H., Jiang, Z., Pastuszyn, A., and Hu, C.A. (2005). Apolipoprotein I6, a novel proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein, induces mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. *Mol Cancer Res* 3, 21-31.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162, 1745-1759.
- Loberg, R.D., Day, L.L., Dunn, R., Kalikin, L.M., and Pienta, K.J. (2006). Inhibition of decay-accelerating factor (CD55) attenuates prostate cancer growth and survival in vivo. *Neoplasia* 8, 69-78.
- Loercher, A.E., Nash, M.A., Kavanagh, J.J., Platsoucas, C.D., and Freedman, R.S. (1999). Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells. *J Immunol* 163, 6251-6260.
- Long, E.O. (2002). Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol* 12, 57-61.

- Long, E.O., Barber, D.F., Burshtyn, D.N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C.C., Wagtmann, N., and Watzl, C. (2001). Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev* 181, 223-233.
- Louten, J., Boniface, K., and de Waal Malefyt, R. (2009). Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1004-1011.
- Lu, Z., and Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58, 621-631.
- Lynch, M.A., Nakashima, R., Song, H., DeGross, V.L., Wang, D., Enomoto, T., and Weghorst, C.M. (1998). Mutational analysis of the transforming growth factor beta receptor type II gene in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 58, 4227-4232.
- Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., Jong, S., and Samali, A. (2009). TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev* 35, 280-288.
- Mann, W.J., Patsner, B., Cohen, H., and Loesch, M. (1988). Preoperative serum CA-125 levels in patients with surgical stage I invasive ovarian adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 80, 208-209.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13, 265-270.
- Mapara, M.Y., and Sykes, M. (2004). Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 22, 1136-1151.
- Marjono, A.B., Brown, D.A., Horton, K.E., Wallace, E.M., Breit, S.N., and Manuelpillai, U. (2003). Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Placenta* 24, 100-106.
- Markel, G., Lieberman, N., Katz, G., Arnon, T.I., Lotem, M., Drize, O., Blumberg, R.S., Bar-Haim, E., Mader, R., Eisenbach, L., and Mandelboim, O. (2002). CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol* 168, 2803-2810.
- Markman, M., Webster, K., Zanotti, K., Peterson, G., Kulp, B., and Belinson, J. (2004). Survival following the documentation of platinum and taxane resistance in ovarian cancer: a single institution experience involving multiple phase 2 clinical trials. *Gynecol Oncol* 93, 699-701.
- Markowitz, S.D., and Roberts, A.B. (1996). Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 93-102.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5, 1260-1265.
- Martinez, J.M., Sali, T., Okazaki, R., Anna, C., Hollingshead, M., Hose, C., Monks, A., Walker, N.J., Baek, S.J., and Eling, T.E. (2006). Drug-induced expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene/macrophage inhibitory cytokine-1/prostate-derived factor, a putative tumor suppressor, inhibits tumor growth. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 899-906.
- Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22, 355-370.
- Masilamani, M., Nguyen, C., Kabat, J., Borrego, F., and Coligan, J.E. (2006). CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse. *J Immunol* 177, 3590-3596.

- Massague, J. (1987). The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49, 437-438.
- Massague, J. (1992). Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 69, 1067-1070.
- Massague, J. (1996). TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85, 947-950.
- Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 169-178.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- Massague, J., Blain, S.W., and Lo, R.S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- Massague, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14, 627-644.
- Matzuk, M.M., Finegold, M.J., Su, J.G., Hsueh, A.J., and Bradley, A. (1992). Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360, 313-319.
- Mbeunkui, F., and Johann, D.J., Jr. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* 63, 571-582.
- McGuckin, C., Jurga, M., Ali, H., Strbad, M., and Forraz, N. (2008). Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nat Protoc* 3, 1046-1055.
- McGuire, W.P., Hoskins, W.J., Brady, M.F., Kucera, P.R., Partridge, E.E., Look, K.Y., Clarke-Pearson, D.L., and Davidson, M. (1996a). Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 334, 1-6.
- McGuire, W.P., Hoskins, W.J., Brady, M.F., Kucera, P.R., Partridge, E.E., Look, K.Y., Clarke-Pearson, D.L., and Davidson, M. (1996b). Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase III randomized trial in patients with suboptimal stage III/IV ovarian cancer (from the Gynecologic Oncology Group). *Semin Oncol* 23, 40-47.
- McPherson, S.J., Mellor, S.L., Wang, H., Evans, L.W., Groome, N.P., and Risbridger, G.P. (1999). Expression of activin A and follistatin core proteins by human prostate tumor cell lines. *Endocrinology* 140, 5303-5309.
- Melichar, B., Savary, C., Kudelka, A.P., Verschraegen, C., Kavanagh, J.J., Edwards, C.L., Platsoucas, C.D., and Freedman, R.S. (1998). Lineage-negative human leukocyte antigen-DR+ cells with the phenotype of undifferentiated dendritic cells in patients with carcinoma of the abdomen and pelvis. *Clin Cancer Res* 4, 799-809.
- Melichar, B., Savary, C.A., Patenia, R., Templin, S., Melicharova, K., and Freedman, R.S. (2003b). Phenotype and antitumor activity of ascitic fluid monocytes in patients with ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 13, 435-443.
- Melichar, B., Touskova, M., Tosner, J., and Kopecky, O. (2001). The phenotype of ascitic fluid lymphocytes in patients with ovarian carcinoma and other primaries. *Onkologie* 24, 156-160.
- Memarzadeh, S., and Berek, J.S. (2001). Advances in the management of epithelial ovarian cancer. *J Reprod Med* 46, 621-629; discussion 629-630.
- Menon, U., and Jacobs, I.J. (2001a). Ovarian cancer screening in the general population. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13, 61-64.
- Menon, U., and Jacobs, I.J. (2001b). Ovarian cancer screening in the general population: current status. *Int J Gynecol Cancer* 11 Suppl 1, 3-6.
- Meyaard, L. (2008). The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J Leukoc Biol* 83, 799-803.

- Meyaard, L., Adema, G.J., Chang, C., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1997). LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* 7, 283-290.
- Meyaard, L., Hurenkamp, J., Clevers, H., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 functions as an inhibitory receptor on cytotoxic T cells. *J Immunol* 162, 5800-5804.
- Meyaard, L., van der Vuurst de Vries, A.R., de Ruiter, T., Lanier, L.L., Phillips, J.H., and Clevers, H. (2001). The epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) is a ligand for the leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor (LAIR). *J Exp Med* 194, 107-112.
- Meyer, T., and Rustin, G.J. (2000). Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 82, 1535-1538.
- Mikesch, J.H., Buerger, H., Simon, R., and Brandt, B. (2006). Decay-accelerating factor (CD55): a versatile acting molecule in human malignancies. *Biochim Biophys Acta* 1766, 42-52.
- Modesitt, S.C., Tortolero-Luna, G., Robinson, J.B., Gershenson, D.M., and Wolf, J.K. (2002). Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet Gynecol* 100, 788-795.
- Moll, F., Millet, C., Noel, D., Orsetti, B., Bardin, A., Katsaros, D., Jorgensen, C., Garcia, M., Theillet, C., Pujol, P., and Francois, V. (2006). Chordin is underexpressed in ovarian tumors and reduces tumor cell motility. *FASEB J* 20, 240-250.
- Moore, A.G., Brown, D.A., Fairlie, W.D., Bauskin, A.R., Brown, P.K., Munier, M.L., Russell, P.K., Salamonsen, L.A., Wallace, E.M., and Breit, S.N. (2000). The transforming growth factor- β superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4781-4788.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19, 197-223.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., and Moretta, A. (2000). Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 21, 420-422.
- Morice, P., Brehier-Ollive, D., Rey, A., Atallah, D., Lhomme, C., Pautier, P., Pomel, C., Camatte, S., Duvillard, P., and Castaigne, D. (2003a). Results of interval debulking surgery in advanced stage ovarian cancer: an exposed-non-exposed study. *Ann Oncol* 14, 74-77.
- Morice, P., Joulie, F., Camatte, S., Atallah, D., Rouzier, R., Pautier, P., Pomel, C., Lhomme, C., Duvillard, P., and Castaigne, D. (2003b). Lymph node involvement in epithelial ovarian cancer: analysis of 276 pelvic and paraaortic lymphadenectomies and surgical implications. *J Am Coll Surg* 197, 198-205.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibin, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., Gauldie, J., and Bleackley, R.C. (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500.
- Moutsopoulos, N.M., Wen, J., and Wahl, S.M. (2008). TGF- β and tumors--an ill-fated alliance. *Curr Opin Immunol* 20, 234-240.
- Nagele, F., Petru, E., Medl, M., Kainz, C., Graf, A.H., and Sevela, P. (1995). Preoperative CA 125: an independent prognostic factor in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 86, 259-264.

- Nakagomi, H., Petersson, M., Magnusson, I., Juhlin, C., Matsuda, M., Mellstedt, H., Taupin, J.L., Vivier, E., Anderson, P., and Kiessling, R. (1993). Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 53, 5610-5612.
- Nakamura, T., Scorilas, A., Stephan, C., Yousef, G.M., Kristiansen, G., Jung, K., and Diamandis, E.P. (2003). Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues. *Br J Cancer* 88, 1101-1104.
- Naora, H., and Montell, D.J. (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 5, 355-366.
- Nauts, H.C., and McLaren, J.R. (1990). Coley toxins--the first century. *Adv Exp Med Biol* 267, 483-500.
- Naylor, M.S., Stamp, G.W., Foulkes, W.D., Eccles, D., and Balkwill, F.R. (1993). Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 91, 2194-2206.
- Nazarova, N., Qiao, S., Golovko, O., Lou, Y.R., and Tuohimaa, P. (2004). Calcitriol-induced prostate-derived factor: autocrine control of prostate cancer cell growth. *Int J Cancer* 112, 951-958.
- Negus, R.P., Stamp, G.W., Hadley, J., and Balkwill, F.R. (1997). Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am J Pathol* 150, 1723-1734.
- Negus, R.P., Stamp, G.W., Relf, M.G., Burke, F., Malik, S.T., Bernasconi, S., Allavena, P., Sozzani, S., Mantovani, A., and Balkwill, F.R. (1995). The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* 95, 2391-2396.
- Nelson, D., and Ganss, R. (2006). Tumor growth or regression: powered by inflammation. *J Leukoc Biol* 80, 685-690.
- Nesti, L.J., Caterson, E.J., Li, W.J., Chang, R., McCann, T.D., Hoek, J.B., and Tuan, R.S. (2007). TGF-beta1 calcium signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem* 101, 348-359.
- North, J., Bakhsh, I., Marden, C., Pittman, H., Addison, E., Navarrete, C., Anderson, R., and Lowdell, M.W. (2007). Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. *J Immunol* 178, 85-94.
- North, J., Weaver, M.S., Stammers, A.T., Chu, N.R., Chan, A., and Levy, J.G. (1988). Identification of a T cell subset using a rabbit antibody raised against a T suppressor molecule. *J Immunol* 141, 2268-2274.
- Novellino, L., Castelli, C., and Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother* 54, 187-207.
- O'Connell, J., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1997). The Fas counterattack: a molecular mechanism of tumor immune privilege. *Mol Med* 3, 294-300.
- O'Connell, J., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1999a). Fas counter-attack--the best form of tumor defense? *Nat Med* 5, 267-268.
- O'Connell, J., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1999b). The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 20, 46-52.
- O'Connell, J., Houston, A., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C., and Shanahan, F. (2001). Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nat Med* 7, 271-274.
- O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., and Shanahan, F. (1996). The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184, 1075-1082.

- Ohnuma, K., Yamochi, T., Uchiyama, M., Nishibashi, K., Yoshikawa, N., Shimizu, N., Iwata, S., Tanaka, H., Dang, N.H., and Morimoto, C. (2004). CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14186-14191.
- Olson, N.E., Graves, J.D., Shu, G.L., Ryan, E.J., and Clark, E.A. (2003). Caspase activity is required for stimulated B lymphocytes to enter the cell cycle. *J Immunol* 170, 6065-6072.
- Orre, M., and Rogers, P.A. (1999). Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 73, 47-50.
- Ostman, A., Hellberg, C., and Bohmer, F.D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 307-320.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2008). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* 18, 11-18.
- Pang, R.P., Zhou, J.G., Zeng, Z.R., Li, X.Y., Chen, W., Chen, M.H., and Hu, P.J. (2007). Celecoxib induces apoptosis in COX-2 deficient human gastric cancer cells through Akt/GSK3beta/NAG-1 pathway. *Cancer Lett* 251, 268-277.
- Panopoulou, E., Murphy, C., Rasmussen, H., Bagli, E., Rofstad, E.K., and Fotsis, T. (2005). Activin A suppresses neuroblastoma xenograft tumor growth via antimitotic and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res* 65, 1877-1886.
- Paralkar, V.M., Vail, A.L., Grasser, W.A., Brown, T.A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H.Z., Qi, H., Owen, T.A., and Thompson, D.D. (1998). Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *J Biol Chem* 273, 13760-13767.
- Pardali, K., and Moustakas, A. (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1775, 21-62.
- Pardoll, D.M. (2001). Immunology. Stress, NK receptors, and immune surveillance. *Science* 294, 534-536.
- Pellegrini, P., Berghella, A.M., Del Beato, T., Cicia, S., Adorno, D., and Casciani, C.U. (1996). Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol Immunother* 42, 1-8.
- Philip, M., Rowley, D.A., and Schreiber, H. (2004). Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 14, 433-439.
- Piek, E., and Roberts, A.B. (2001). Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor-beta and its signaling pathways in tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 83, 1-54.
- Pinkoski, M.J., Waterhouse, N.J., Heibein, J.A., Wolf, B.B., Kuwana, T., Goldstein, J.C., Newmeyer, D.D., Bleackley, R.C., and Green, D.R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 276, 12060-12067.
- Piyanuch, R., Sukhthankar, M., Wandee, G., and Baek, S.J. (2007). Berberine, a natural isoquinoline alkaloid, induces NAG-1 and ATF3 expression in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 258, 230-240.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., McKinnon, P.J., Hallek, M., and Engert, A. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27, 965-974.

- Poggi, A., Panzeri, M.C., Moretta, L., and Zocchi, M.R. (1996). CD31-triggered rearrangement of the actin cytoskeleton in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 26, 817-824.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.
- Pure, E., Allison, J.P., and Schreiber, R.D. (2005). Breaking down the barriers to cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 6, 1207-1210.
- Quesnel, B. (2008). Dormant tumor cells as a therapeutic target? *Cancer Lett* 267, 10-17.
- Rabinowich, H., Reichert, T.E., Kashii, Y., Gastman, B.R., Bell, M.C., and Whiteside, T.L. (1998). Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest* 101, 2579-2588.
- Raffaghello, L., Prigione, I., Airoidi, I., Camoriano, M., Levreri, I., Gambini, C., Pende, D., Steinle, A., Ferrone, S., and Pistoia, V. (2004). Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 6, 558-568.
- Rajagopalan, S., Fu, J., and Long, E.O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 167, 1877-1881.
- Ramaswamy, M., and Siegel, R.M. (2007). A FAScinating receptor in self-tolerance. *Immunity* 26, 545-547.
- Ramirez, J.M., Schaad, O., Durual, S., Cossali, D., Docquier, M., Beris, P., Descombes, P., and Matthes, T. (2009). Growth differentiation factor 15 production is necessary for normal erythroid differentiation and is increased in refractory anaemia with ring-sideroblasts. *Br J Haematol* 144, 251-262.
- Raulet, D.H. (2004). Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5, 996-1002.
- Reim, F., Dombrowski, Y., Ritter, C., Buttman, M., Hausler, S., Ossadnik, M., Krockenberger, M., Beier, D., Beier, C.P., Dietl, J., Becker, J.C., Honig, A., and Wischhusen, J. (2009). Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44^{high}/CD24^{low}/HER2^{low} breast cancer stem cells. *Cancer Res* 69, 8058-8066.
- Renard, V., Cambiaggi, A., Vely, F., Blery, M., Olcese, L., Olivero, S., Bouchet, M., and Vivier, E. (1997). Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 155, 205-221.
- Resta, L., Russo, S., Colucci, G.A., and Prat, J. (1993). Morphologic precursors of ovarian epithelial tumors. *Obstet Gynecol* 82, 181-186.
- Restifo, N.P. (2000). Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* 6, 493-495.
- Restifo, N.P. (2001). Countering the 'counterattack' hypothesis. *Nat Med* 7, 259.
- Restifo, N.P., Kawakami, Y., Marincola, F., Shamamian, P., Taggarse, A., Esquivel, F., and Rosenberg, S.A. (1993). Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 14, 182-190.
- Riccardi, C., Santoni, A., Barlozzari, T., Puccetti, P., and Herberman, R.B. (1980). In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int J Cancer* 25, 475-486.

- Rich, J., Borton, A., and Wang, X. (2001). Transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Microsc Res Tech* 52, 363-373.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.
- Robertson, D.M., Burger, H.G., and Fuller, P.J. (2004a). Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* 11, 35-49.
- Robertson, D.M., Pruyssers, E., Burger, H.G., Jobling, T., McNeillage, J., and Healy, D. (2004b). Inhibins and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 225, 65-71.
- Robertson, M.J., Cameron, C., Lazo, S., Cochran, K.J., Voss, S.D., and Ritz, J. (1996a). Costimulation of human natural killer cell proliferation: role of accessory cytokines and cell contact-dependent signals. *Nat Immun* 15, 213-226.
- Robertson, M.J., Cochran, K.J., Cameron, C., Le, J.M., Tantravahi, R., and Ritz, J. (1996b). Characterization of a cell line, NK1, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* 24, 406-415.
- Robertson, M.J., and Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-2438.
- Robinson-Smith, T.M., Isaacsohn, I., Mercer, C.A., Zhou, M., Van Rooijen, N., Husseinzadeh, N., McFarland-Mancini, M.M., and Drew, A.F. (2007). Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res* 67, 5708-5716.
- Robson, N.C., Wei, H., McAlpine, T., Kirkpatrick, N., Cebon, J., and Maraskovsky, E. (2009). Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. *Blood* 113, 3218-3225.
- Roda, J.M., Parihar, R., Magro, C., Nuovo, G.J., Tridandapani, S., and Carson, W.E., 3rd (2006). Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res* 66, 517-526.
- Rodland, K.D., Muldoon, L.L., and Magun, B.E. (1990b). Cellular mechanisms of TGF-beta action. *J Invest Dermatol* 94, 33S-40S.
- Rodriguez, G.C., Walmer, D.K., Cline, M., Krigman, H., Lessey, B.A., Whitaker, R.S., Dodge, R., and Hughes, C.L. (1998). Effect of progestin on the ovarian epithelium of macaques: cancer prevention through apoptosis? *J Soc Gynecol Investig* 5, 271-276.
- Rohn, T.A., Wagenknecht, B., Roth, W., Naumann, U., Gulbins, E., Krammer, P.H., Walczak, H., and Weller, M. (2001). CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 20, 4128-4137.
- Romero, P., Dunbar, P.R., Valmori, D., Pittet, M., Ogg, G.S., Rimoldi, D., Chen, J.L., Lienard, D., Cerottini, J.C., and Cerundolo, V. (1998). Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1641-1650.
- Rook, A.H., Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Burlington, D.B., Lane, H.C., and Fauci, A.S. (1986). Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* 136, 3916-3920.
- Rosairo, D., Kuyznierewicz, I., Findlay, J., and Drummond, A. (2008). Transforming growth factor-beta: its role in ovarian follicle development. *Reproduction* 136, 799-809.

- Rosen, D.B., Cao, W., Avery, D.T., Tangye, S.G., Liu, Y.J., Houchins, J.P., and Lanier, L.L. (2008). Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol* 180, 6508-6517.
- Ross, J.S., and Fletcher, J.A. (1999). The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol* 9, 125-138.
- Ross, J.S., Yang, F., Kallakury, B.V., Sheehan, C.E., Ambros, R.A., and Muraca, P.J. (1999). HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *Am J Clin Pathol* 111, 311-316.
- Rouas-Freiss, N., Goncalves, R.M., Menier, C., Dausset, J., and Carosella, E.D. (1997a). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11520-11525.
- Rouas-Freiss, N., Marchal, R.E., Kirszenbaum, M., Dausset, J., and Carosella, E.D. (1997b). The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5249-5254.
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Ferrone, S., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res* 65, 10139-10144.
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., LeMaout, J., and Carosella, E.D. (2007). Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin Cancer Biol* 17, 413-421.
- Rubio, V., Stuge, T.B., Singh, N., Betts, M.R., Weber, J.S., Roederer, M., and Lee, P.P. (2003). Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 9, 1377-1382.
- Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229, 12-26.
- Rustin, G.J., Nelstrop, A.E., Bentzen, S.M., Piccart, M.J., and Bertelsen, K. (1999). Use of tumour markers in monitoring the course of ovarian cancer. *Ann Oncol* 10 Suppl 1, 21-27.
- Salazar-Mather, T.P., Hamilton, T.A., and Biron, C.A. (2000). A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* 105, 985-993.
- Salih, H.R., Goehlsdorf, D., and Steinle, A. (2006). Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol* 67, 188-195.
- Salmond, R.J., Huyer, G., Kotsoni, A., Clements, L., and Alexander, D.R. (2005). The src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 regulates primary T-dependent immune responses and Th cell differentiation. *J Immunol* 175, 6498-6508.
- Salvesen, G.S., and Riedl, S.J. (2008). Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 615, 13-23.
- Sanchez-Capelo, A. (2005). Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 15-34.
- Sancho, D., Gomez, M., and Sanchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 26, 136-140.
- Santander, C., and Brandan, E. (2006). Betaglycan induces TGF-beta signaling in a ligand-independent manner, through activation of the p38 pathway. *Cell Signal* 18, 1482-1491.
- Santin, A.D., Zhan, F., Bellone, S., Palmieri, M., Cane, S., Bignotti, E., Anfossi, S., Gokden, M., Dunn, D., Roman, J.J., O'Brien, T.J., Tian, E., Cannon, M.J., Shaughnessy, J., Jr., and Pecorelli, S. (2004). Gene expression profiles

in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer* 112, 14-25.

Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y.T., Ohtani, H., Old, L.J., and Odunsi, K. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18538-18543.

Saudemont, A., Jouy, N., Hetuin, D., and Quesnel, B. (2005). NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood* 105, 2428-2435.

Saverino, D., Fabbi, M., Merlo, A., Ravera, G., Grossi, C.E., and Ciccone, E. (2002). Surface density expression of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is directly related to inhibition of human T-cell functions. *Hum Immunol* 63, 534-546.

Schaner, M.E., Ross, D.T., Ciaravino, G., Sorlie, T., Troyanskaya, O., Diehn, M., Wang, Y.C., Duran, G.E., Sikic, T.L., Caldeira, S., Skomedal, H., Tu, I.P., Hernandez-Boussard, T., Johnson, S.W., O'Dwyer, P.J., Fero, M.J., Kristensen, G.B., Borresen-Dale, A.L., Hastie, T., Tibshirani, R., van de Rijn, M., Teng, N.N., Longacre, T.A., Botstein, D., Brown, P.O., and Sikic, B.I. (2003). Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Mol Biol Cell* 14, 4376-4386.

Scheffe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., and Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med* 84, 901-910.

Schildkraut, J.M., Bastos, E., and Berchuck, A. (1997). Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 89, 932-938.

Schleinitz, N., March, M.E., and Long, E.O. (2008). Recruitment of activation receptors at inhibitory NK cell immune synapses. *PLoS One* 3, e3278.

Schober, A., Bottner, M., Strelau, J., Kinscherf, R., Bonaterra, G.A., Barth, M., Schilling, L., Fairlie, W.D., Breit, S.N., and Unsicker, K. (2001). Expression of growth differentiation factor-15/ macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain. *J Comp Neurol* 439, 32-45.

Schuster, N., Bender, H., Philippi, A., Subramaniam, S., Strelau, J., Wang, Z., and Kriegelstein, K. (2002a). TGF-beta induces cell death in the oligodendroglial cell line OLI-neu. *Glia* 40, 95-108.

Schuster, N., Dunker, N., and Kriegelstein, K. (2002b). Transforming growth factor-beta induced cell death in the developing chick retina is mediated via activation of c-jun N-terminal kinase and downregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-X(L). *Neurosci Lett* 330, 239-242.

Schuster, N., and Kriegelstein, K. (2002). Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 307, 1-14.

Schutte, M., Hruban, R.H., Hedrick, L., Cho, K.R., Nadasdy, G.M., Weinstein, C.L., Bova, G.S., Isaacs, W.B., Cairns, P., Nawroz, H., Sidransky, D., Casero, R.A., Jr., Meltzer, P.S., Hahn, S.A., and Kern, S.E. (1996). DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 56, 2527-2530.

Scott, A.M., and Saleh, M. (2007). The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ* 14, 23-31.

- Screpanti, V., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G., and Grandien, A. (2001). A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol* 167, 2068-2073.
- Scully, R.E. (1995a). Early de novo ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 49 Suppl, S9-15.
- Scully, R.E. (1995b). Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl* 23, 208-218.
- Scully, R.E., Henson, D.E., Nielsen, M.L., and Ruby, S.G. (1999). Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the fallopian tube: a basis for checklists. Cancer Committee, College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 123, 33-38.
- Selander, K.S., Brown, D.A., Sequeiros, G.B., Hunter, M., Desmond, R., Parpala, T., Risteli, J., Breit, S.N., and Jukkola-Vuorinen, A. (2007). Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 532-537.
- Seliger, B., Ritz, U., and Ferrone, S. (2006). Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer* 118, 129-138.
- Shah, A.H., and Lee, C. (2000). TGF-beta-based immunotherapy for cancer: breaching the tumor firewall. *Prostate* 45, 167-172.
- Shepherd, T.G., and Nachtigal, M.W. (2003). Identification of a putative autocrine bone morphogenetic protein-signaling pathway in human ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. *Endocrinology* 144, 3306-3314.
- Sherf, B.A., Navarro, S.L., Hannah, R.R. et al. (1996). *Promega Notes Magazine* 57:2.
- Shevach, E.M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shim, M., and Eling, T.E. (2005). Protein kinase C-dependent regulation of NAG-1/placental bone morphogenic protein/MIC-1 expression in LNCaP prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 280, 18636-18642.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163, 5211-5218.
- Shimizu, Y., Kamoi, S., Amada, S., Akiyama, F., and Silverberg, S.G. (1998). Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 82, 893-901.
- Shin, D.Y., Kim, G.Y., Kim, N.D., Jung, J.H., Kim, S.K., Kang, H.S., and Choi, Y.H. (2008). Induction of apoptosis by pectenotoxin-2 is mediated with the induction of DR4/DR5, Egr-1 and NAG-1, activation of caspases and modulation of the Bcl-2 family in p53-deficient Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 19, 517-526.
- Shin, E.C., Choi, K.S., Kim, S.J., and Shin, J.S. (2004). Modulation of the surface expression of CD158 killer cell Ig-like receptor by interleukin-2 and transforming growth factor-beta. *Yonsei Med J* 45, 510-514.
- Shin, I., Bakin, A.V., Rodeck, U., Brunet, A., and Arteaga, C.L. (2001). Transforming growth factor beta enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHL1. *Mol Biol Cell* 12, 3328-3339.
- Shnaper, S., Desbaillets, I., Brown, D.A., Murat, A., Migliavacca, E., Schlupe, M., Ostermann, S., Hamou, M.F., Stupp, R., Breit, S.N., de Tribolet, N., and Hegi, M.E. (2009). Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome. *Int J Cancer* 125, 2624-2630.

- Siegel, P.M., and Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-821.
- Singer, G., Oldt, R., 3rd, Cohen, Y., Wang, B.G., Sidransky, D., Kurman, R.J., and Shih Ie, M. (2003a). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95, 484-486.
- Singer, G., Rebmann, V., Chen, Y.C., Liu, H.T., Ali, S.Z., Reinsberg, J., McMaster, M.T., Pfeiffer, K., Chan, D.W., Wardelmann, E., Grosse-Wilde, H., Cheng, C.C., Kurman, R.J., and Shih Ie, M. (2003b). HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 9, 4460-4464.
- Singethan, K., and Schneider-Schaulies, J. (2008). Tetraspanins: Small transmembrane proteins with big impact on membrane microdomain structures. *Commun Integr Biol* 1, 11-13.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., and et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L., Degli-Esposti, M.A., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42, 501-510.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006a). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90, 1-50.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2, 293-299.
- Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002b). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 850-861.
- Smyth, M.J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J.J., van den Brink, M.R., and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6.
- Smyth, M.J., Teng, M.W., Swann, J., Kyparissoudis, K., Godfrey, D.I., and Hayakawa, Y. (2006b). CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 176, 1582-1587.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Cretney, E., Kelly, J.M., Snook, M.B., Forbes, C.A., and Scalzo, A.A. (1999). Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol* 162, 6658-6662.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000a). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191, 661-668.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000b). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192, 755-760.
- Song, H., Hur, D.Y., Kim, K.E., Park, H., Kim, T., Kim, C.W., Bang, S., and Cho, D.H. (2006a). IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol* 242, 39-45.
- Song, H., Kim, J., Cosman, D., and Choi, I. (2006b). Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* 239, 22-30.

- Spitto, M.T., Yu, P., Rowley, D.A., Nishimura, M.I., Meredith, S.C., Gajewski, T.F., Fu, Y.X., and Schreiber, H. (2002). Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17, 737-747.
- Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1990). TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul* 1, 875-882.
- Stark, S., and Watzl, C. (2006). 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol* 18, 241-247.
- Stein, R., Mattes, M.J., Cardillo, T.M., Hansen, H.J., Chang, C.H., Burton, J., Govindan, S., and Goldenberg, D.M. (2007). CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res* 13, 5556s-5563s.
- Steller, M.D., Shaw, T.J., Vanderhyden, B.C., and Ethier, J.F. (2005). Inhibin resistance is associated with aggressive tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 3, 50-61.
- Stern-Ginossar, N., and Mandelboim, O. (2009). An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 128, 1-6.
- Stewart, T.J., and Abrams, S.I. (2008). How tumours escape mass destruction. *Oncogene* 27, 5894-5903.
- Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H., and Galle, P.R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2, 1361-1366.
- Strelau, J., Bottner, M., Lingor, P., Suter-Crazzolara, C., Galter, D., Jaszai, J., Sullivan, A., Schober, A., Krieglstein, K., and Unsicker, K. (2000a). GDF-15/MIC-1 a novel member of the TGF-beta superfamily. *J Neural Transm Suppl*, 273-276.
- Strelau, J., Schmeer, C., Peterziel, H., Sackmann, T., Herold-Mende, C., Steiner, H., Weller, M., and Unsicker, K. (2008). Expression and putative functions of GDF-15, a member of the TGF-beta superfamily, in human glioma and glioblastoma cell lines. *Cancer Lett* 270, 30-39.
- Strelau, J., Sullivan, A., Bottner, M., Lingor, P., Falkenstein, E., Suter-Crazzolara, C., Galter, D., Jaszai, J., Krieglstein, K., and Unsicker, K. (2000b). Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci* 20, 8597-8603.
- Subramaniam, S., Strelau, J., and Unsicker, K. (2003). Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *J Biol Chem* 278, 8904-8912.
- Sun, L., Wu, S., Coleman, K., Fields, K.C., Humphrey, L.E., and Brattain, M.G. (1994). Autocrine transforming growth factor-beta 1 and beta 2 expression is increased by cell crowding and quiescence in colon carcinoma cells. *Exp Cell Res* 214, 215-224.
- Sun, M., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z., Coppola, D., Lu, Y.Y., Shelley, S.A., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2001). Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res* 61, 5985-5991.
- Takai, T., and Ono, M. (2001). Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family. *Immunol Rev* 181, 215-222.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7, 94-100.

- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195, 161-169.
- Tan, M., Wang, Y., Guan, K., and Sun, Y. (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 109-114.
- Tangye, S.G., Nichols, K.E., Hare, N.J., and van de Weerd, B.C. (2003). Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J Immunol* 171, 2485-2495.
- Tanno, T., Bhanu, N.V., Oneal, P.A., Goh, S.H., Staker, P., Lee, Y.T., Moroney, J.W., Reed, C.H., Luban, N.L., Wang, R.H., Eling, T.E., Childs, R., Ganz, T., Leitman, S.F., Fucharoen, S., and Miller, J.L. (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 13, 1096-1101.
- Teicher, B.A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 13, 6247-6251.
- Terme, M., Chaput, N., Combadiere, B., Ma, A., Ohteki, T., and Zitvogel, L. (2008a). Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4+ self-reactive T cells. *J Immunol* 180, 4679-4686.
- Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N.F., Chaput, N., and Zitvogel, L. (2008b). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 9, 486-494.
- Terunuma, H., Deng, X., Dewan, Z., Fujimoto, S., and Yamamoto, N. (2008). Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int Rev Immunol* 27, 93-110.
- Thomas, D.A., and Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369-380.
- Thomas, R., True, L.D., Lange, P.H., and Vessella, R.L. (2001). Placental bone morphogenetic protein (PLAB) gene expression in normal, pre-malignant and malignant human prostate: relation to tumor development and progression. *Int J Cancer* 93, 47-52.
- Tomasello, E., Blery, M., Vely, F., and Vivier, E. (2000). Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* 12, 139-147.
- Tong, S., Marjono, B., Brown, D.A., Mulvey, S., Breit, S.N., Manuelpillai, U., and Wallace, E.M. (2004). Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *Lancet* 363, 129-130.
- Torre-Amione, G., Beauchamp, R.D., Koeppen, H., Park, B.H., Schreiber, H., Moses, H.L., and Rowley, D.A. (1990). A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1486-1490.
- Trapani, J.A., Davis, J., Sutton, V.R., and Smyth, M.J. (2000). Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol* 12, 323-329.
- Trapani, J.A., and Sutton, V.R. (2003). Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol* 15, 533-543.

- Trapani, J.A., Sutton, V.R., Thia, K.Y., Li, Y.Q., Froelich, C.J., Jans, D.A., Sandrin, M.S., and Browne, K.A. (2003). A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol* 160, 223-233.
- Tsung, K., Meko, J.B., Peplinski, G.R., Tsung, Y.L., and Norton, J.A. (1997). IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158, 3359-3365.
- Tuefferd, M., Couturier, J., Penault-Llorca, F., Vincent-Salomon, A., Broet, P., Guastalla, J.P., Allouache, D., Combe, M., Weber, B., Pujade-Lauraine, E., and Camilleri-Broet, S. (2007). HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PLoS One* 2, e1138.
- Tuxen, M.K., Soletormos, G., and Dombernowsky, P. (1995). Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 21, 215-245.
- Uchida, K., Chaudhary, L.R., Sugimura, Y., Adkisson, H.D., and Hruska, K.A. (2003). Proprotein convertases regulate activity of prostate epithelial cell differentiation markers and are modulated in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 88, 394-399.
- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E.H., Krystal, G., Ali, S., and Lebrun, J.J. (2002). Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 4, 963-969.
- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7, 739-751.
- van den Broek, M.F., Kagi, D., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1995). Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol* 25, 3514-3516.
- van Haften-Day, C., Russell, P., Davies, S., King, N.J., and Tattersall, M.H. (2003). Expression of Fas and FasL in human serous ovarian epithelial tumors. *Hum Pathol* 34, 74-79.
- Van Niekerk, C.C., Ramaekers, F.C., Hanselaar, A.G., Aldeweireldt, J., and Poels, L.G. (1993). Changes in expression of differentiation markers between normal ovarian cells and derived tumors. *Am J Pathol* 142, 157-177.
- Vanhara, P., Lincova, E., Kozubik, A., Jurdic, P., Soucek, K., and Smarda, J. (2009). Growth/differentiation factor-15 inhibits differentiation into osteoclasts—a novel factor involved in control of osteoclast differentiation. *Differentiation* 78, 213-222.
- Veillette, A. (2006). NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol Rev* 214, 22-34.
- Veillette, A., and Latour, S. (2003). The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 277-285.
- Venkataraman, G.M., Suci, D., Groh, V., Boss, J.M., and Spies, T. (2007). Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 178, 961-969.
- Visintin, I., Feng, Z., Longton, G., Ward, D.C., Alvero, A.B., Lai, Y., Tenthorey, J., Leiser, A., Flores-Saib, R., Yu, H., Azori, M., Rutherford, T., Schwartz, P.E., and Mor, G. (2008). Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 14, 1065-1072.
- Vitt, U.A., Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. (2001). Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol* 15, 681-694.

- Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9, 537-549.
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 68, 6368-6376.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27, 5932-5943.
- Wang, D., Kanuma, T., Mizumuma, H., Ibuki, Y., and Takenoshita, S. (2000a). Mutation analysis of the Smad6 and Smad7 gene in human ovarian cancers. *Int J Oncol* 17, 1087-1091.
- Wang, D., Kanuma, T., Mizunuma, H., Takama, F., Ibuki, Y., Wake, N., Mogi, A., Shitara, Y., and Takenoshita, S. (2000b). Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res* 60, 4507-4512.
- Wang, D., Kanuma, T., Takama, F., Mizumuma, H., Ibuki, Y., Wake, N., Mogi, A., Shitara, Y., Hagiwara, K., and Takenoshita, S. (1999). Mutation analysis of the Smad3 gene in human ovarian cancers. *Int J Oncol* 15, 949-953.
- Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., and Trapani, J.A. (2006a). Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* 84, 72-78.
- Waterhouse, N.J., Sutton, V.R., Sedelies, K.A., Ciccone, A., Jenkins, M., Turner, S.J., Bird, P.I., and Trapani, J.A. (2006b). Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *J Cell Biol* 173, 133-144.
- Wei, X.H., and Orr, H.T. (1990). Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 29, 131-142.
- Weller, M., and Fontana, A. (1995). The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 21, 128-151.
- Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Brown, D.A., Liu, T., Bauskin, A.R., Ward, R.L., Hawkins, N.J., Quinn, D.I., Russell, P.J., Sutherland, R.L., Breit, S.N., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr., and Hampton, G.M. (2003). Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3410-3415.
- Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Kern, S.G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr., and Hampton, G.M. (2001). Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 61, 5974-5978.
- Welt, C.K., Lambert-Messerlian, G., Zheng, W., Crowley, W.F., Jr., and Schneyer, A.L. (1997). Presence of activin, inhibin, and follistatin in epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3720-3727.
- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol* 7, 1334-1342.
- Wen, W.H., Reles, A., Runnebaum, I.B., Sullivan-Halley, J., Bernstein, L., Jones, L.A., Felix, J.C., Kreienberg, R., el-Naggar, A., and Press, M.F. (1999). p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol* 18, 29-41.
- Whiteside, T.L. (2002). Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol* 12, 43-50.

- Wildey, G.M., Patil, S., and Howe, P.H. (2003). Smad3 potentiates transforming growth factor beta (TGFbeta)-induced apoptosis and expression of the BH3-only protein Bim in WEHI 231 B lymphocytes. *J Biol Chem* 278, 18069-18077.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Wilson, L.C., Baek, S.J., Call, A., and Eling, T.E. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 105, 747-753.
- Wischhusen, J., Waschbisch, A., and Wiendl, H. (2007). Immune-refractory cancers and their little helpers--an extended role for immunetolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? *Semin Cancer Biol* 17, 459-468.
- Wisniewski, A., Luszczek, W., Manczak, M., Jasek, M., Kubicka, W., Cislo, M., and Kusnierczyk, P. (2003). Distribution of LILRA3 (ILT6/LIR4) deletion in psoriatic patients and healthy controls. *Hum Immunol* 64, 458-461.
- Witz, I.P. (2008). Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons. *Adv Cancer Res* 100, 203-229.
- Wolf, D., Wolf, A.M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A.G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Marth, C. (2005). The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8326-8331.
- Wollmann, W., Goodman, M.L., Bhat-Nakshatri, P., Kishimoto, H., Goulet, R.J., Jr., Mehrotra, S., Morimiya, A., Badve, S., and Nakshatri, H. (2005). The macrophage inhibitory cytokine integrates AKT/PKB and MAP kinase signaling pathways in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26, 900-907.
- Wong, H.L., Welch, G.R., Brandes, M.E., and Wahl, S.M. (1991). IL-4 antagonizes induction of Fc gamma RIII (CD16) expression by transforming growth factor-beta on human monocytes. *J Immunol* 147, 1843-1848.
- Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61, 4766-4772.
- Woolas, R.P., Xu, F.J., Jacobs, I.J., Yu, Y.H., Daly, L., Berchuck, A., Soper, J.T., Clarke-Pearson, D.L., Oram, D.H., and Bast, R.C., Jr. (1993). Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 1748-1751.
- Wu, S., Rodabaugh, K., Martinez-Maza, O., Watson, J.M., Silberstein, D.S., Boyer, C.M., Peters, W.P., Weinberg, J.B., Berek, J.S., and Bast, R.C., Jr. (1992). Stimulation of ovarian tumor cell proliferation with monocyte products including interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Obstet Gynecol* 166, 997-1007.
- Xie, M.H., Aggarwal, S., Ho, W.H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W.I., Goddard, A.D., and Gurney, A.L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 275, 31335-31339.
- Xu, D., and Qu, C.K. (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* 13, 4925-4932.
- Xu, G., Zhong, Y., Munir, S., Yang, B.B., Tsang, B.K., and Peng, C. (2004). Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in human epithelial ovarian cancer cells via activin receptor-like kinase 7. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5523-5534.

- Xu, G., Zhou, H., Wang, Q., Auersperg, N., and Peng, C. (2006a). Activin receptor-like kinase 7 induces apoptosis through up-regulation of Bax and down-regulation of Xiap in normal and malignant ovarian epithelial cell lines. *Mol Cancer Res* 4, 235-246.
- Xu, J., Kimball, T.R., Lorenz, J.N., Brown, D.A., Bauskin, A.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Breit, S.N., and Molkentin, J.D. (2006b). GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res* 98, 342-350.
- Yamada, S.D., Baldwin, R.L., and Karlan, B.Y. (1999). Ovarian carcinoma cell cultures are resistant to TGF-beta1-mediated growth inhibition despite expression of functional receptors. *Gynecol Oncol* 75, 72-77.
- Yamashita, T., Yoneta, A., and Hida, T. (2009). Macrophage inhibitory cytokine-1: a new player in melanoma development. *J Invest Dermatol* 129, 262-264.
- Yan, Q., Malashkevich, V.N., Fedorov, A., Fedorov, E., Cao, E., Lary, J.W., Cole, J.L., Nathenson, S.G., and Almo, S.C. (2007). Structure of CD84 provides insight into SLAM family function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10583-10588.
- Yang, H., Filipovic, Z., Brown, D., Breit, S.N., and Vassilev, L.T. (2003). Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther* 2, 1023-1029.
- Yee, C., and Greenberg, P. (2002). Modulating T-cell immunity to tumors: new strategies for monitoring T-cell responses. *Nat Rev Cancer* 2, 409-419.
- Yin, W., Cheepala, S., Roberts, J.N., Syson-Chan, K., DiGiovanni, J., and Clifford, J.L. (2006). Active Stat3 is required for survival of human squamous cell carcinoma cells in serum-free conditions. *Mol Cancer* 5, 15.
- Yokomuro, S., Tsuji, H., Lunz, J.G., 3rd, Sakamoto, T., Ezure, T., Murase, N., and Demetris, A.J. (2000). Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor beta1, and activin A: comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells. *Hepatology* 32, 26-35.
- Yu, P., and Fu, Y.X. (2006). Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 86, 231-245.
- Yu, P., Spiotto, M.T., Lee, Y., Schreiber, H., and Fu, Y.X. (2003). Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med* 197, 985-995.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188, 2375-2380.
- Zhang, C., Zhang, J., Wei, H., and Tian, Z. (2005). Imbalance of NKG2D and its inhibitory counterparts: how does tumor escape from innate immunity? *Int Immunopharmacol* 5, 1099-1111.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., Rubin, S.C., and Coukos, G. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-213.
- Zhang, L., Yang, X., Pan, H.Y., Zhou, X.J., Li, J., Chen, W.T., Zhong, L.P., and Zhang, Z.Y. (2009). Expression of growth differentiation factor 15 is positively correlated with histopathological malignant grade and in vitro cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 45, 627-632.
- Zhang, S., Zhang, H.S., Cordon-Cardo, C., Ragupathi, G., and Livingston, P.O. (1998). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: protein antigens. *Clin Cancer Res* 4, 2669-2676.

Zhang, X., Vallabhaneni, R., Loughran, P.A., Shapiro, R., Yin, X.M., Yuan, Y., and Billiar, T.R. (2008). Changes in FADD levels, distribution, and phosphorylation in TNF α -induced apoptosis in hepatocytes is caspase-3, caspase-8 and BID dependent. *Apoptosis* 13, 983-992.

Zhao, G.Q., Deng, K., Labosky, P.A., Liaw, L., and Hogan, B.L. (1996). The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev* 10, 1657-1669.

Zhao, G.Q., Liaw, L., and Hogan, B.L. (1998). Bone morphogenetic protein 8A plays a role in the maintenance of spermatogenesis and the integrity of the epididymis. *Development* 125, 1103-1112.

Zheng, W., Luo, M.P., Welt, C., Lambert-Messerlian, G., Sung, C.J., Zhang, Z., Ying, S.Y., Schneyer, A.L., Lauchlan, S.C., and Felix, J.C. (1998). Imbalanced expression of inhibin and activin subunits in primary epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 69, 23-31.

Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., and Ouyang, W. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14, 282-289.

Ziesche, E., Bachmann, M., Kleinert, H., Pfeilschifter, J., and Muhl, H. (2007). The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 282, 16006-16015.

Zimmers, T.A., Gutierrez, J.C., and Koniaris, L.G. (2007). NAG-1/GDF-15: no evidence for an inhibitory role in colon cancer? *Gastroenterology* 132, 1204-1205; author reply 1205.

Zimmers, T.A., Jin, X., Hsiao, E.C., McGrath, S.A., Esquela, A.F., and Koniaris, L.G. (2005). Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock* 23, 543-548.

Zimmers, T.A., Jin, X., Hsiao, E.C., Perez, E.A., Pierce, R.H., Chavin, K.D., and Koniaris, L.G. (2006). Growth differentiation factor-15: induction in liver injury through p53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms. *J Surg Res* 130, 45-51.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5, 263-274.

5.2.2 Sonstige Quellen

Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th edition. Elsevier Saunders. 2005

Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*. 5. Auflage Spektrum Verlag.

Weber, C. (2005). Bedeutung des Her2/neu beim Ovarialkarzinom - Korrelation und Vergleich mit klinischen Prognosefaktoren. Dissertation.

<http://www.cancer.gov>

<http://www.cancersafe.com/cancersafe/cancers/img/over.jpg>

[http://a248.e.akamai.net/7/248/430/20080327144034/www.mercksource.com/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/images/ovarium\(1\).jpg](http://a248.e.akamai.net/7/248/430/20080327144034/www.mercksource.com/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/images/ovarium(1).jpg)

[http://a248.e.akamai.net/7/248/430/20080327144034/www.mercksource.com/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/images/ovarium\(1\).jpg](http://a248.e.akamai.net/7/248/430/20080327144034/www.mercksource.com/ppdocs/us/common/dorlands/dorland/images/ovarium(1).jpg)

www.invitrogen.com

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

<http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT>

<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1644807a.pdf>

5.3 Plasmidkarten

5.3.1 pCDNA3.1-GDF-15

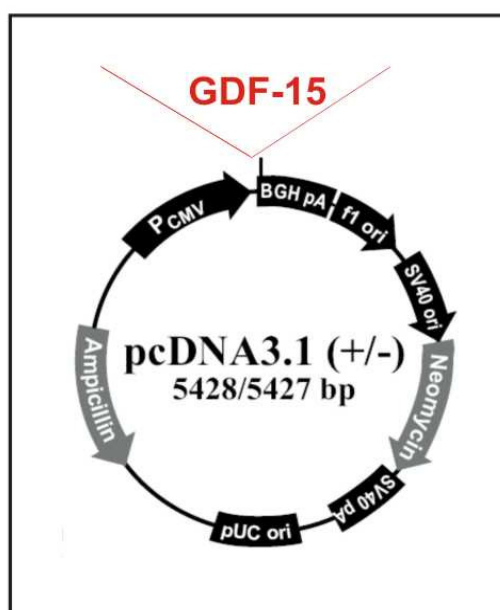


Abb. 97: pCDNA3.1-GDF-15. Die Sequenz von GDF-15 ist direkt nach dem Cytomegalie Virus (CMV)-Promotor in die „multiple cloning site“ des Vektors pCDNA3.1 (Invitrogen) eingefügt. Die prokaryotische Resistenz wird durch Ampicillin, die eukaryotische Resistenz durch Neomycin vermittelt. Im Folgenden wurde dieser Vektor als pCDNA3.1-GDF-15 bezeichnet.

5.3.2 pIRESeGFP-GDF-15

Im Vektor pIRES2-EGFP (Clontech) wurde in die „multiple cloning site“ (MCS) die codierende Sequenz für GDF-15 eingefügt. Nach der vom Encephalomyocarditis Virus (ECMV) abgeleiteten „internal ribosomal entry site“ (IRES)-Sequenz folgt das „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP). Beide Gensequenzen werden als eine bicistronische mRNA abgelesen, wobei die IRES-Sequenz dazu führt, dass bei ca. 10% der Transkripte nach vollständiger ribosomaler Synthese von GDF-15 die Translation erneut initiiert wird, sodass zusätzlich eGFP gebildet wird. GDF-15 und eGFP werden somit als jeweils eigenständige Proteine exprimiert. Zudem stellt die limitierte Effizienz des zweiten Translationsstarts sicher, dass nur Zellen, die eine gute GDF-15-Expression aufweisen, ein deutliches grünes Fluoreszenzsignal liefern.

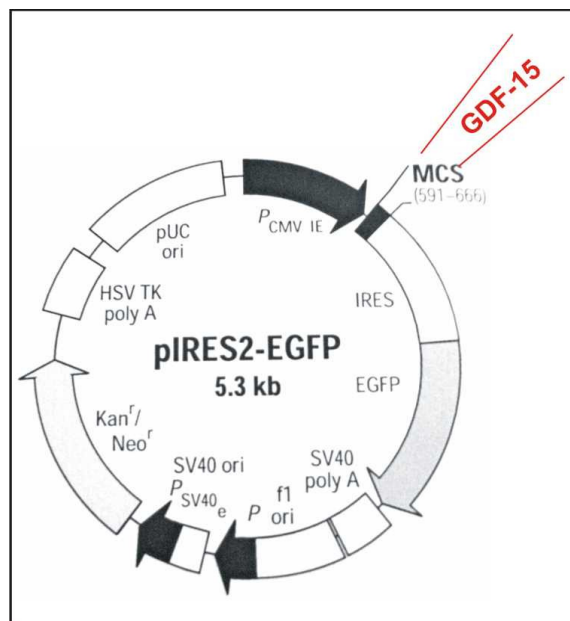


Abb. 98: pIRESeGFP-GDF-15. In die „multiple cloning site“, die am CMV Promotor anschließt, wurde die codierende Sequenz für GDF-15 in den Vektor pIRES2-EGFP (Clontech) eingefügt. Im Folgenden wurde dieser Vektor als pIRES-eGFP-GDF-15 bezeichnet.

5.3.3 pSUPERpuro-GDF-15

Der shRNA-Vektor pSUPERpuro-GDF-15 wurde in mehreren Klonierungsschritten aus dem Vektor pSUPER (R. Agami), der Puromycin-Resistenzkassette aus pBABEpuro (Dr. Wischhusen) und der GDF-15 codierenden Sequenz nach Brummelkamp et al. hergestellt (Dr. Wischhusen).

5.4 „Pathway Analyse“

Im Folgenden ist die GEPAT „Pathway-Analyse“ mit den Signalwegen, an denen die meisten deregulierten Enzyme und Proteine beteiligt waren aufgeführt. Die vollständige „Pathway Analyse“ und weitere Grafiken der beteiligten Signalwege sind unter <http://gepat.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/GEPAT> einzusehen.

5.4.1 NK-Zellen nach 24 h TGF- β 1-Behandlung

Tab. 56: „Pathway Analyse“ NK-Zellen TGF- β 1 (24 h).

Pathway	Enzyme (Anzahl)
Purine metabolism	37
Pyrimidine metabolism	31
MAPK Signaling	30
Glycosphingolipid BS-neo-lactoseries	29
Metabolism of xenobiotics by cyt p450	29
Glycosphingolipid BS-ganglioseries	21
Cytokine-cytokine-receptor interaction	21
Cell cycle	20
Heparan sulfate BS	18
WNT signaling	16
Valine, leucine, isoleucine degradation	15
Arachidonic acid metabolism	15
Apoptosis	15
Neuroactive ligand receptor interaction	14
Glycine, serine, threonine metabolism	12
Tryptophan metabolism	12
Limonene u pinen degradation	12
N-glycan BS	11
Glycerophospholipid BS	11
Glycosphingolipid BS-globoseries	11
Cell adhesion molecules	11
Insulin signaling pathway	11
Arginine and proline metabolism	10
Ubiquinone BS	9
Lysine degradation	9
Benzoate degradation via CoA ligation	9
JAK-STAT signaling	9
Glycerolipid metabolism	8
One carbon pool by folate	8
Ca signaling	8

Axon guidance	8
Focal adhesion	8
Adherens junction	8
TLR signaling	8
TCR signaling	8
Regula of actin skeleton	7
O-Glycan BS	7
GPI anchor BS	7
Butanoate- metabolism	7
Folate BS	7
Alkaloid BS II	7
Tight Junction	7
Fructose and mannose metabolism	6
Fatty acid metabolism	6
Inositol phosphate metabolism	6
Propanoate metabolism	6
.....	
Adipocytokine signaling	5
WNT signaling	4
TGF b signaling	4
NK cell mediated cytotoxicity	4

5.4.2 CD8⁺-T-Zellen nach 24 h TGF-β1-Behandlung

Tab. 57: „*Pathway Analyse*“ CD8⁺-T-Zellen TGF-β1 (24 h).

Pathway	Enzyme (Anzahl)
Glycosphingolipid BS-ganglioseries	15
MAPK signaling	11
Cytokine-cytokine-receptor interaction	11
Apoptosis	9
Purine metabolism	6
Adherens junction	5
Glycolysis	5
Limonene u pinen degradation	5
Cell adhesion molecules	5
JAK-STAT signaling	5
TCR signaling	5
Diterpenoid BS	4
Insulin Signaling	4
Glycerine, serine, threonine metabolism	3
Arginie proline metabolism	3

Tryptophan metabolism	3
Glycosphingolipid BS-neo-lactoseries	3
Atrazine degradation	3
BCR signaling	3

5.4.3 NK-Zellen nach 6 h GDF-15-Behandlung

Tab. 58: „*Pathway Analyse*“ NK-Zellen GDF-15 (6 h)

Pathway	Enzyme (Anzahl)
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	13
Arachidonic acid metabolism	10
Calcium signaling pathway	3
Fatty acid metabolism	2
Linoleic acid metabolism	2
Purine metabolism	1
gamma-Hexachlorocyclohexane degradation	1
Tryptophan metabolism	1
Wnt signaling pathway	1
Cell adhesion molecules (CAMs)	1
Complement and coagulation cascades	1
Insulin signaling pathway	1
Adipocytokine signaling pathway	1

5.4.4 NK-Zellen nach 24 h GDF-15-Behandlung

Tab. 59: „*Pathway Analyse*“ NK-Zellen GDF-15 (24 h).

Pathway	Enzyme (Anzahl)
Oxidative phosphorylation	22
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglioseries	17
Glycosphingolipid biosynthesis - neo-lactoseries	14
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	14
Heparan sulfate biosynthesis	13
Arachidonic acid metabolism	13
Apoptosis	12
MAPK signaling pathway	11
Androgen and estrogen metabolism	10
MAPK signaling pathway	10

Adherens junction	7
Fructose and mannose metabolism	6
Glycosphingolipid biosynthesis - lactoseries	6
T cell receptor signaling pathway	6
Insulin signaling pathway	6
Lysine degradation	5
Porphyrin and chlorophyll metabolism	5
Cell adhesion molecules (CAMs)	5
Parkinson's disease	5
Glycolysis / Gluconeogenesis	4
Purine metabolism	4
Valine, leucine and isoleucine degradation	4
Chondroitin sulfate biosynthesis	4
Benzoate degradation via CoA ligation	4
B cell receptor signaling pathway	4
Huntington's disease	4
Pentose phosphate pathway	3
Galactose metabolism	3
Bile acid biosynthesis	3
Aminosugars metabolism	3
Lipopolysaccharide biosynthesis	3
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	3
Linoleic acid metabolism	3
Pantothenate and CoA biosynthesis	3
Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	3
Calcium signaling pathway	3
Wnt signaling pathway	3
Notch signaling pathway	3
TGF-beta signaling pathway	3
Focal adhesion	3
Jak-STAT signaling pathway	3
Alzheimer's disease	3
Inositol metabolism	2
Pyrimidine metabolism	2
Glycine, serine and threonine metabolism	2
Histidine metabolism	2
gamma-Hexachlorocyclohexane degradation	2
Tryptophan metabolism	2
Starch and sucrose metabolism	2
Nucleotide sugars metabolism	2
Glycerolipid metabolism	2
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	2
Glycosphingolipid biosynthesis - globoseries	2
Butanoate metabolism	2
Carbon fixation	2

Alkaloid biosynthesis II	2
Biosynthesis of type II polyketide backbone	2
Toll-like receptor signaling pathway	2
Pentose and glucuronate interconversions	1
Ascorbate and aldarate metabolism	1
Fatty acid metabolism	1
Urea cycle and metabolism of amino groups	1
Cysteine metabolism	1
Arginine and proline metabolism	1
Tyrosine metabolism	1
Phenylalanine metabolism	1
Bisphenol A degradation	1
beta-Alanine metabolism	1
N-Glycan biosynthesis	1
O-Glycan biosynthesis	1
Streptomycin biosynthesis	1
Inositol phosphate metabolism	1
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	1
Glycerophospholipid metabolism	1
Ether lipid metabolism	1
1- and 2-Methylnaphthalene degradation	1
Tetrachloroethene degradation	1
Ethylbenzene degradation	1
Folate biosynthesis	1
Limonene and pinene degradation	1
Sulfur metabolism	1
Biosynthesis of type II polyketide products	1
Neuroactive ligand-receptor interaction	1
Cell cycle	1
Axon guidance	1
Tight junction	1
Complement and coagulation cascades	1
Regulation of actin cytoskeleton	1
Adipocytokine signaling pathway	1

5.5 Veröffentlichungen

5.5.1 Publikationen

Dombrowski Y, Ossadnik M, Dietl J and Wischhusen J. Effect of tumor derived GDF-15 on Natural Killer Cells in Ovarian Cancer. *In preparation*.

Patrick Roth, Markus Junker, Isabel Tritschler, Michel Mittelbronn, **Yvonne Dombrowski**, Samuel N. Breit, Ghazaleh Tabatabai, Wolfgang Wick, Michael Weller, Jörg Wischhusen (2010). GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clinical Cancer Research. epub*

Reim, F. *, **Dombrowski, Y.***, Ritter, C., Buttman, M., Hausler, S., Ossadnik, M., Krockenberger, M., Beier, D., Beier, C.P., Dietl, J., Becker, J.C., Honig, A., and Wischhusen, J. (2009). Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44high/CD24low/HER2low breast cancer stem cells. *Cancer Res* 69, 8058-8066.

***These authors contributed equally.**

Krockenberger, M., Engel, J.B., Kolb, J., **Dombrowski, Y.**, Hausler, S.F., Kohrenhagen, N., Dietl, J., Wischhusen, J., and Honig, A. (2009). Macrophage migration inhibitory factor expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*.

Engel, J.B., Honig, A., Schonhals, T., Weidler, C., Hausler, S., Krockenberger, M., Grunewald, T.G., **Dombrowski, Y.**, Rieger, L., Dietl, J., and Wischhusen, J. (2008). Perifosine inhibits growth of human experimental endometrial cancers by blockade of AKT phosphorylation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 141, 64-69.

Krockenberger, M., **Dombrowski, Y.**, Weidler, C., Ossadnik, M., Honig, A., Hausler, S., Voigt, H., Becker, J.C., Leng, L., Steinle, A., Weller, M., Bucala, R., Dietl, J., and Wischhusen, J. (2008). Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D. *J Immunol* 180, 7338-7348.

Schreiner, B., Voss, J., Wischhusen, J., **Dombrowski, Y.**, Steinle, A., Lochmuller, H., Dalakas, M., Melms, A., and Wiendl, H. (2006). Expression of toll-like receptors by human muscle cells in vitro and in vivo: TLR3 is highly expressed in inflammatory and HIV myopathies, mediates IL-8 release and up-regulation of NKG2D-ligands. *FASEB J* 20, 118-120.

5.5.2 Präsentationen

Florian Reim, **Yvonne Dombrowski**, Johannes Dietl, and Jörg Wischhusen. Selective survival of breast cancer stem cells under immunoselection with trastuzumab and NK cells. 2. Internationales EFIS/EJI NK Zell Symposium, Freiburg, 2009. *Posterpräsentation*

Florian Reim, **Yvonne Dombrowski**, Johannes Dietl, and Jörg Wischhusen. Selective survival of breast cancer stem cells under immunoselection with trastuzumab and NK cells. 7. Cancer Immunotherapy Symposium CIMT, Mainz, 2009 *Posterpräsentation*

Yvonne Dombrowski, Monika Ossadnik, Johannes Dietl and Jörg Wischhusen: Effect of tumor-derived GDF-15 on Natural Killer cells in Ovarian Cancer. 2nd Jointed Retreat, Immunology Training Network Würzburg-Erlangen-Tübingen, Wildbad, Rothenburg o.d.T, 2008. *Vortrag*

Anoop Chandran P., **Yvonne Dombrowski**, Lasse Weinmann, Yiayun Zhu, Gunter Meister and Jörg Wischhusen: Role of microRNAs in TGF- β signalling in CD8⁺ T cells. 2nd Jointed Retreat, Immunology Training Network Würzburg-Erlangen-Tübingen, Wildbad, Rothenburg o.d.T, 2008. *Posterpräsentation*

Krockenberger M, **Dombrowski Y**, Wischhusen J: Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): expression and immune-inhibitory function in ovarian cancer. Internationales EFIS/EJI NK Zell Symposium, Bad Herrenalb, 2008. *Posterpräsentation*

Krockenberger M, **Dombrowski Y**, Weidler C, Dietl J, Wischhusen J: Macrophage migration inhibitory factor MIF: Expression and immune-inhibitory function in ovarian cancer. „Cancer Immunotherapy Symposium: CIMT meets Strategies for Immune Therapy“, Würzburg. *Posterpräsentation*

Y. Dombrowski, M. Ossadnik, C. Weidler and J. Wischhusen: How does Ovarian Cancer escape from NKG2D-mediated anti-tumor immunity? 1st Jointed Retreat, Immunology Training Network Würzburg-Erlangen-Tübingen, Kloster Banz, 2007. *Posterpräsentation*

Mathias Krockenberger, **Yvonne Dombrowski**, Claudia Weidler, Monika Ossadnik, Jörg Wischhusen: Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): expression and immune-inhibitory function in ovarian cancer. 6. Überregionaler ACRC Workshop Regenerative Medizin/Extrazelluläre Matrix, Abtei Rolduc, Kerkrade, 2007. *Posterpräsentation*

5.6 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Jörg Wischhusen für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit. Die fortwährende Diskussionsbereitschaft und das Interesse am Fortgang der Arbeit trugen wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit bei.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Dietl für die Möglichkeit bedanken, in seiner Klinik und mit seiner Unterstützung diese Arbeit durchführen zu können, sowie für das stete Interesse am Fortschreiten der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Benz möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken, für seine stete Unterstützung und das große Interesse an der Arbeit.

Bei Frau PD Dr. Ulrike Kämmerer und ihrer Forschungsgruppe möchte ich mich für die freundliche Unterstützung während der gesamten Zeit in der Frauenklinik bedanken. Danke auch an alle Ärzte der Frauenklinik, die die Patientenakquirierung übernommen haben.

Bei Herrn Stefan Saremba und Prof. Dr. T. Müller aus dem Institut für Botanik möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des rekombinanten GDF-15-Proteins bedanken. Bei Prof. J. Schultz aus dem Institut für Bioinformatik möchte ich mich für die Unterstützung bei der Microarray-Analyse bedanken. Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Hünig, Kirsty McPherson und allen Mitgliedern des GK Immunmodulation für eine schöne Zeit und interessante Diskussionen danken. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Wischhusen für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz besonders wichtiges Dankeschön geht an Frau Monika Ossadnik, die durch ihre stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Diskussionen, sowohl im Labor als auch privat, wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat. Danke auch an Kerstin und alle anderen, hier namentlich nicht erwähnten Freunde und Bekannten, die mich durch ihre Unterstützung immer motiviert haben.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Mann Rafael bedanken, der mich fortwährend und in allen Belangen uneingeschränkt unterstützt hat. Ohne ihn, sowie die Unterstützung durch Freunde und Familie, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

DANKE!