

# **Die Rolle des Tumornekrosefaktor (TNF) – Rezeptor 2 bei der antitumoralen Wirkung von TNF**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
Jeannette Gerspach  
aus Bad Säckingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier  
Mitberichter: PD Dr. Matthias Grell  
Tag der mündlichen Prüfung: 5. April 2002

Institut für Zellbiologie und Immunologie  
Universität Stuttgart

2002



Berichte aus der Biologie

**Jeannette Gerspach**

**Die Rolle des Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor 2  
bei der antitumoralen Wirkung von TNF**

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag  
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

*Gerspach, Jeannette:*

Die Rolle des Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor 2 bei der antitumoralen Wirkung von TNF / Jeannette Gerspach.

Aachen : Shaker, 2002

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-8322-1000-8

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-1000-8

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

*Meinen Eltern  
und Stefan*



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b> .....	13
<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	15
<b><u>SUMMARY</u></b> .....	17
<b><u>1 EINLEITUNG</u></b> .....	19
<b>1.1 Tumorentstehung</b> .....	19
1.1.1 Tumorangiogenese.....	20
<b>1.2 Tumormmunität</b> .....	21
1.2.1 Die Abwehr durch das natürliche Immunsystem.....	22
1.2.2 Die Abwehr durch das adaptive Immunsystem.....	23
<b>1.3 Tumortherapien</b> .....	24
<b>1.4 Das historisch erste antitumoral wirksame Zytokin: der Tumornekrosefaktor</b> .....	26
1.4.1 TNF – ein pleiotropes Zytokin.....	26
1.4.2 TNF und Tumornekrose.....	27
a) Verstärkte Anreicherung im Tumor.....	28
b) TNF-Mutanten mit geringerer Toxizität und/oder höherer antitumoraler Wirkung.....	29
c) TNF in Kombination mit Reagenzien, die seine Toxizität herabsetzen bzw. seine antitumorale Wirkung verstärken.....	29
1.4.3 Entwicklung der Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit.....	31
<b><u>2 MATERIAL UND METHODEN</u></b> .....	33
<b>2.1 Material</b> .....	33
2.1.1 Chemikalien.....	33

<b>2.1.2 Reagenzien.....</b>	33
<b>2.1.3 Enzyme.....</b>	34
<b>2.1.4 Antikörper.....</b>	34
<b>2.1.5 Oligonukleotide.....</b>	34
<b>2.1.6 Plasmide.....</b>	35
<b>2.1.7 DNA- und Protein-Marker.....</b>	35
<b>2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen.....</b>	35
<b>2.1.9 Zellkultur-Medien und -Zusätze.....</b>	35
<b>2.1.10 Zelllinien.....</b>	36
<b>2.1.11 Tiere.....</b>	36
<b>2.2 Methoden.....</b>	38
<b>2.2.1 Gelelektrophorese.....</b>	38
a) DNA.....	38
b) Protein.....	39
<b>2.2.2 Isolierung von DNA.....</b>	39
a) Extraktion genomischer DNA aus Schwanzbiopsien.....	39
b) Plasmidpräparation mit Ionenaustauschersäulen.....	40
c) Isolierung eines ca. 70 kb großen DNA-Fragmentes aus dem Agarosegel.....	41
d) Ethanolpräzipitation von DNA.....	41
<b>2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976).....</b>	42
<b>2.2.4 Biotinylierung von 80M2.....</b>	42
<b>2.2.5 Herstellung von Gewebe-Lysaten.....</b>	43
<b>2.2.6 Immunpräzipitation des huTNF-R2.....</b>	43
<b>2.2.7 Western Blot zur Detektion des huTNF-R2.....</b>	44
<b>2.2.8 Extraktion von Gesamt-RNA aus Gewebe.....</b>	44
<b>2.2.9 RNase Protection Assay, RPA.....</b>	45
<b>2.2.10 Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA.....</b>	47
a) IFN $\gamma$ -Konzentration in Überständen von Milzzellen.....	47
b) HuTNF-R2-Konzentration im Plasma.....	47

<b>2.2.11 Zellkultur.....</b>	48
a) Auftauen von Zellen.....	48
b) Ernte adhärenter Zellen.....	48
c) Einfrieren von Zellen.....	48
d) Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen.....	48
<b>2.2.12 Präparation und Kultivierung von Milzzellen und Thymozyten.....</b>	49
<b>2.2.13 Bioassays.....</b>	49
a) TNF-vermittelte Zytotoxizität.....	49
b) Fas-vermittelte Zytotoxizität auf RLZ Zellen.....	50
c) Zytotoxische Effektorfunktionen von Milzzellen.....	50
d) Thymozyten-Proliferation.....	51
<b>2.2.14 Durchflußzytometrie.....</b>	51
<b>2.2.15 Tierexperimente.....</b>	52
<b>2.2.15.1 Genotypisierung von transgenen Tieren mittels Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction, PCR</i>) .....</b>	52
a) huTNF-R2.....	52
b) Tie2-tmTNF.....	54
<b>2.2.15.2 Experimente im Tumormodell der Maus.....</b>	54
a) Subkutane Tumoren und Tumorbehandlung.....	54
b) i. v. Injektion.....	55
c) Lungenmetastasenmodell.....	56
<b>2.2.15.3 Gefrierschnitte und X-Gal-Färbung.....</b>	56
<b>2.2.15.4 Perfusion.....</b>	57
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	59
<b>3.1 Etablierung von Tumormodellen in huTNF-R2 transgenen Tieren.....</b>	59
<b>3.1.1 huTNF-R2 transgene Ratten.....</b>	59
<b>3.1.1.1 Aufreinigung eines ca. 70 kb großen, den huTNF-R2 codierenden, genomischen DNA-Fragments.....</b>	59

<b>3.1.1.2 Generierung der huTNF-R2 transgenen Ratten.....</b>	59
<b>3.1.1.3 Charakterisierung der Linie BN.TgN(TNFR2)Brl(+/-).....</b>	60
a) Genotypisierung.....	60
b) Expression von huTNF-R2 spezifischer mRNA.....	60
c) Proteinexpression des huTNF-R2.....	61
d) Löslicher huTNF-R2 im Plasma.....	62
e) Expression des huTNF-R2 nach Stimulation.....	63
<b>3.1.2 huTNF-R2 transgene Mäuse.....</b>	65
a) Tumorwachstum.....	65
b) Nachweis der Expression des huTNF-R2 im Tumor.....	66
<b>3.2 Tumortherapie.....</b>	68
<b>3.2.1 Kombination von huTNF mit einem huTNF-R2 spezifischen Antikörper.....</b>	68
3.2.1.1 Die Wirkung von MR2-1 <i>in vitro</i> .....	68
3.2.1.2 Die Wirkung von MR2-1 <i>in vivo</i> .....	68
a) Gleichzeitige Applikation von huTNF und MR2-1.....	69
b) Vorstimulation mit MR2-1.....	70
<b>3.2.2 Überprüfung der <i>in vivo</i> Wirksamkeit eines Antikörper-huTNF<math>\alpha</math> Fusionsproteins.....</b>	72
3.2.2.1 Die Wirkung von FuP <i>in vitro</i> .....	72
3.2.2.2 Die Wirkung von FuP <i>in vivo</i> .....	74
a) FuP-Behandlung i. p. .....	74
b) FuP-Behandlung i. v. .....	75
<b>3.3 Untersuchung des Metastasenwachstums in Lungen huTNF-R2 transgener Mäuse.....</b>	79
<b>3.3.1 Vergleich des Metastasenwachstums in transgenen und nicht transgenen Tieren.....</b>	79
3.3.1.1 TgE1335 Tiere.....	79
3.3.1.2 TgE1334 Tiere.....	80
3.3.1.3 Tie2-tmTNF transgene Tiere.....	81

<b>3.3.2 Frühe Absiedlung der Tumorzellen in huTNF-R2 transgenen Tieren.....</b>	81
<b>3.3.3 Konstitutiver Abwehrstatus der huTNF-R2 transgenen Tiere.....</b>	82
<b>3.3.4 IFN<math>\gamma</math>-Produktion von Milzzellen.....</b>	83
a) IFN $\gamma$ -Produktion unbehandelter Tiere.....	83
b) IFN $\gamma$ -Produktion nach der Injektion von RLZ Zellen.....	84
<b>3.3.5 Die Rolle des Fas/FasL-Systems bei der Abwehr von RLZ-Metastasen in huTNF-R2 transgenen Mäusen.....</b>	85
<b>3.3.5.1 Fas-Expression auf RLZ Zellen.....</b>	85
a) Fas-Hochregulation auf RLZ Zellen nach Inkubation mit TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ .....	85
b) Fas-vermittelte Zytotoxizität nach Inkubation mit TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ .....	86
<b>3.3.5.2 Fas-vermittelte Zytotoxizität von Milzzellen huTNF-R2 transgener Tiere.....</b>	86
<b>3.3.6 Vergrößerte Milzen von TgE1335 Tieren als Hinweis für eine gesteigerte Immunaktivität.....</b>	89
<b>4 DISKUSSION.....</b>	91
<b>4.1 Etablierung von Tumormodellen in huTNF-R2 transgenen Tieren.....</b>	91
<b>4.1.1 Versuche zur Herstellung huTNF-R2 transgener Ratten.....</b>	91
<b>4.1.2 Tumormodell in huTNF-R2 transgenen Mäusen.....</b>	92
<b>4.2 Therapeutische Versuche.....</b>	93
<b>4.2.1 Tumorbehandlung mit huTNF und MR2-1, einem huTNF-R2 spezifischen Antikörper.....</b>	93
<b>4.2.2 In vivo Wirksamkeit des Antikörper-huTNF-Fusionsproteins rMAb425-huTNF<math>\alpha</math> (EMD87971, FuP).....</b>	95
<b>4.2.3 Mit den obigen Befunden zusammenhängende wissenschaftliche Erkenntnisse und Ausblicke.....</b>	96
<b>4.3 Die Rolle des TNF-R2 bei der Abwehr von Tumoren in einem Lungenmetastasenmodell.....</b>	99

---

<b>4.3.1 Potentielle Mechanismen der TNF-R2 vermittelten Tumorabwehr: die Rolle von Membran-TNF und die frühe Metastasenabwehr.....</b>	99
<b>4.3.2 Molekulare Mechanismen der TNF-R2 induzierten Resistenz: Veränderungen im Genexpressionsprofil.....</b>	101
<b>4.3.3 Fas-FasL abhängige Eliminierung von RLZ Zellen durch huTNF-R2 transgene Effektorzellen.....</b>	103
<b><u>5 LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	109

## ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung	IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ak	Antikörper	Ig	Immunglobulin
AP	Alkalische Phosphatase	IL	Interleukin
APS	Ammoniumpersulfat	ILP	<i>Isolated Limb Perfusion</i>
APZ	Antigen präsentierende Zelle	IP	Immunpräzipitation
AS	Aminosäure	IP-10	IFN $\gamma$ -induzierbares Protein 10
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz	i. p.	intraperitoneal
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>	IP TG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
bp	Basenpaar(e)	i. v.	intravenös
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	IZI	Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart
ConA	Concanavalin A	kb	Kilobasen
CTL	<i>Cytotoxic T-Lymphocytes</i>	kDa	Kilodalton
DEPC	Diethylpyrocarbamat	KV	Kristallviolett
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser	LacZ	Gen der $\beta$ -Galaktosidase
DMF	N,N-Dimehtylformamid	LDH	Lactat-Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid	LPS	Lipopolysaccharid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M	Molar
dNTP	Desoxyribonukleotide	mAk	monoklonaler Antikörper
DTT	Dithiothreitol	2-ME	2-Mercaptoethanol
DZ	Dendritische Zelle	memTNF	Membran-TNF
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure	MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	MIC	MHC class I Chain-related
EM	Extrazelluläre Matrix	Mig	Monokin induziert durch IFN $\gamma$
EMAPII	<i>Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II</i>	M-ILP	ILP mit Melphalan
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay</i>	min	Minute
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>	ml	Milliliter
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>	$\mu$ l	Mikroliter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	MMP	Matrix-Metalloproteinase
FLICE	FADD-Like ICE (Caspase-8)	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
FLIP	<i>FLICE Inhibitory Protein</i>	mu	murin
g	Gramm	NBT	Nitrotetrazoliumblauchlorid
G	Gauge (Einheit für Kanülen)	NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase	nm	Nanometer
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	NO	Stickstoffmonoxid
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>	NOS	NO-Synthase
h	Stunde	OD	Optische Dichte
HIF	<i>Hypoxia Inducible Transcription Factor</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
hu	human	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>	PVP	Polyvinylpyrrolidon
		RLZ	Renca Zellen, lacZ transfiziert
		RNA	Ribonukleinsäure
		RPA	<i>RNase Protection Assay</i>

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung ( <i>Standard Deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler vom Mittelwert ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TF	Gewebsthromboplastin ( <i>Tissue Factor</i> )
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
Th1/2	Helper T-Zellen vom Typ 1/2
TM-ILP	ILP mit TNF und Melphalan
tmTNF	Transmembran-TNF
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl-Aminomethan)
U	<i>Units</i>
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	Wildtyp

## **ZUSAMMENFASSUNG**

Seit seiner Entdeckung als antitumorales Agens ist es trotz intensiver Forschung bisher nicht gelungen TNF zur konventionellen Tumorbehandlung einzusetzen. Nur bei einer speziellen Therapieform, der *isolated limb perfusion* (ILP), kann TNF heute erfolgreich zur Behandlung von Weichteilsarkomen und Melanomen der Extremitäten angewandt werden. Die tumornekrotische Wirkung von löslichem TNF ist in vielen Tumormodellen bereits eingehend untersucht worden. Da lösliches TNF aber nur den TNF-R1, nicht aber den TNF-R2 effektiv stimulieren kann, ist die Rolle des TNF-R2 hierbei unklar. Einige Daten deuten allerdings daraufhin, dass eine adäquate Aktivierung des TNF-R2 zu einer deutlichen Verstärkung der Tumornekrose führen könnte. Die Überprüfung huTNF-R2 spezifischer Reagenzien auf ihre antitumorale Wirksamkeit ist allerdings aufgrund der Speziespezifität, humanes TNF bindet nur an den murinen TNF-R1 und nicht an den murinen TNF-R2, in konventionellen Tumormodellen nicht möglich. Daher sollten huTNF-R2 transgene Tiere im ILP-Modell der Ratte sowie im Tumormodell der Maus eingesetzt werden. Dieser Ansatz bot als weiteren Vorteil die Möglichkeit, die Beteiligung beider TNF-Rezeptoren bei der TNF-vermittelten Tumornekrose zu untersuchen.

Ein Ziel dieser Arbeit stellte somit die Generierung huTNF-R2 transgener Ratten dar. Die Charakterisierung der Nachkommen eines transgenen *Founder*-Tieres, das auf die klassische Art via Mikroinjektion eines ca. 70 kb großen genomischen DNA-Fragmentes entstanden war, ergab, dass die Expression des huTNF-R2 zu gering und/oder nicht funktionell war. Aus diesem Grund wurden diese Tiere nicht für weitere Studien eingesetzt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde zunächst ein subkutanes Tumormodell in huTNF-R2 transgenen Mäusen der Linie TgE1335 etabliert. In diesem wurden zwei Therapieansätze mit unterschiedlichen Reagenzien überprüft. Die kombinierte Applikation eines huTNF-R2-spezifischen, agonistischen Antikörpers (MR2-1) mit löslichem huTNF, die zur Stimulation beider Rezeptoren führen sollte, zeigte keine Wirkung auf das Tumorzachstum. Allerdings wurde später festgestellt, dass nur Antikörperaggregate agonistische Eigenschaften aufwiesen, sodass von einer veränderten Pharmakokinetik ausgegangen werden musste, die sich vermutlich negativ auf das Ergebnis dieses Therapieansatzes auswirkte. Ein TNF-Fusionsprotein, das sich aus huTNF und einem human spezifischen Antikörper zusammensetzte, besaß *in vitro* im Vergleich zu löslichem TNF sowohl auf dem TNF-R1 wie auch auf dem TNF-R2 eine stärkere Aktivität. Die Bindung an das Antigen war hierfür nicht essentiell. *In vivo* wies dieses TNF-Derivat nach einer i. v. wie auch einer i. p. Applikation eine deutlich stärkere antitumorale Wirkung als lösliches huTNF auf. Diese war durch die Induktion von starken hämorrhagischen Nekrosen charakterisiert,

welche nach einer Behandlung mit huTNF kaum beobachtet wurden. Die verstärkte antitumorale Wirkung war eindeutig der Beteiligung des TNF-R2 zuzuschreiben, da nur transgene Tiere diese charakteristischen Merkmale aufwiesen. Beide therapeutischen Ansätze führten allerdings auch zu einer TNF-R2-vermittelten Verstärkung der systemischen Nebenwirkungen, sodass sich aufgrund dieser Befunde die Entwicklung von Reagenzien zur zielgerichteten, effektiven Aktivierung beider Rezeptoren im Tumor, speziell im Tumorendothel, als notwendig erweist.

Ein weiterer Befund dieser Arbeit wurde bei der Etablierung eines Lungenmetastasenmodells in huTNF-R2 transgenen Mäusen der Linie TgE1335 gemacht. Diese Tiere entwickelten innerhalb von ca. 3 Wochen keine bzw. kaum induzierte Lungenmetastasen, wohingegen Lungen von Wildtyp-Tieren ein massives Tumorzachstum aufwiesen. Bereits 4 Tage nach einer Tumorzell-injektion waren in diesen Tieren signifikant weniger Lungenmetastasen nachweisbar. Sowohl FasL als auch IFN $\gamma$  könnten maßgeblich an diesem Effekt beteiligt sein. FasL mRNA war sowohl in der Milz als auch in der Lunge von transgenen Tieren hochreguliert. Milzzellen dieser Tiere zeigten *in vitro* stärkere zytotoxische Aktivität auf Fas-positiven Zellen. Ebenso produzierten transgene Milzzellen deutlich mehr IFN $\gamma$  als Milzzellen nicht transgener Tiere. Weiterhin deutet eine erhöhte mRNA-Expression von IL-10 und IL-12 darauf hin, dass diese Zytokine ebenfalls bei der Verhinderung der Metastasierung beteiligt sind. Somit konnte eine Beteiligung des TNF-R2 bei der Tumorabwehr aufgezeigt werden, die, wie es scheint, mit der Induktion von zytotoxischen Effektormechanismen sowie immunregulatorischen und antiangiogenen Funktionen zusammenhängt.

**SUMMARY:**

Since the discovery of TNF as a potent antitumor agent much effort has been done to establish a clinical application of TNF where toxic side effects are missing or at least tolerable. However, this has so far been of limited success. Only in rare cases, where a specialized treatment protocol can be applied, the so called isolated limb perfusion (ILP), TNF can be used in combination with melphalan via a separated circulation of the tumor bearing limb. In this setting, systemic side effects of TNF are circumvented and treatment of melanoma and soft tissue sarcoma is very successful. Extensive research has been done with soluble TNF, a good activator of TNF-R1, but a poor agonist of TNF-R2 and so the role TNF-R2 plays in TNF-mediated tumor necrosis is still not clear. There are some hints that an effective activation of both receptors could lead to increased tumor necrosis *in vivo*. In order to test reagents aiming at application in man and for investigation of the involvement of both receptors in TNF mediated tumor necrosis, tumor models in huTNF-R2 transgenic animals had to be established. Transgenic mice already existed whereas transgenic rats, which were planned to be used in the animal model of ILP, had to be generated. The analysis of offsprings of one transgenic founder which originated via micro-injection of a genomic DNA fragment of about 70 kb resulted in very low transgene expression. In addition, due to missing sequences of exon 9 detected by PCR analysis, huTNF-R2 expression was thought to be functionally defect.

In order to establish a tumor model in huTNF-R2 transgenic TgE1335 mice, four different cell lineages were tested for subcutaneous growth in these animals. All of them grew comparably in transgenic and non transgenic mice but only tumors originating from NCTC cells formed progressive tumor mass. In this tumor model two different strategies for therapy were tested. After application of a huTNF-R2 specific agonistic antibody (MR2-1) combined with huTNF, which should result in effective activation of both TNF receptors, tumor growth did not differ from that of control treated mice. This was independently of route of application (i. v. or i. p.) and co- or prestimulation. Retrospective characterization of MR2-1 showed that agonistic properties *in vitro* were dependent on formation of aggregates, whereas divalent antibodies lacked this activity. Therefore ineffectiveness in this treatment protocol obviously resided in the intrinsic features of the antibody chosen than to the concept of therapy itself. As soon as new powerful agonistic huTNF-R2 specific antibodies are available repeating this strategy of treatment would be of interest.

A TNF fusion protein, consisting of a human antibody and TNF $\alpha$ , displayed superior activity on both TNF receptors compared to soluble TNF *in vitro*. These properties were independent of antigen binding via the antibody moiety which was confirmed by competition experiments and use of antigen negative

cells. In tumor therapy this fusion protein showed significantly better antitumor activity than soluble TNF either after i. p. or i. v. application. As this outcome was evident only in huTNF-R2 transgenic mice and not in equally treated non transgenic mice, huTNF-R2 was clearly essential for the enhanced antitumor effect. The i. p. injection of this reagent was somewhat more effective than application via the tail vein, since only i. p. treatment induced complete regression. In addition this way of application led to weaker systemic toxicity, preventing lethal outcome. Overall, treatment with this TNF fusion protein clearly showed that stimulation of both receptors can lead to significantly stronger induction of tumor necrosis than activating mainly TNF-R1. But, as toxic side effects were obvious with both reagents tested, development of new therapeutic approaches for targeted activation of both TNF receptors in tumor area is necessary.

During establishment of another transplantable tumor model it turned out that huTNF-R2 transgenic mice expressing 4-5-fold higher levels of transgene than endogenous TNF-R2 were able to suppress lung metastases whereas wildtype mice developed extensive tumor mass. This has been verified in two distinct transplantable tumor models. Even 4 days after tumor cell injection, differences in the number of growing metastases were obvious. Investigation of possible mechanisms pointed out that FasL and IFN $\gamma$  could be good candidates mediating this effect. FasL mRNA was found to be upregulated about 2-fold in transgenic spleen and lung. In addition spleen cells of these mice displayed more potent cytotoxic activity towards Renca cells, which were stimulated for Fas expression by incubation with TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ . Furthermore huTNF-R2 transgenic cells, activated with ConA or plated on  $\gamma$ -irradiated Renca cells, produced higher IFN $\gamma$  levels in culture medium than nontransgenic spleen cells. Another cytokine being strongly upregulated was IL-10. In transgenic lung mRNA expression was about 4-fold higher and mRNA levels of spleen increased up to 8-fold compared to nontransgenic animals. IL-10 which is known to be a potent antiinflammatory and immunesuppressive cytokine, has also been shown to have antiangiogenic activity. Finally, expression levels of both subunits of IL-12 were upregulated in transgenic lung. By inducing proliferation, cytotoxic activity and IFN $\gamma$  production of T and NK cells IL-12 might also play a role in resistance to lung metastases. These results demonstrate a possible involvement of TNF-R2 in defense mechanisms against cancer such as cytotoxic effector, immunregulatory and antiangiogenic functions.