

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen
und T-Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell

Christoph D. Brenner

aus

Mutlangen

2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. med. R. Mocikat am Institut für Molekulare Immunologie im Helmholtz-Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt – betreut und von Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 26. November 2009

(Christoph D. Brenner)

Dissertation eingereicht am: 26. November 2009
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. R. Mocikat
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar
Mündliche Prüfung am: 14. Januar 2010

Das Höchste, wozu der Mensch gelangen kann, ist das Erstaunen.

Johann Wolfgang von Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	V
ABKÜRZUNGEN	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1. PAMP und PRR	1
1.1.2. NK-Zellen	2
1.2. Das adaptive Immunsystem	4
1.3. Tumورimmunologie	5
1.3.1. Immunüberwachung und Immun-Editing	6
1.3.2. Gefahrenmodell	7
1.3.3. Tumor-Evasion	8
1.4. B-Zell-Lymphome	8
1.4.1. Das Burkitt-Lymphom und <i>c-myc</i>	8
1.4.2. Spontantumormodell	10
1.5. Aufgabenstellung	11
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. Materialien	12
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	12
2.1.2. Reagenzien/Chemikalien	13
2.1.3. Kits	14
2.1.4. Medien und Puffer	14
2.1.5. Antikörper und Multimer	15
2.1.6. Software	16
2.2. Zellkultur	16
2.2.1. Allgemeines	16
2.2.2. Zellen	17
2.2.3. Kryokonservierung und Rekonstitution eingefrorener Zellen	17
2.2.4. Bestimmung der Lebend-Zellzahl	18

2.2.5.	Versuche zur Ermittlung löslicher NKG2D-Liganden	18
2.2.6.	Generierung von DC	19
2.3.	Mäuse	19
2.4.	Immunologische Methoden	20
2.4.1.	Durchflusszytometrie	20
2.4.2.	Magnetische Zellseparation (MACS)	21
2.4.3.	Zytotoxizität	22
2.4.4.	Bioplex-Methode zur Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen	23
2.4.5.	ELISA	24
2.5.	Molekularbiologische Methoden	24
2.5.1.	RNS-Extraktion	24
2.5.2.	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	24
2.5.3.	Reverse Transkription der RNS in cDNS	24
2.5.4.	RT-PCR	25
3.	ERGEBNISSE	29
3.1.	NK-Zellen	29
3.1.1.	NK-Zellen in Geweben erkrankter Mäuse	29
3.1.2.	NK-Zellen zeigen phänotypische Aktivierungszeichen	30
3.1.3.	Die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen aus Tumormäusen ist beeinträchtigt	32
3.1.4.	Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber YAC-1	34
3.1.5.	Kokultur von NK- und Tumorzellen führt zu verminderter Lyse	35
3.1.6.	TLR-Liganden aktivieren NK-Zellen	38
3.1.7.	Aktivierung von NK-Zellen nach DC-Gabe	39
3.1.8.	Bedeutung von NKG2D-Liganden für die NK-Zell-Aktivierung und die Tumorabstoßung	41
3.1.9.	Einfluss von Bortezomib auf die NKG2D-Ligand-Expression	44
3.2.	T-Zellen	50
3.2.1.	T-Zell-Anteil und Verschiebung von CD4/CD8	50
3.2.2.	T-Zellen phänotypisch aktiviert	51
3.2.3.	T-Zellen und IFN- γ	52
3.2.4.	Regulatorische T-Zellen	53
3.3.	Lösliche Faktoren	55
3.3.1.	Th1/Th2-Zytokine	55
3.3.2.	TGF- β nimmt in Serum und Treg ab	56
3.3.3.	Chemokine	58

4. DISKUSSION	59
4.1. Analyse der NK-Zellen im Spontan-Tumormodell	59
4.2. Bedeutung regulatorischer und anderer T-Zellen sowie löslicher Faktoren	65
4.3. Ausblick	69
5. LITERATURVERZEICHNIS	71
6. ANHANG	81
6.1. Veröffentlichungen	81
6.2. Danksagung	83
6.3. Lebenslauf	84

Zusammenfassung

Mit der insbesondere in der westlichen Welt zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung nimmt auch die Inzidenz vieler Tumorerkrankungen zu. Auch die Inzidenz von Non-Hodgkin-Lymphomen nimmt zu und ist vor allem im fortgeschrittenen Lebensalter sehr hoch. Trotz vieler Fortschritte in der Therapie von Lymphomerkrankungen und eines Anstiegs der 5-Jahres-Überlebensraten auf inzwischen fast 70 % ist noch immer keine zufriedenstellende Therapie für alle Patienten möglich. Zur Entwicklung von daher benötigten neuen Behandlungskonzepten könnte ein besseres Verständnis der Tumorgenese und der Reaktion des Immunsystems auf sich entwickelnde Tumoren beitragen. Bisherige experimentelle Ansätze zur Erforschung der Tumorummunologie greifen aber oft auf Tiermodelle mit transplantierbaren Tumoren zurück und sind nicht in der Lage, die Interaktion zwischen Immunsystem und sich langsam entwickelndem Tumor adäquat wiederzugeben. Daher wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von Teilen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in einem Spontan-Tumormodell untersucht, welches eine realitätsnähere Untersuchung dieser Zusammenhänge erlaubt. Die verwendeten Mäuse tragen das Protoonkogen *c-myc* unter einem B-Zell-spezifischen Verstärkerelement und entwickeln ab einem Alter von ungefähr 12 - 16 Wochen autochthon B-Zell-Lymphome, die mit dem Burkitt-Lymphom des Menschen vergleichbar sind. Zu den Eigenschaften der sich entwickelnden Tumoren gehört, dass die Lymphomzellen „fehlendes Selbst“, also eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, aufweisen und im Tumorverlauf hohe Expressionsraten von Liganden für NKG2D zeigen.

Ein Schwerpunkt der durchgeführten Untersuchungen lag auf den NK-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl der NK-Zellen in tumorösen Lymphknoten stark zunimmt. Auch war eine Aktivierung von NK-Zellen festzustellen, die mit der Abnahme von MHC-I auf den Tumorzellen korrelierte. Trotz einer phänotypisch stark ausgeprägten Aktivierung und veränderter Expression verschiedener aktivierender und inhibierender Oberflächenrezeptoren waren die NK-Zellen aus dem Spontan-Tumormodell nicht mehr in der Lage, ihre Effektorfunktionen auszuüben. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass NK-Zellen aus erkrankten Tieren sowohl ein Defizit in der Produktion und Freisetzung von IFN- γ haben, als auch nicht mehr in der Lage waren, ihre lytische Aktivität gegenüber Tumorzellen zu entfalten.

Während NK-Zellen aus Mäusen ohne klinisch manifesten Tumor zwar auch schon in ihrer lytischen Aktivität beeinträchtigt waren, konnten sie im Gegensatz zu NK-Zellen aus tumortragenden Tieren durch Inkubation mit CpG-Oligonukleotiden *in vitro* aber wieder reaktiviert werden. Auch *in vivo* konnte die Tumorprogression durch CpG-ODN verzögert werden, und es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen für diesen Effekt verantwortlich sind. Des Weiteren konnte die Abhängigkeit der Tumorabstoßung durch NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen demonstriert werden. Auch dieser Mechanismus war NK-Zell-abhängig. Eine Möglichkeit, die Expression von NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen zu beeinflussen, ist die Behandlung mit dem Wirkstoff Bortezomib.

Inkubation von Tumorzellen mit Bortezomib konnte *in vitro* die Expression von NKG2D-Liganden und die Lyseraten von Tumorzellen durch NK-Zellen erhöhen. Die Behandlung mit Bortezomib *in vivo* führte zu einem verlängerten tumorfreien Überleben.

Aufbauend auf vorhandenen Befunden aus der Arbeitsgruppe konnte durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse die Notwendigkeit von zwei Signalen für die Aktivierung von NK-Zellen gezeigt werden. Demnach benötigen NK-Zellen neben einem ersten „priming“-Schritt, der durch vermindertes MHC-I auf Tumorzellen vermittelt werden kann, einen zweiten „triggering“-Schritt, wie er durch die NKG2D-Ligand-Rezeptor-Interaktion zustande kommen kann.

Die Untersuchung der T-Zellen im Spontan-Tumormodell ergab eine Zunahme der Anzahl von T-Zellen in den Lymphknoten, jedoch nicht in den Milzen erkrankter Tiere. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren waren T-Zellen aus den Lymphknoten tumortragender Mäuse in der Lage, wesentlich größere Mengen IFN- γ zu bilden. In den Milzen erkrankter Tiere war die Fähigkeit zur IFN- γ -Produktion dagegen eingeschränkt.

Der Anteil und die Anzahl regulatorischer T-Zellen waren in tumortragenden Tieren durchweg erhöht. Da regulatorische T-Zellen ihre suppressive Funktion unter anderem über TGF- β ausüben, wurden hierzu Konzentrationsmessungen im Serum und intrazelluläre Färbungen in den regulatorischen T-Zellen durchgeführt. Entgegen der Erwartung war aber in beiden Fällen weniger TGF- β zu finden als in Wildtyp-Mäusen. Eine Depletion der regulatorischen T-Zell-Population bei jungen transgenen Tieren führte zu einem signifikant erhöhten tumorfreien Überleben.

Messungen des Zytokinprofils sowie der Chemokine im Serum der Mäuse lieferten Hinweise auf eine Anlockung der Lymphozyten durch die Chemokine CXCL9 und CXCL10.

Insgesamt zeigt die Arbeit, dass die NK-Zellen im verwendeten Tumormodell trotz Aktivierung bei fortgeschrittener Tumorlast anerg geworden sind. Für die Kontrolle von Lymphomen durch NK-Zellen konnten „fehlendes Selbst“ und erhöhte NKG2D-Ligand-Expression auf dem Tumor als Voraussetzung festgestellt werden. Trotz der in den Lymphknoten erkrankter Tiere erhöhten Anzahl an T-Zellen, die zu hoher IFN- γ -Produktion befähigt waren, sind diese T-Zellen nicht in der Lage, die Tumorprogression zu stoppen. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion regulatorischer T-Zellen ebenso wie die Behandlung mit CpG-ODN oder Bortezomib zu einer Verlängerung des tumorfreien Überlebens führte. Diese Therapieansätze könnten, einzeln oder in Kombination, als neue Behandlungsansätze genutzt werden.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
Bzm	Bortezomib
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNS	Komplementäre (<i>complementary</i>) DNS
Ci	Curie (als Einheit für die Aktivität) 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq (Becquerel)
CpG-ODN	CpG-Oligonukleotide
d	Tag(e) (<i>day(s)</i>)
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E/T	Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (<i>effector to target ratio</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum (FCS)
Foxp3	<i>Forkhead Box p3</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde(n) (<i>hour(s)</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
VIII	

ABKÜRZUNGEN

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharide
m	milli
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
Min.	Minute(n)
mRNA	messenger RNS
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2, Mitglied D
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte (bei Absorptionmessungen)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbolmyristataacetat
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
s.c.	subcutan
Sek.	Sekunde(n)
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>Transforming Growth Factor</i>)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
U	Einheit (<i>unit</i>)

1. Einleitung

Zum Schutz vor eindringenden Mikroorganismen haben die höher entwickelten Lebewesen im Laufe der Evolution die Abwehrmechanismen des Immunsystems entwickelt. Das Immunsystem mit seinem gesamten Komplex aus Zellen und löslichen Faktoren lässt sich in zwei große Untergruppen unterteilen. Die erste Untergruppe, die auch entwicklungsgeschichtlich älter ist, ist das sogenannte angeborene Immunsystem. Der zweite Arm ist das adaptive Immunsystem, das weitere anpassungsfähige Abwehrmechanismen ermöglicht [Abbas *et al.* 2005; Murphy *et al.* 2008; Vollmar *et al.* 2005].

1.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist verantwortlich für die erste Abwehr von Gefahren für den Organismus und arbeitet dabei Antigen-unabhängig [Medzhitov *et al.* 1997]. Auch die mechanischen Barrieren des Körpers, die Haut und Schleimhaut, der saure pH-Wert des Magens und die Zilien des Respirationstraktes sind Bestandteil der ersten Verteidigung gegen Pathogene. Ferner zählt auch das Komplementsystem zum angeborenen Immunsystem, das auf zellulärer Ebene noch durch Monozyten, Granulozyten, Neutrophile, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und NK-Zellen bereichert wird.

1.1.1. PAMP und PRR

Verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren ein Repertoire von Mustererkennungsmolekülen, sogenannte *Pattern-recognition-Rezeptoren* (PRR) [Medzhitov 2009]. Als Liganden für die Mustererkennungsrezeptoren fungiert eine Reihe von Musterstrukturen, die als PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) bezeichnet werden. Da sich diese Strukturen nicht auf körpereigenen Zellen, sondern nur auf Mikroorganismen befinden, kann der Körper dadurch „Selbst“ von „Fremd“ unterscheiden.

Insbesondere die antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems, also Makrophagen, Monozyten und DC, können über die Interaktion von PAMP und PRR stimuliert werden. Die PRR sind Rezeptoren, welche die Immunzellen befähigen, evolutionär konservierte molekulare Strukturen von Krankheitserregern zu erkennen. Dadurch werden erste Schritte der Abwehr wie die Phagozytose eingeleitet oder auch die

Ausschüttung regulatorischer Zytokine initiiert, was dann wiederum dazu beiträgt, die Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren.

Die PRR können in lösliche und membranständige Rezeptoren unterteilt werden. Zur Gruppe der löslichen PRR gehören z. B. das Mannose-bindende Lektin (MBL), das zur Auslösung der Komplementkaskade führt. Von den membranständigen PRR sind neben C-Typ-Lektin-Rezeptoren und verschiedenen Scavenger-Rezeptoren insbesondere die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) von Bedeutung [Akira *et al.* 2001]. *Toll*-Rezeptoren sind evolutionär konservierte Membranproteine, die im Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung bei *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden und dabei auch ihren Namen erhalten haben. Später fand man heraus, dass diese bei der Abwehr von Infektionen der Fruchtfliege von Bedeutung sind. Die daraufhin identifizierten verwandten Gensequenzen beim Menschen wurden dann als *Toll*-ähnlich bezeichnet. Derzeit sind beim Menschen 11 verschiedene und in der Maus 13 verschiedene TLR bekannt. Die Liganden der TLR sind vielfältig. Überwiegend handelt es sich dabei um Strukturen aus Viren und Bakterien, aber auch von Hefen. Eine Gruppe der TLR erkennt z.B. einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäuren, deren Muster sich je nach Herkunft von Viren oder Bakterien deutlich von Nukleinsäuren der höheren Lebewesen unterscheidet. Zum Beispiel erkennt der TLR9 unmethylierte CpG-Motive doppelsträngiger DNS, die für Bakterien charakteristisch sind [Bird 1980; Dalpke *et al.* 2002].

1.1.2. NK-Zellen

NK-Zellen stellen eine einzigartige Gruppe von Lymphozyten dar.

Im Vergleich zu den meisten anderen Zellen des Immunsystems wurden sie ursprünglich erst relativ spät in der Mitte der 1970er Jahre als eigene Zellpopulation erkannt und charakterisiert [Herberman *et al.* 1975; Kiessling *et al.* 1975].

Zu den Aufgaben der NK-Zellen gehört die Lyse von virusinfizierten Zellen. Darüber hinaus können sie aber auch Tumorzellen lysieren. Effektorfunktionen der NK-Zellen sind die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ , sowie die direkte Zytotoxizität.

Auf der Oberfläche von NK-Zellen findet sich eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren, die darüber entscheiden, ob eine Zelle von NK-Zellen lysiert wird. Dabei existiert ein komplexes Netzwerk von aktivierenden und inhibierenden Signalen.

Inhibierende Signale werden durch die Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den

mit NK-Zellen interagierenden Zellen vermittelt. Die Klasse-I MHC-Moleküle fungieren dabei als Unterscheidungsmerkmal zwischen Eigen und Fremd.

Wie die Theorie des fehlenden Selbst (*missing self*) [Kärre *et al.* 1986; Ljunggren *et al.* 1990] vorhersagt, führt ein Verlust von diesen Oberflächenmarkern auf malignen Zellen zu einer Aktivitätssteigerung von NK-Zellen.

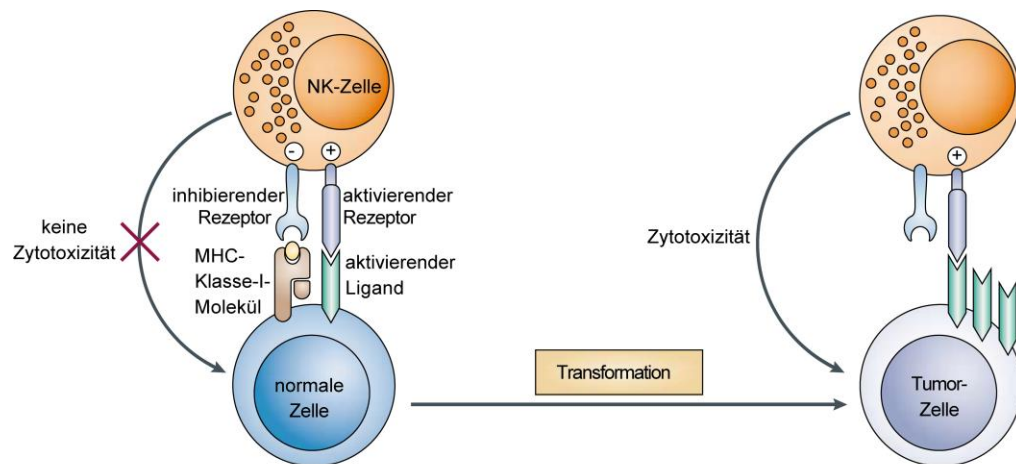


Abb. 1.1 “Missing-self”-Erkennung von Tumorzellen. Verlust von inhibierenden Signalen auf entarteten Zellen führt zu einer Aktivierung von NK-Zellen und ist Voraussetzung für die Zytotoxizität der NK-Zellen [modifiziert nach Ljunggren *et al.* 2007].

Zu den inhibierenden Rezeptoren auf murinen NK-Zellen zählen vor allem die Ly49-Rezeptoren, die auf menschlichen NK-Zellen den KIR-Rezeptoren entsprechen, sowie der Heterodimerkomplex CD94/NKG2A.

Zu den aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen gehören bei der Maus Ly49D, Ly49H und der Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptor NKp46. Die Signalkaskade der Rezeptoren wird im Falle der Ly49-Rezeptoren über ITIM/ITAM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition/activation motive*) vermittelt [Colucci *et al.* 2002; Lanier 2005].

Ein weiterer aktivierender Rezeptor, der nicht nur auf NK-Zellen, sondern auch auf CD8⁺-T-Zellen vorkommt, ist NKG2D. Dieser Rezeptor erkennt „Selbst“-Moleküle, wenn diese, z.B. aufgrund von Virusinfektionen oder maligner Transformation vermehrt gebildet werden [Coudert *et al.* 2006].

Bisher ist allerdings nicht eindeutig geklärt, ob die Aktivierung über einen Rezeptor auch zur Aktivierung von NK-Zellen ausreicht oder ob dazu immer mehrere Signale zusammenkommen müssen. Es ist beschrieben, dass NK-Zellen auch Zielzellen mit normaler Expression von MHC-I, die also zu einer Inhibierung von NK-Zellen führen

sollte, lysieren konnten, wenn diese Zielzellen zusätzlich eine sehr starke Expression von NKG2D-Liganden aufwiesen [Cerwenka *et al.* 2001; Diefenbach *et al.* 2001].

Sowohl dieser Befund als auch die Tatsache, dass durch die Blockade von NKG2D mit Antikörpern die Zytotoxizität von NK-Zellen vermindert werden kann, spricht für eine direkt aktivierende Funktion von NKG2D [Jamieson *et al.* 2002].

NKG2D-defiziente Mäuse zeigten deutliche Einschränkungen in der Kontrolle von sich spontan entwickelnden Tumoren [Guerra *et al.* 2008].

Als Liganden für den NKG2D-Rezeptor sind in der Maus die MHC-I-ähnlichen Molekülstrukturen H-60, RAE-1 (*retinoic acid inducible element 1*) und MULT-1 („*murine ULBP-like transcript 1*“ nach dem humanen ULBP = UL16-binding protein) bekannt [Carayannopoulos *et al.* 2002; Cerwenka *et al.* 2000; Diefenbach *et al.* 2000].

1.2. Das adaptive Immunsystem

Das angeborene Immunsystem, das selbst antigenunspezifisch agiert, trägt durch Schaffung einer entsprechenden Zytokinumgebung auch dazu bei, die adaptiven Teile des Immunsystems zu aktivieren. Für dessen Aktivierung ist es nötig, dass Antigene von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ, wie z.B.: Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und DC) präsentiert werden. Erst dadurch können die B- und T-Lymphozyten mit hochspezifischen Antigenrezeptoren klonal entwickelt werden. Reife B-Zellen besitzen Antigenrezeptoren, nämlich Immunglobuline, die auch lösliche Antigene direkt erkennen können. Nach Differenzierung zu Plasmazellen können sie lösliche Antikörper in die Umgebung abgeben und sind dadurch Träger der humoralen Immunantwort [Rajewsky 1996].

Eine weitere Komponente des adaptiven Immunsystems sind die T-Zellen. Über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennen sie, im Gegensatz zu den B-Zellen, prozessierte Antigenfragmente nur, wenn sie ihnen über MHC-Moleküle präsentiert werden [Ada 1994]. Die MHC-I-restringierten zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) führen zellvermittelt zur Lyse von Zielzellen. Im Gegensatz zu den CTL benötigen die T-Helferzellen Antigen-präsentierende Zellen, die ihnen die Antigene über MHC-II präsentieren. Sie bekämpfen Zielzellen nicht direkt sondern indem sie B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen oder Zytokine ausschütten, welche wiederum die Antwort

der CTL verstärken oder zur Einwanderung und Aktivierung weiterer Immunzellen wie Granulozyten oder Makrophagen führen können.

Regulatorische T-Zellen supprimieren Immunantworten. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sowohl CD4- und CD25-positiv sind als auch den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren [Sakaguchi *et al.* 2006]. Man unterscheidet Treg die schon im Thymus Foxp3 exprimieren, von solchen, die erst in der Peripherie induziert werden. Letztere werden als induzierte Treg bezeichnet. Neben ihrer suppressiven Wirkung auf T-Zellen fungieren Treg im Zusammenspiel mit anderen Teilen des Immunsystems auch als Mittler zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. So ist etwa bekannt, dass Treg auch NK-Zellen in ihrer Funktion einschränken können und umgekehrt [Zimmer *et al.* 2008].

1.3. Tumorimmunologie

Global betrachtet führen Krebserkrankungen derzeit neben Herz-Kreislaufkrankungen und Infektionen die Liste der wichtigsten Todesursachen an [Danaei *et al.* 2009]. Die Ursache der Krebsentstehung ist das unkontrollierte Wachstum einzelner entarteter Zellen [Hanahan *et al.* 2000]. Der menschliche Organismus ist dem aber nicht völlig ungeschützt ausgesetzt, wie z. B. spontane Remissionen von Tumoren zeigen, die als erfolgreiche Abwehr durch das Immunsystem gewertet werden können.

Vor 100 Jahren fasste Paul Ehrlich das Wissen seiner Zeit „*Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung*“ und den Einfluss des Immunsystems auf Tumoren zusammen [Ehrlich 1909]. Bereits damals bestand die Vorstellung, dass das Immunsystem Tumorzellen erkennen und der Tumorgenese entgegenwirken kann.

Die moderne Medizin hegt große Hoffnung auf die Therapie von Krebserkrankungen durch immunologische Ansätze. Zwar konnten durch die klassischen Behandlungsmethoden, chirurgische Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie auch Fortschritte erzielt werden, jedoch besteht je nach Art des Tumors immer noch Bedarf an neuen Therapieansätzen. Um eine Tumorerkrankung erfolgreich zu heilen und tatsächlich auch die letzte Tumorzelle aus dem Körper zu beseitigen, setzt man daher auf die Immuntherapie. Auch Kombinationen der klassischen Methoden mit neuen Immuntherapien könnten helfen, dem Ziel einer erfolgreicherer Tumorbehandlung näher zu kommen [Huber *et al.* 2004].

1.3.1. Immunüberwachung und Immun-Editing

Die ursprünglich von Burnet und Thomas Ende der 1950er Jahre aufgestellte Immunüberwachungstheorie geht davon aus, dass das Immunsystem nicht nur körperfremde Krankheitserreger aufspüren und bekämpfen kann, sondern auch entartete Zellen als fremd erkennt und abstößt [Burnet 1957]. Dies impliziert die Annahme, dass Tumoren Strukturen exprimieren, die sie von körpereigenen Zellen unterscheiden. Dies sind die Tumor-assoziierten Antigene (TAA), die auf einigen Tumoren zu finden sind. Später ist die Theorie der Immunüberwachung wieder in Vergessenheit geraten, da lange Zeit experimentelle Beweise für deren Existenz gefehlt haben. Erst im Laufe der Zeit mehrten sich Berichte, welche die Idee der Immunüberwachung wieder belebten. Schließlich wurde das ursprüngliche Konzept abgewandelt bzw. ergänzt als Immun-Editing neu formuliert [Dunn *et al.* 2004]. Dabei kann man drei Phasen unterscheiden. Die Eliminationsphase entspricht der Idee der Immunüberwachung. Wenn der sich entwickelnde Tumor dadurch eliminiert wird, endet das *Editing* schon hier, ohne in die weiteren Phasen einzutreten (Abb. 1.2 A). Sobald ein Tumor sich aber weiter entwickelt, beginnt eine dynamische Gleichgewichtsphase, in der es aufgrund des Selektionsdrucks des Immunsystems und der genetischen Instabilität des Tumors zu neuen Varianten der nach dem Eliminationsprozess verbleibenden Zellen kommt. Dabei werden viele der neuen Varianten immer noch erkannt und zerstört. Andere Varianten mit neuen Mutationen können aber eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Immunsystem aufweisen (Abb. 1.2 B). Schließlich können in der Evasionsphase überlebende Tumorvarianten, die inzwischen komplett insensitiv gegenüber dem Immunsystem geworden sind, sich unkontrolliert vermehren und letztlich einen klinisch manifesten Tumor bilden (Abb. 1.2 C).

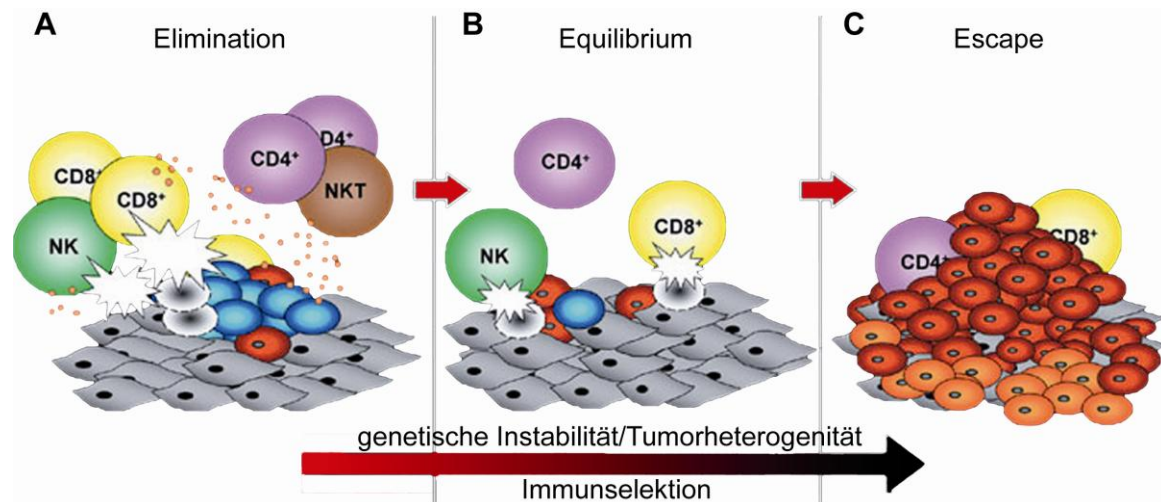


Abb. 1.2 Die drei "E" des Immun-Editing nach Dunn. Das Konzept geht von drei Prozessen aus: (A) Elimination des Tumors. Diese Phase entspricht dem Konzept der Immunüberwachung. (B) Das Gleichgewicht (Equilibrium) repräsentiert die Phase, in der als Folge von Mutationen der Tumorzellen und Selektion der Tumorzellen durch das Immunsystem der Tumor zwar in Schach gehalten wird, aber auf lange Sicht einen Vorteil entfalten kann. Das führt letztendlich zur (C) Evasion (Escape) des Tumors vor der Immunantwort. Der Tumor kann also unkontrolliert im Organismus des sonst immunkompetenten Wirts proliferieren. Die abgebildeten Zellen repräsentieren untransformiertes Gewebe (grau), sich entwickelnde Tumorzellen (blau) und Varianten des Tumors (rot). In (C) sind zusätzlich noch Tumorvarianten (orange) zu sehen, die sich als Folge der Immenselektion in (B) gebildet haben. Die Punkte stehen für sezernierte Zytokine. Lytische Zellen sind durch die gezackten Symbole gekennzeichnet. [modifiziert nach Dunn *et al.* 2004]

1.3.2. Gefahrenmodell

Zusätzlich zur Theorie der Selbst-Fremd-Unterscheidung (Abb. 1.1) existiert außerdem das Konzept der Steuerung von Immunantworten über Gefahrensignale, das im sogenannten „Gefahrenmodell“ (danger-model) [Matzinger 1994; Matzinger 2002] vorgeschlagen wurde. Anders als viele Immunologen gehen Matzinger et al. in ihren Thesen davon aus, dass es für das Immunsystem nicht primär darum geht „Eigen“ von „Fremd“ zu unterscheiden, sondern Gefahren-Signale zu erkennen. Die Zellen, die diese Signale weiterleiten sind die Antigenpräsentierenden Zellen wie z. B. die DC. Diese fungieren als Wächter des Immunsystems, indem sie beim Auftreten von Gefahren-Signalen eine T-Zell-Antwort stimulieren.

1.3.3. Tumor-Evasion

Wie im Abschnitt 1.3.1 und Abb. 1.2 dargelegt, kann es Tumoren gelingen, trotz aktiver Gegenwehr dem Immunsystem zu entkommen. Zu dieser Ignoranz des Immunsystems können unterschiedliche Faktoren beitragen [Weidmann *et al.* 2008]:

- Immunsuppressive Zytokine wie IL-10 oder TGF- β üben inhibitorische Effekte auf antigenspezifische Zellen aus.
- Reduktion oder Verlust der Expression von MHC führt zu mangelhafter Antigen-Präsentation.
- Reduktion oder Verlust tumorspezifischer Antigene führt zu Verlust der antigenspezifischen Antwort.
- Mangelnde Expression kostimulatorischer Moleküle führt zu Anergie der T-Zellen.
- Tumorzellen exprimieren inhibierende Liganden und verursachen so eine Hemmung spezifischer T-Zellen.
- Regulatorische T-Zellen inhibieren die spezifische T-Zell-Antwort.
- Tumorzellen induzieren Apoptose in T-Zellen (*tumor counterattack*).

1.4. B-Zell-Lymphome

Als maligne Lymphome werden die Tumoren zusammengefasst, die von Zellen der lymphatischen Reihe ausgehen. Traditionell unterscheidet man Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), wobei die Non-Hodgkin-Lymphome klinisch oft in indolente Lymphome mit niedriger Malignität und aggressive Lymphome, von hoher Malignität, unterteilt werden [Hiddemann *et al.* 1996]. Nach ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*), dem Klassifikationssystem der Weltgesundheitsorganisation (WHO), existieren noch weitere Einteilungen, auf die hier aber nicht eingegangen werden soll [DIMDI 2009]. Etwa 85% der Non-Hodgkin-Lymphome werden durch maligne B-Zell-Entartungen verursacht, die restlichen durch Entartungen von T- und NK-Zellen.

1.4.1. Das Burkitt-Lymphom und *c-myc*

Das Burkitt-Lymphom wird zu den diffusen Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt. Benannt ist es nach dem britischen Chirurgen Denis Burkitt, der 1958 einen Bericht über afrikanische Kinder mit Unterkieferschwellungen, die er als Lymphome erkannte, veröffentlichte [Burkitt 1958]. Neben dieser endemischen Form in Zentral-Afrika

existieren weltweit eine sporadische Form des Burkitt-Lymphoms, sowie eine HIV-assoziierte Form. Das Burkitt-Lymphom ist sowohl mit dem onkogenen Epstein-Barr-Virus (EBV) als auch mit einer Aktivierung des Protoonkogens *c-myc* assoziiert. Während annähernd alle Fälle in Zentral-Afrika sowie etwa die Hälfte der HIV-assoziierten Fälle eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus zeigen, sind es bei den sporadischen Fällen nur 10-20% [Bornkamm 2009]. Hingegen zeigt sich in allen Fällen ungeachtet des geographischen Ursprungs eine von drei Translokationen des Onkogens *c-myc*. Es kann dabei von Chromosom 8 auf Chromosom 14 (schwere Kette), Chromosom 2 (κ -leichte Kette) oder Chromosom 22 (λ -leichte Kette) transloziert sein. Diese Translokation ist das entscheidende Kriterium für die Klassifizierung als Burkitt-Lymphom [Harris *et al.* 1999].

Ursprünglich entdeckt wurde *c-myc* als Homolog zu dem bei Vögeln bekannten und durch Retroviren eingebrachten transformierenden *v-myc* Gen (von myelocytomatosis virus) [Dalla-Favera *et al.* 1982; Sheiness *et al.* 1979].

Später wurde das evolutionär konservierte, zelluläre Homolog *c-myc* in verschiedenen Zellen gefunden. Vom Protoonkogen *c-myc* ist bekannt, dass es in einer Vielzahl von Tumorarten einen wesentlichen Anteil der Ätiologie ausmacht. Neben der bereits erwähnten Expression im Burkitt-Lymphom findet man eine Überexpression des Proteins c-MYC außerdem sowohl in vielen soliden Tumoren, aber auch in hämatologischen Neoplasien. Unter anderem sind hohe Expressionsraten im Prostatakarzinom, Melanom, Neuroblastom, bei Brustkrebs und vielen weiteren Tumoren zu beobachten [Vita *et al.* 2006].

Das Protein c-MYC ist multifunktional als Transkriptionsfaktor an der Steuerung von Zellzyklus und -wachstum, Differenzierung, Apoptose, Transformation, genomischer Stabilität sowie Angiogenese beteiligt [Lüscher 2001].

Physiologisch wird *c-myc* in ruhenden Zellen nur gering exprimiert. Die Proteinexpression steigt aber stark an, sobald die Zellen in den Zellzyklus eintreten, und sinkt anschließend wieder auf die basalen Werte ab.

So sterben Mäuse, bei denen das *c-myc*-Gen in Embryonalzellen ausgeschaltet wurde, schon sehr früh im Embryonalstadium und zeigen verschiedene Wachstumsanomalien z. B. beim Herzen oder beim Neuralrohr [Davis *et al.* 1993].

Wenn es, wie in den oben genannten Fällen, durch Translokation zu einer Fehlsteuerung der Proteinexpression kommt, führt dies zur unkontrollierten Zellproliferation durch

Änderungen in Apoptosesignalwegen. Die proliferierenden Zellen erleiden leichter zusätzliche Mutationen, die dann ein weiterer Schritt zur Entstehung von Tumoren sind [Vita *et al.* 2006].

1.4.2. Spontantumormodell

Als Modellsystem für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden transgene Mäuse verwendet, die das Gen für das humane Protein c-MYC unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Enhancers $Ig\lambda$ tragen [Kovalchuk *et al.* 2000]. Diese Mäuse spiegeln die klinische Situation in Tumorpatienten sehr gut wider und können als Modell für das Burkitt-Lymphom angesehen werden. Alle Mäuse entwickeln nach ca. 12-16 Wochen Lymphome. Diese Lymphome sind dem Burkitt-Lymphom sowohl durch die typische „Sternenhimmel“-Erscheinung der histologischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung vergleichbar, als auch durch die Charakterisierung der Tumorzellen, die den Phänotyp $IgM^+CD19^+CD5^-CD23^-$ aufweisen [Fujita *et al.* 2004; Kovalchuk *et al.* 2000].

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung bei den Mäusen meist zuerst durch verdickte Lymphknoten. Allgemeine Krankheitszeichen der Tiere sind Verhaltensauffälligkeiten und struppiges Fell. Das makroskopische Bild erkrankter Tiere ist bei der Eröffnung fast immer durch eine Splenomegalie gekennzeichnet.

Herkömmliche Tiermodelle, bei denen Tumoren vorwiegend durch Transplantation ektopisch in den Organismus eingeführt werden, sind nur unzureichend in der Lage, die Situation humaner Tumoren klinisch adäquat abzubilden, da hierbei schon vollständig transformierte Tumorzellen als Bolus appliziert werden.

Im Gegensatz zu diesen Tiermodellen zeigen sich bei Verwendung eines Spontan-Tumormodells viele Vorteile dadurch, dass hier die auch im menschlichen Organismus tatsächlich auftretende klinische Situation besser wiedergegeben wird. Wie bei Patienten entstehen die Lymphome spontan und autochthon aus einzelnen maligne transformierten Zellen. Dabei kommt es sowohl zu einer Anpassung des Immunsystems an den Tumor als auch umgekehrt. Gerade diese gemeinsame Entwicklung ermöglicht eine realitätsnahe Beobachtung von Tumorevasionsstrategien und Reaktionen des Immunsystems auf den Tumor.

Ein in Kauf zu nehmender Nachteil ist dabei, dass der Zeitpunkt der Erstmanifestation des Lymphoms nicht genau vorhergesagt werden kann.

1.5. Aufgabenstellung

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in einem transplantierbaren Tumormodell Zellen mit vermindertem MHC-I als „fehlendes Selbst“ potenten und langanhaltenden Schutz vor Tumoren vermitteln können, und dass dieser Effekt NK-Zell-abhängig war [Mocikat *et al.* 2003]. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen über IFN- γ im Zusammenspiel mit DC, aber unabhängig von T-Helferzellen eine potente CTL-Antwort sowie eine Gedächtnisantwort induzieren konnten [Adam *et al.* 2005]. Diese Befunde beruhen auf Ergebnissen aus Tiermodellen mit transplantierbaren Tumoren. Die Tumoren wurden dabei ektopisch als Bolus appliziert und es ist fraglich, ob diese Modelle daher die immunologische Entwicklung als Reaktion auf die Tumorentstehung in Patienten adäquat abbilden können. In der vorliegenden Dissertationsarbeit sollte daher die Situation in dem unter 1.4.2 beschriebenen Spontan-Tumormodell näher charakterisiert werden, da die sich hier endogen entwickelnden Tumoren auch vermindertes MHC-I aufweisen und geeignet sind, die klinische Situation gut wiederzugeben. Der Fokus der Untersuchungen sollte dabei insbesondere auf den NK-Zellen liegen. Zunächst sollte untersucht werden, ob und, wenn ja, welche Veränderungen in den NK-Zellen im Verlaufe der Tumorprogression im Organismus bei sich spontan entwickelnden Lymphomen vor sich gehen. Dazu sollten die NK-Zellen primär phänotypisch im Krankheitsverlauf beschrieben und anschließend funktional charakterisiert werden. Die Phänotypisierung sollte anhand von Oberflächenfärbungen durchflusszytometrisch durchgeführt werden. Die Funktionsanalyse erforderte hingegen sowohl molekularbiologische Untersuchungen, wie das IFN- γ -Expressionsprofil als auch immunologische Funktionstests gegenüber Tumorzellen.

Weiter sollte eine Analyse der T-Zell-Populationen in den kranken Tieren vorgenommen werden. Dabei sollten auch Daten zu den regulatorischen T-Zellen erhoben werden. Um das Zusammenspiel zwischen angeborenen und adaptiven Immunantworten besser zu verstehen, sollten darüber hinaus lösliche Faktoren wie Zytokine und Chemokine untersucht werden. Erste Ansätze für immunologische Behandlungsansätze im vorliegenden Spontan-Tumormodell sollten den Weg für weitergehende Arbeiten mit neuartigen Therapieansätzen frei machen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät/Material	Hersteller
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: $^{137}\text{Caesium}$)	GammaCell 40, Ottawa, Kanada
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflussscytometer LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Nunc, Langenselbold
Einmalpipetten 5,10 und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmalzählkammer C-Chip	Peqlab, Erlangen
Eisbad	neolab, Heidelberg
FACS-Röhrchen (klein)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Handschuhe AloeCare	Meditrade, Kiefersfelden
Heizblock DRI-Block DB2A	Techne, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Heidelberg
Light-Cycler TM (Gerät, Kapillaren)	Roche, Mannheim
LumaPlate TM -96	Canberra Packard, Dreieich
MACS-Zelltrennsystem (Säulen, Beads)	Miltenyi, Biotec, Bergisch Glattbach
Mehrkanalpipette	Brand, Wertheim
Mehrlochplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
MoFlo TM High Performance cell sorter	Dako, Glostrup, Dänemark
Multistepper-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop Spectrometer	Peqlab, Erlangen
Pipetten	Gilson, Limburg
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 und 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg

Gerät/Material	Hersteller
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Air liquide, Düsseldorf
Szintilationsmessgerät TOPCount	Canberra Packard, Dreieich
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zählkammer Neubauer-Improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellsiebe	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge, biofuge pico	Haereus Instruments, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Haereus Instruments, Hanau

2.1.2. Reagenzien/Chemikalien

Name	Hersteller
1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bortezomib (Formel s. Abb. 2.1)	Biomol, Hamburg
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IL-15	Peptotech, Hamburg
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIZol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe

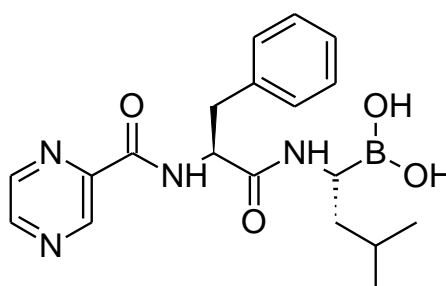


Abb. 2.1 Formel von Bortezomib. IUPAC-Name: [(1*R*)-3-Methyl-1-[[[(2*S*)-3-phenyl-2-[(pyrazin-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl]amino]butyl]boronsäure. Seit 2004 ist Bortezomib unter dem Handelsnamen VelcadeTM in Deutschland zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen. 2007 erfuhr es in den USA eine Erweiterung der Zulassung auf die Behandlung des Mantelzelllymphoms.

CpG-ODN: Die CpG-Oligonukleotide CpG-ODN 1668 wurden von der Firma metabion, Martinsried synthetisiert. Bei den synthetischen Oligonukleotiden war das Rückgrat so modifiziert, dass es komplett aus Phosphorothioaten bestand, da diese etwa um den Faktor 100 resistenter gegen Nukleasen sind als unmodifizierte Oligonukleotide.

Die Sequenz für CpG-ODN 1668 lautete: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3'

2.1.3. Kits

ELISA-Kit:

“TGF- β 1 Elisa Kit“

eBioscience, San Diego, CA, USA

MACS-Kit:

“NK cell Isolation Kit”

“CD4+ T cell Isolation Kit”

“CD8+ T cell Isolation Kit”

alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Luminex-Anwendungen:

Milliplex Cytokin-Kit, Millipore

Bio-Plex™ „Mouse Cytokine Th1/Th2 Assay”

Bioplex Th1/Th2-Pannel, BioRad, München

„First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)”

„LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I”

Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.4. Medien und Puffer

Basismedium:

RPMI 1640 ohne L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)

hitzeinaktiviertes FKS 5 % oder nach jeweiliger Prozentangabe

100 U/ml Penicillin-G-Natrium und 100 μ g/ml Dihydrostreptomycinsulfat

L-Glutamin (2 mM)

Natriumpyruvat (1 mM)

nichtessentielle Aminosäuren

2-Mercaptoethanol (50 µM) (alle Invitrogen, Karlsruhe)

Einfriermedium:

90 % hitzeinaktiviertes FKS (Invitrogen, Karlsruhe)

10 % DMSO

FACS-Puffer:

2 % FKS

EDTA 2mM

NaN₃ 1%

in PBS

Lyse-Puffer (10-fach):

NH₄Cl 8,25 g

K₂HCO₃ 1,00 g

Na-EDTA 37 mg

H₂O ad 100 ml

eingestellt auf pH 7,4

2.1.5. Antikörper und Multimer

2.1.5.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD19	ID3	Ratte IgG2a, κ	BD
CD25	PC61	Ratte IgG1, λ	BioLegend
CD3	17A2	Ratte IgG2b, κ	BD
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a, κ	BD
CD44	IM7	Ratte IgG2b, κ	eBioscience
CD45R	RA3.6B2	Ratte IgG2a, κ	BD
CD49b	DX5	Ratte IgM	BD
CD62L	MEL-14	Ratte IgG2a, κ	BD

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD69	H1.2F3	Hamster IgG1, λ	BD
CD8a	53-2.1	Ratte IgG2a, κ	BD
Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
IFN- γ	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	BioLegend
Ly-49A	A1	Maus IgG2a, κ	BD
Ly-49C,F,H,I	14B11	Hamster IgG1, κ	BD
Ly-49D	4E5	Ratte IgG2a, κ	BD
Ly-49I	YLI-90	Maus IgG1, κ	BD
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	BioLegend

2.1.5.2. NKG2D-Multimer

Die verwendeten NKG2D-Tetramere stellte Dirk H. Busch, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München, dankenswerterweise zur Verfügung [Busch *et al.* 1998]. Die Zellen wurden mit einer 1:100-Verdünnung des PE-konjugierten Tetramers 20 Min. bei 4 °C inkubiert, anschließend gewaschen und dann am LSR-II durchflusszytometrisch analysiert.

2.1.6. Software

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde die Anwendung FlowJo der Firma Treestar Inc., Ashland, OR, USA in Ihrer aktuellen Version – zuletzt 7.5.5 – verwendet.

Abbildungen wurden mit Prism 5, Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA, erstellt. Des Weiteren wurde die Microsoft Office Umgebung, Microsoft Redmond, CA, USA für die Erstellung verwendet.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Allgemeines

Um Kontaminationen der verwendeten Zellen vor allem durch Pilze, Bakterien und Viren zu verhindern, erfolgten die Zellkulturarbeiten aseptisch unter einer Sterilwerkbank. Die Kultur der Zellen wurde in einem Inkubator bei 37 °C, 95 %iger Luftfeuchtigkeit unter einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ durchgeführt.

2.2.2. Zellen

Folgende Zelllinien wurden in Experimenten genutzt:

Name	Beschreibung	Referenz
291	B-Zell-Lymphomlinie aus c-myc Mäusen	im Labor A. Gerbitz generiert
291-S	auf niedriges MHC-I sortierte Variante von 291	im Labor R. Mocikat generiert
A20	murine B-Zell-Lymphomlinie	[Kim <i>et al.</i> 1979]
myc-B	B-Zell-Lymphomlinie aus c-myc Mäusen. Variante mit viel NKG2D-Ligand	im Labor R. Mocikat generiert
myc-E	B-Zell-Lymphomlinie aus c-myc Mäusen. Variante mit wenig NKG2D-Ligand	im Labor R. Mocikat generiert
YAC-1	murine Lymphomzelllinie	[Kiessling <i>et al.</i> 1975]

Die Lymphomzelllinien 291, myc-B und myc-E wurden durch Ausbringen primärer Lymphomzellen aus c-myc-Mäusen auf bestrahlte MRC-5-Fibroblasten, welche als Nährschicht für die Zellen dienten, generiert. Nach etwa 2 Wochen waren die Zellen in der Lage unabhängig von der Nährschicht zu wachsen.

2.2.3. Kryokonservierung und Rekonstitution eingefrorener Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingelagert. Um die Bildung von Eiskristallen und somit die Zerstörung der Zellen zu vermeiden, wurden diese nach Abzentrifugation und Absaugen des Überstandes in gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO fungiert dabei als Frostschutzmittel, indem es sich wie Wasser in den Zellen einlagert und damit eine Eiskristallbildung verhindert. Die so vorbereiteten Zellen wurden in Portionen bis $1 \times 10^7/\text{ml}$ in Kryoröhrchen eingefüllt und zuerst bei -80 °C in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierschale mit relativ langsamer und konstanter Kühlrate eingefroren. Nach Erreichen der Gefrierschranktemperatur wurden die Proben für die Langzeitaufbewahrung in die Stickstofftanks überführt.

Zur Rekonstitution kryokonservierter Zellen muss das in der Einfrierlösung enthaltene DMSO wieder relativ schnell von den Zellen entfernt werden, da dies sonst toxisch auf intakte Zellen wirkt. Zum Auftauen wurde daher warmes Basismedium auf die gefrorenen Zellen pipettiert und unter mehrmaligem Hin- und Herpipettieren, die Zellen relativ zügig in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Darin wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Durch Aufnahme des Zellsediments in geeignetem Medium konnten diese nun weiter kultiviert werden.

2.2.4. Bestimmung der Lebend-Zellzahl

Um die Anzahl der lebenden Zellen zu bestimmen, wurde eine Probe der Zellen mit Trypanblau versetzt. Dabei bleiben intakte Zellen farblos, während geschädigte Zellen den Farbstoff durch die Membran aufnehmen und dann in der Mikroskopie blau erscheinen (Trypan-Exklusions-Methode). Die Zellen wurden mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei werden alle Zellen in den 4 Großquadranten zu je 16 Kleinquadranten gezählt und der Mittelwert pro Großquadrant bestimmt. Da die Zählkammer so geschliffen ist, dass sich genau 1 μl in einem Großquadranten befindet, lässt sich die Zellzahl pro ml durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 und einem eventuellen Verdünnungsfaktor berechnen.

2.2.5. Versuche zur Ermittlung löslicher NKG2D-Liganden

Um möglicherweise vorhandene lösliche NKG2D-Liganden im murinen System nachzuweisen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze erprobt.

Der erste Ansatz bestand darin, NK-Zellen mit Serum von Mäusen für 16 h im Brutschrank zu inkubieren. Im Anschluss wurden die NK-Zellen mit Antikörpern gegen den NKG2D-Rezeptor gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert, um eine mögliche Veränderung in der Expression des NKG2D-Rezeptors zu ermitteln. Analog zu den Versuchen von [Groh *et al.* 2002] mit T-Zellen zur Ermittlung von humanen löslichen NKG2D-Liganden sollten so mittels NK-Zellen mögliche lösliche murine NKG2D-Liganden nachgewiesen werden.

In einem anderen Ansatz wurde die Competition von möglichen löslichen NKG2D-Liganden mit NKG2D-Liganden auf der Oberfläche von A20-Zellen untersucht. Dazu wurden A20-Zellen, welche eine hohe NKG2D-Ligand-Expression auf der Oberfläche

zeigen, mit PE-konjugiertem NKG2D-Tetramer angefärbt. Die Tetramere wurden vorher in Verdünnungsreihen von 1:25 bis 1:1600 mit Serum vorinkubiert.

2.2.6. Generierung von DC

Zur Generierung dendritischer Zellen wurden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen isoliert. Hierfür wurden Femora und Tibiae der Mäuse freipräpariert. Nach Entfernen der Epiphysen war das Knochenmark zugänglich und wurde mit einer dünnen Kanüle mittels Medium aus den Diaphysen herausgespült. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde nach Lyse der enthaltenen Erythrozyten zweimal gewaschen und anschließend in Basismedium mit 20 % FCS auf 6-Loch-Platten ausplattiert. Unter Zugabe von 100 ng/ml GM-CSF und zweitägigem Mediumwechsel bildeten sich so DC, die nach 8 Tagen durch Zugabe von 1 µg/ml LPS für 16 h gereift wurden.

2.3. Mäuse

Sämtliche Versuche mit Tieren wurden im Einklang mit geltenden Tierschutzbestimmungen und unter Genehmigung der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) in den Räumlichkeiten des Tierhauses im Hämatologikum des Helmholtz-Zentrums München durchgeführt. Die Tiere wurden in keimarmer Umgebung unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Wasser und Nahrung standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

C57BL/6-Mäuse wurden von Bommice, Ry, Dänemark erworben. Das transgene *c-myc*-Modell auf Hintergrund von C57BL/6-Mäusen wurde dankenswerterweise von Prof. Georg Bornkamm, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorummunologie, Helmholtz-Zentrum München zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um Mäuse, die unter dem B-Zell-spezifischen Promotor für $Ig\lambda$ das Transgen für humanes *c-MYC* tragen. Diese Mäuse exprimieren in den B-Zellen das Protoonkogen *c-myc*, so dass Tiere ab dem Alter von etwa 12 Wochen spontane B-Zell-Lymphome ausbilden [Kovalchuk *et al.* 2000].

GFP-transgene Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund wurden verwendet, um daraus gewonnene Zellen von anderen Zellen aus normalen C57BL/6-Mäusen unterscheiden zu können. Die GFP-transgenen Tiere tragen die Erbinformation für GFP in der Keimbahn und exprimieren somit GFP in all ihren Zellen. Durch die grüne Fluoreszenz ist es also

z.B. im FACS möglich, die aus diesen Tieren gewonnen Zellen einfach von anderen Zellen zu trennen.

2.4. Immunologische Methoden

2.4.1. Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie erlaubt es, in Flüssigkeit suspendierte Partikel, insbesondere Zellen, nach bestimmten Eigenschaften zu analysieren. Durch die so genannte hydrodynamische Fokussierung passieren die Teilchen einzeln einen Detektor, wo sie durch einen Laserstrahl angestrahlt werden. Dabei streuen die Partikel das einfallende Laserlicht und lassen sich durch ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreuung charakterisieren. Die Partikelgröße kann dabei anhand der Vorwärtsstreuung (forward scatter FSC) und die Granularität der Zellen anhand der Seitwärtsstreuung (side scatter SSC) ermittelt werden. Sind die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern markiert, lassen sich durch Einstrahlung von Laserlicht bestimmter Wellenlänge die Fluorophore anregen. Durch optische Filter gelangen die emittierten Strahlen in verschiedene Detektoren, wo sie durch Photomultiplikatorröhren verstärkt und dann elektronisch gemessen werden.

Alle Messungen in dieser Arbeit wurden an einem Durchflusszytometer LSR-II der Firma BD durchgeführt, das mit vier verschiedenen Lasern ausgestattet war und theoretisch bis zu 15 verschiedene Messparameter simultan erfassen kann.

Für die Oberflächenfärbung von Antigenen auf Zellen wurden $0,5-2 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 100 μl FACS-Puffer mit monoklonalen Antikörpern, deren optimale Konzentration zuvor in Vorversuchen bestimmt wurde, über 20-30 Min. bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt und die Zellen in 300 μl FACS-Puffer aufgenommen. Je nach Fragestellung wurde zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen direkt vor der Messung noch Propidiumjodid ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) im Verhältnis 1:100 zugegeben. Die positiv geladenen Propidium-Ionen gelangen bei intakten Zellen nicht durch die Membran und erlauben so eine Unterscheidung zu toten Zellen, die den Farbstoff aufnehmen.

Soweit vorhanden, wurden bei den Versuchen Negativkontrollen in Form von Isotypkontrollen, d.h. Antikörpern der gleichen Spezies und desselben Isotyps, mitgeführt.

Die Anfärbung intrazellulärer Antigene erfolgte nach vorausgehender Oberflächenfärbung und einem Fixierungsschritt mittels Fixierungspuffer, der Paraformaldehyd enthält. Eine Inkubation mit Saponin enthaltendem Permeabilisationspuffer machte die Zellmembranen durchlässig und ermöglichte die Anfärbung intrazellulärer Strukturen mit Antikörpern.

Die zur Färbung verwendeten monoklonalen Antikörper sind in der Liste unter 2.1.5.1 „Antikörper für die Durchflusszytometrie“ aufgeführt.

2.4.2. Magnetische Zellseparation (MACS)

Um hoch angereicherte Populationen von Zellen aus heterogenen Zellgemischen zu gewinnen, wurden diese mit Hilfe von Zellisolierungs-Kits (Miltenyi, Bergisch Gladbach) nach Angabe des Herstellers aufgereinigt.

Deren Prinzip beruht auf der Inkubation des Zellgemisches mit einem Cocktail aus verschiedenen biotinylierten Antikörpern gegen Antigene, die nicht auf der gewünschten Zellpopulation vorkommen. An die biotinylierten Antikörper werden superparamagnetische Kügelchen gekoppelt. Anschließend lassen sich die nicht magnetischen (gewünschten) Zellen von magnetischen (heterogene Restpopulation) Zellen auf einer Säule in einem starken Magnetfeld trennen. Dabei werden die magnetischen Zellen im Magnetfeld auf der Säule zurückgehalten, während die erwünschten Zellen diese passieren. Die Reinheit der so gewonnenen Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch ermittelt. Typische Werte für NK-Zellen lagen dabei bei ca. 90% Reinheit.

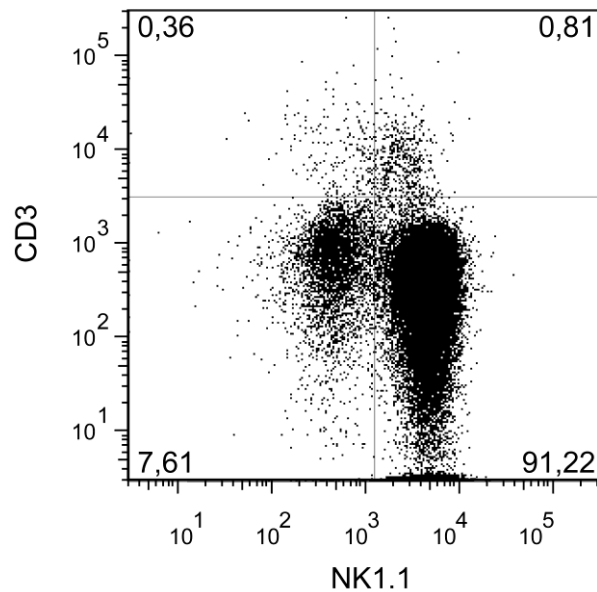


Abb. 2.2 NK-Zellen nach MACS-Separation von Milzzellen. Die Reinheit nach einer MACS-Aufreinigung lag im Regelfall bei etwa 90 %.

2.4.3. Zytotoxizität

Die Funktionalität von NK-Zellen wurde anhand der Zytotoxizität mittels ^{51}Cr -Freisetzung getestet. Nach der Organentnahme aus den Spendertieren wurden mittels immunmagnetischer Zellseparation hochreine NK-Zellen gewonnen. Diese Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen auf einer 96-Loch-Rundbodenplatte in Medium, das 10 % FKS enthielt, ausplattiert. Je nach Versuch wurden 20-50 ng/ml IL-15 (Peprotech, Hamburg) zugesetzt und über Nacht inkubiert oder die Zellen wurden direkt ex vivo ohne weitere Zusätze verwendet.

Als Zielzellen dienten standardmäßig $1\text{-}2 \times 10^3$ YAC-1-Zellen, welche aufgrund ihrer verminderten MHC-Klasse-I-Expression routinemäßig als Ziel für NK-Zellen verwendet werden.

Zur Markierung wurden 1×10^3 Zielzellen in $100 \mu\text{l}$ hitzeinaktiviertem FKS aufgenommen und mit einer Menge $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ in 10 %-FKS-Medium inkubiert, die $50 \mu\text{Ci}$ entsprach. Die Ermittlung der nötigen Chrom-Menge erfolgte taggenau mittels der Halbwertszeit (für ^{51}Cr $t_{1/2} = 27.7 \text{ d}$) unter Annahme des exponentiellen Zerfalls nach der Gleichung:

$$A_t = A_0 \times \left(\frac{1}{2}\right)^{\frac{t}{t_{1/2}}}$$

Nach 90 Min. Inkubation wurde überschüssiges Chrom, das nicht in die Zellen aufgenommen wurde durch zweimaliges Waschen mit gekühltem 10 %-FKS-Medium entfernt. Die Zellen wurden nochmals ausgezählt und so eingestellt, dass in 50 µl die gewünschte Zielzellzahl enthalten war. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl mit den Effektorzellen in den Kavitäten der 96-Loch-Platte vermischt und 4,5 h im Brutschrank inkubiert.

Zur Bestimmung der maximal durch die Zellen aufgenommenen Chrom-Menge wurden außerdem 50 µl Zielzellsuspension direkt auf eine Luma-Platte pipettiert.

Nach der Inkubationszeit wurden aus den einzelnen Kavitäten der kokultivierten NK- und Zielzellen 50 µL Mediumüberstand entnommen und auf eine Luma-Platte übertragen. Diese Platten wurden über Nacht im Abzug getrocknet und am nächsten Tag mit einer Folie versiegelt. Dann erfolgte die Messung der freigesetzten ⁵¹Chrom-Menge in einem γ-Szintillationszähler.

Die Berechnung der prozentualen Lyse errechnet sich dann aus folgender Formel:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{Spezifische Freisetzung} - \text{Unspezifische Freisetzung}}{\text{Maximale Freisetzung} - \text{Unspezifische Freisetzung}} \times 100\%$$

2.4.4. Bioplex-Methode zur Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen

Mit Hilfe der Bioplex-Methode lassen sich mehrere Chemokine und Zytokine gleichzeitig in biologischen Proben wie Serum oder Überständen aus Zellkulturen quantitativ ermitteln. Die Methode beruht auf Mikrosphären, die sowohl mit Antikörpern für die zu messenden Analyten gekoppelt sind, als auch eine eigene, jeweils unterschiedliche Fluoreszenz aufweisen. Binden Analyten an diese Antikörper, können sie mit einem zweiten biotinylierten Antikörper erfasst und anschließend durch an Streptavidin gekoppeltes PE sichtbar gemacht werden. Durch Fluoreszenzmessung der einzelnen Mikrosphären können dann Art und Menge der Analyten bestimmt werden, wobei zur Quantifizierung Standardkurven von jeweils mitgemessenen Referenzkontrollen herangezogen werden.

Die Vorgehensweise richtete sich jeweils nach den Anweisungen der Hersteller der verwendeten Luminex-Anwendungen. Proben wurden jeweils als Duplikate gemessen.

2.4.5. ELISA

TGF- β

nach Anweisung des Herstellers (eBioscience)

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. RNS-Extraktion

Die Extraktion von RNS erfolgte mittels TRIzol[®]-Reagent (Invitrogen), einem Gemisch von Phenol und Guanidin-iso-thiocyanat. Bis zu 10^6 Zellen wurden dazu in 200 μ l TRIzol aufgenommen und lysiert. Die Auftrennung erfolgte mit Brom-Chlor-Propan als Ersatz für das giftigere Chloroform. Anschließend wurde die RNS mit Isopropanol ausgefällt, mit 75%igem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Um vollständige Lösung zu erreichen, wurde die RNS noch 15 Min. bei 56 °C im Heizblock erwärmt und nach Messung der Konzentration bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.2. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Um die Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen quantitativ zu bestimmen, wurden diese mit dem „nanodrop“-Spektralphotometer in einer Schichtdicke von 0,2 mm vermessen. Dabei wurde die OD bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt und anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes nach

$$c = \frac{(A_{260nm} \times e)}{b}$$

(c = Nukleinsäurekonzentration [ng/ μ L], A = Absorption, e = Extinktionskoeffizient [ng \times cm/ μ L], b = Schichtdicke)

unter Verwendung des entsprechenden Extinktionskoeffizienten ($e_{RNS} = 40$ ng \times cm/ μ L; $e_{DNS} = 50$ ng \times cm/ μ L) berechnet.

Zur Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäuren wurde das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} gebildet. Angestrebt wurde dabei ein Wert von $\sim 2,0$ für reine RNS bzw. $\sim 1,8$ für DNS. Abweichende kleinere Werte deuten auf Verunreinigungen z.B. mit Phenol, Proteinen oder andere Substanzen, die bei 280 nm absorbieren, hin.

2.5.3. Reverse Transkription der RNS in cDNS

Um RNS in cDNS umzuschreiben, wurde das „First Strand cDNA Synthesis

Kit for RT-PCR (AMV)“ der Firma Roche verwendet. Dabei wurde für die reverse Transkription der folgende Ansatz gemischt:

Reagenz	Endkonzentration	Volumen
10× PCR-Puffer (100 mM Tris, 500 mM KCl)	1×	2,0 µl
25 mM MgCl ₂	5 mM	4,0 µl
Desoxyribonukleotid-Mix (jeweils 10 mM)	1 mM	2,0 µl
Oligo dT	1,6 µg	2,0 µl
RNase Inhibitor	50 U	1,0 µl
AMV Reverse Transkriptase	≥ 20 U	0,8 µl
RNS-Probe	3,0 µg	je nach Konz.
Wasser (RNase-frei)		ad 20 µl

Für die Reaktion wurde ein Programm mit folgendem Temperaturverlauf genutzt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Annealing	25 °C	10 Min.
2. Reverse Transkription	42 °C	60 Min.
3. Denaturierung AMV	99 °C	5 Min.
4. Kühlen	4 °C	Pause

Anschließend wurde die erhaltene cDNS sofort weiter verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.5.4. RT-PCR

Für die Bestimmung von IFN- γ auf Transkriptebeine wurde unter Verwendung des LightCycler™-Systems die DNS quantitativ in Echtzeit bestimmt („real-time“ RT-PCR). Dazu wurde eine PCR mit SYBR-Green, einem speziellen Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Dieser besitzt die Eigenschaft, Fluoreszenzlicht nur dann zu emittieren, wenn er an doppelsträngige DNS gebunden vorliegt (~ Faktor 100 im Vergleich zu ungebundenem Farbstoff). Anhand des gemessenen Fluoreszenzverlaufs lässt sich also messen, wann die PCR-Reaktion in den linear-logarithmischen Bereich eintritt. Dies ist der Bereich, in dem annähernd eine Verdopplung der Amplifikatmenge innerhalb eines

jeden Zyklus stattfindet. Je mehr DNS ursprünglich in der Probe war, desto schneller erreicht der Fluoreszenzverlauf diesen linear-logarithmischen Bereich.

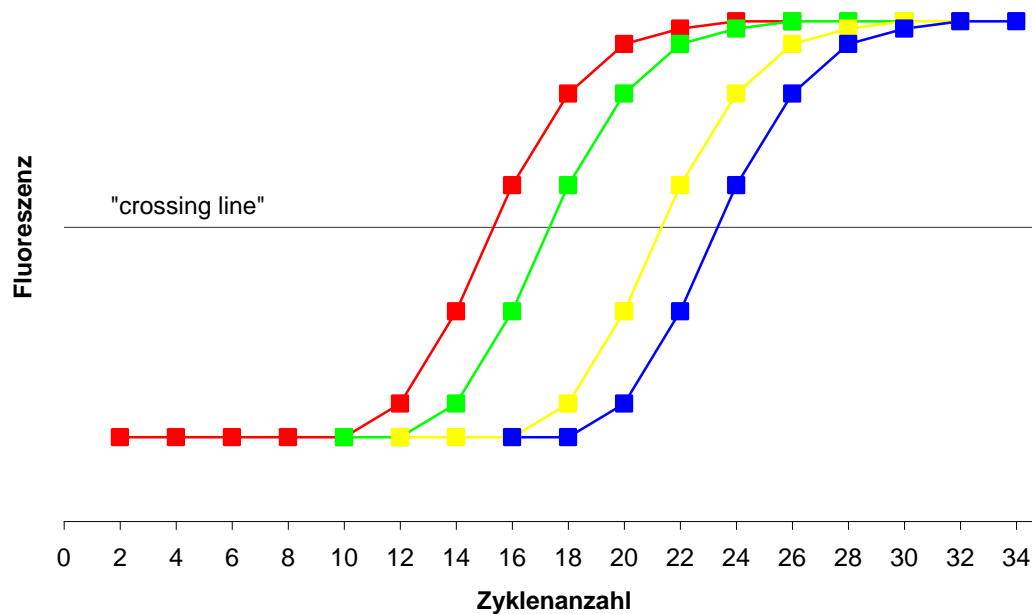


Abb. 2.3 RT-PCR Verläufe. Durch simultane Messung der Fluoreszenzintensität aller Proben am Ende eines jeden Zyklus kann die Reaktion verfolgt werden. Die Intensität ist dabei der Menge des PCR-Produktes proportional. Eine genaue quantitative Analyse der Proben ist nur im linear-logarithmischen Bereich möglich. Dazu wird durch die LightCycler™ Software eine Kreuzungslinie („crossing line“) erstellt, die alle Kurven in diesem Bereich schneidet. Die Kreuzungspunkte („crossing points“ = CP) dieser Linie mit den Fluoreszenzverläufen der Produkte dienen als Maß für die Menge der ursprünglichen DNS. Proben mit höherem Gehalt der jeweiligen DNS haben dabei kleinere CP als solche mit weniger DNS.

Die Kreuzungslinie in diesem linear-logarithmischen Bereich sollte dabei für alle Experimente bei dem gleichen Wert liegen, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Als Kontrolle wurden alle Werte auf das Haushaltsgen HPRT bezogen, wozu die Expression als relative Quantifizierung gegenüber diesem Haushaltsgen angegeben wurde. Die Berechnung dazu erfolgte nach folgender Formel:

relative Expression bezogen auf Vergleichszellen = $2^{(CP_1-CP_3)-(CP_2-CP_4)}$

CP₁, erhalten mit HPRT und cDNS der zu untersuchenden Zellsorte

CP₂, erhalten mit HPRT und cDNS der Vergleichszellen

CP₃, erhalten mit IFN- γ und cDNS der zu untersuchenden Zellsorte

CP₄, erhalten mit IFN- γ und cDNS der Vergleichszellen

Die RT-PCR-Ansätze waren dabei jeweils wie folgt zusammengesetzt:

cDNS	2,0 μ l
SYBR Green Mastermix	4,0 μ l
MgCl ₂	3,2 μ l
Primer vorwärts	1,5 μ l
Primer rückwärts	1,5 μ l
H ₂ O	9,8 μ l
Gesamtvolumen	20,0 μ l

Die PCR-Bedingungen waren:

Anfangsdenaturierung	94 °C	2 Min.
Amplifikation (40 Zyklen):		
Denaturierung	94 °C	30 Sek.
Primeranlagerung	60 °C	45 Sek.
Elongation	72 °C	60 Sek.
Termination	72 °C	10 Min.

Im direkten Anschluss an die PCR wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte vorgenommen. Dazu wurde der Heizblock des LightCycler™-Geräts um 0,1 °C/Sek. von 65 °C bis 99 °C aufgeheizt und gleichzeitig der Anstieg der Fluoreszenz (= erste Ableitung der Fluoreszenzintensität) gemessen. Dabei ergeben sich für jedes PCR-Produkt typische Kurven mit einem Maximum im Schmelzpunkt, als dem Punkt, bei

dem die Hälfte der DNS einzelsträngig und die andere Hälfte der DNS doppelsträngig vorliegt.

2.5.4.1. Primer für die RT-PCR:

Primer wurden bei der Firma Metabion, Martinsried gekauft.

		Sequenz	Produktlänge	Quelle
HPRT	vorwärts	5'-TGG GAG GCC ATC ACA TTG T-3'	403 bp	aus [Guerra <i>et al.</i> 2008]
	rückwärts	5'-TGA AGT ACT CAT TAT AGT CAA GGG CA-3'		
IFN- γ	vorwärts	5'-ACT GGC AAA AGG ATG GTG AC-3'	237 bp	nach Primervorschlag aus online-Werkzeug „Primer3“ [Rozen <i>et al.</i> 2000]
	rückwärts	5'-TGA GCT CAT TGA ATG CTT GG-3'		

3. Ergebnisse

3.1. NK-Zellen

NK-Zellen als wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems zeichnen sich dadurch aus, dass sie virusinfizierte oder maligne entartete Zellen ohne vorangehenden Antigenkontakt wirksam bekämpfen können. Die durch virale Infektion oder maligne Transformation verursachte Verminderung von MHC-Klasse-I-Molekülen ist ein wichtiges Signal, das NK-Zellen aktiviert [Herberman *et al.* 1975; Kiessling *et al.* 1975]. Nachdem aus vorangehenden Ergebnissen in der Arbeitsgruppe bereits bekannt war, dass die Lymphome in dem c-myc-transgenen Spontantumormodell verminderte MHC-I-Expression aufwiesen, lag die Vermutung nahe, dass diese auch sensitiv gegenüber NK-Zellen sein sollten.

3.1.1. NK-Zellen in Geweben erkrankter Mäuse

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob es zu quantitativen Veränderungen bei den NK-Zellen in erkrankten Tieren kommt. Mäuse mit sich entwickelndem Lymphom wurden geopfert, um NK-Zellen aus verschiedenen Organen zu analysieren. Die durchflusszytometrische Analyse ergab nach Eingrenzung auf die NK1.1⁺CD3⁻-Zellpopulation, dass in erkrankten c-myc-Mäusen der Anteil an NK-Zellen durchweg vermindert war. Bei der quantitativen Betrachtung der NK-Zellen muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass sowohl im Blutkreislauf, als auch in den lymphatischen Geweben hohe Anteile an malignen B-Zellen vorkommen. Aufgrund dieser hohen B-Zell-Zahlen kann es somit sein, dass zwar der relative Anteil vermindert, die Absolutzahl jedoch erhöht ist. Besonders in den primär vom Tumor befallenen zervikalen und mandibulären Lymphknoten wurde tatsächlich eine stark erhöhte Absolutzahl von NK-Zellen detektiert. Andere lymphatische Organe wie axilläre und inguinale Lymphknoten, die meist erst später von den sich entwickelnden Tumoren betroffen sind, zeigten ebenfalls einen Anstieg in der Anzahl der NK-Zellen (Abb. 3.1 A). Für Organe wie Blut und Knochenmark, die einer Absolutzahlbetrachtung experimentell nicht zugänglich sind, ist der relative NK-Zell-Anteil in Abb. 3.1 B wiedergegeben.

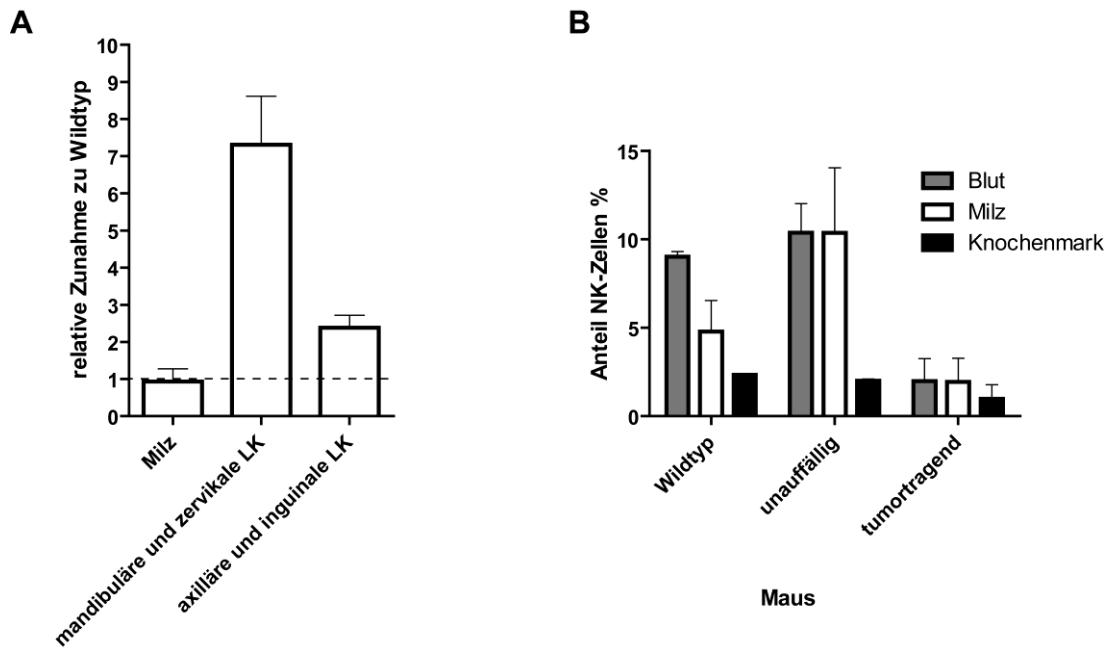


Abb. 3.1 Quantitative Analyse von NK-Zellen im Spontantumormodell. (A) Absolutzahl der NK-Zellen in Milz und Lymphknoten erkrankter Tiere relativ zu Wildtyp-Mäusen (gestrichelte Linie). (B) Anteil der NK-Zellen in verschiedenen Organen von Wildtyp-Mäusen, unauffälligen c-myc-Mäusen und tumortragenden c-myc Mäusen. Während noch nicht erkrankte c-myc-Mäuse nur wenig Veränderungen im Anteil von NK-Zellen in den betrachteten Geweben zeigen, ist in tumortragenden Mäusen eine deutliche Verminderung des NK-Zell-Anteils zu beobachten.

3.1.2. NK-Zellen zeigen phänotypische Aktivierungszeichen

Um den Aktivierungszustand der NK-Zellen zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. In den Milzen der erkrankten Tiere waren typische Aktivierungsmarker wie CD69 oder CD45R hochreguliert. Sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren der Ly-49-Klasse, aber auch CD49b und der aktivierende Rezeptor NKG2D waren abreguliert. c-myc-Mäuse die noch keinen sichtbaren Tumor aufwiesen, zeigten hingegen nur leichte Veränderungen der NK-Zell-Marker. Diese tendierten in die gleiche Richtung wie bei den erkrankten Tieren. In den Lymphknoten von tumortragenden Mäusen ergab sich das gleiche Bild der Aktivierung wie in der Milz.

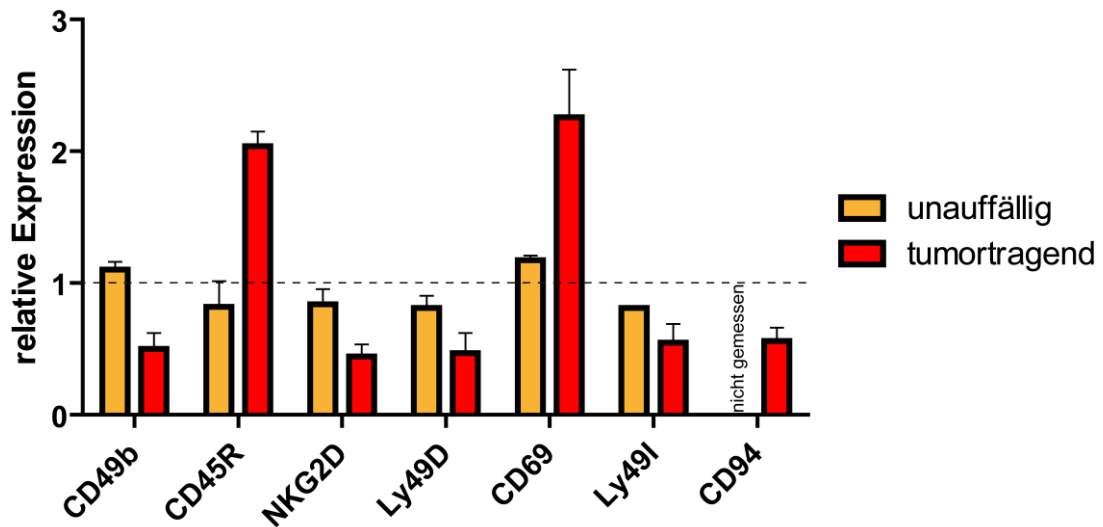


Abb. 3.2 Veränderungen von Oberflächenmarkern auf NK-Zellen aus der Milz in tumortragenden und unauffälligen c-myc Mäusen. Die Relativwerte beziehen sich auf gesunde Wildtyp-Mäuse (gestrichelte Linie). Die Aktivierungsmarker CD45R sowie CD69 sind erhöht. Sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren auf den NK-Zellen sind vermindert.

Hinsichtlich des Entwicklungsstadiums von NK-Zellen kann neben CD49b nach neueren Untersuchungen [Chiossone *et al.* 2009] auch CD27 herangezogen werden. Deshalb wurde die Expression von CD27 auf NK-Zellen aus Milz und Lymphknoten erkrankter Tiere ermittelt (Abb. 3.3). Im Vergleich zu Wildtyptieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Milzen. Auf NK-Zellen aus erkrankten Lymphknoten war CD27 jedoch leicht vermindert.

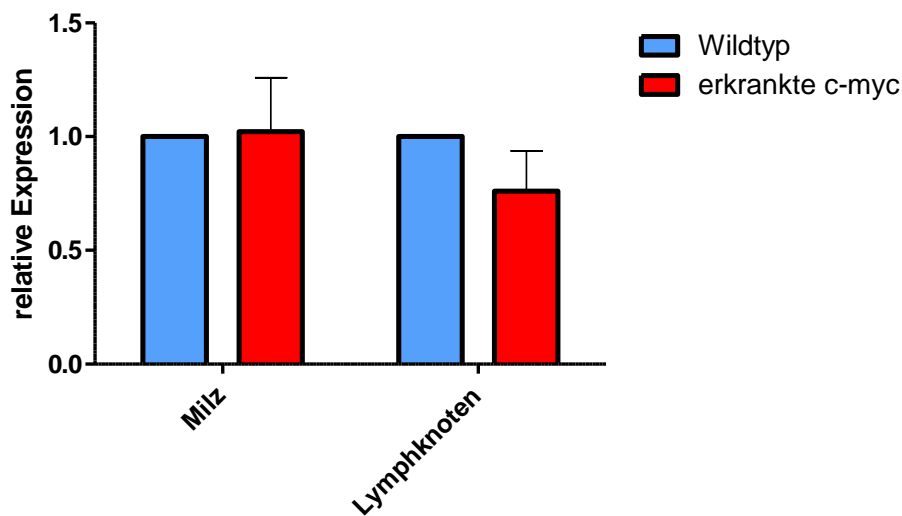


Abb. 3.3 Expression von CD27 auf NK-Zellen aus kranken Mäusen im Vergleich zu Wildtypkontrollen. In Lymphknoten ist die Expression von CD27 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen leicht, jedoch nicht signifikant ($P = 0,09$) vermindert.

3.1.3. Die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen aus Tumormäusen ist beeinträchtigt

Für die Effektorfunktionen von NK-Zellen spielt die Ausschüttung von IFN- γ eine bedeutende Rolle. Daher wurden NK-Zellen aus Mäusen verschiedener Tumorstadien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, IFN- γ zu bilden, analysiert. Die intrazelluläre Färbung von IFN- γ in NK-Zellen ergab in der Durchflusszytometrie, dass im Gegensatz zu gesunden Tieren in tumortragenden Mäusen nur sehr geringe Mengen des Zytokins in NK-Zellen vorhanden waren (Abb. 3.4). In Tieren, welche noch nicht das klinische Bild eines manifesten Lymphoms aufwiesen, war die Fähigkeit der IFN- γ -Produktion ebenfalls bereits beeinträchtigt.

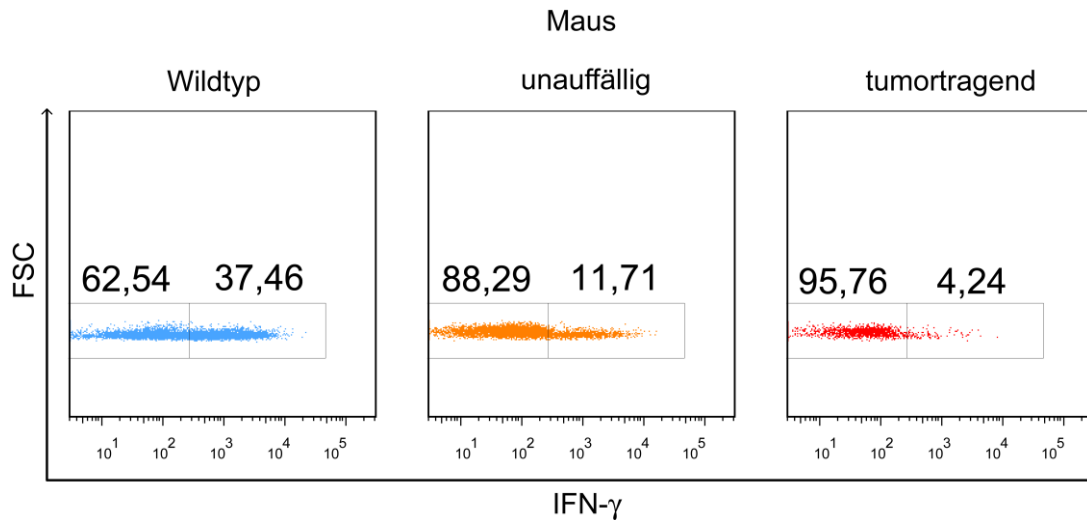


Abb. 3.4 Intrazelluläre Färbung von IFN- γ in NK-Zellen aus den Milzen von Mäusen in unterschiedlichen Tumorstadien. Die Abbildungen zeigen repräsentative Werte aus 5-8 unabhängigen Experimenten. Die Zellpopulation wurde auf NK1.1⁺CD3⁻ NK-Zellen eingegrenzt. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der IFN- γ^+ bzw. IFN- γ^- NK-Zellen an.

Eine Analyse der RNS aus hochangereicherten NK-Zellen ergab, dass auch auf Transkriptebene weniger IFN- γ in den NK-Zellen der erkrankten Tiere gebildet wurde (Abb. 3.5). Bezogen auf Wildtyptiere und normiert auf HPRT als Haushaltsgen, wiesen Tiere mit ausgeprägtem Tumor nur etwa 5 % der IFN- γ -Transkriptmenge in NK-Zellen auf. NK-Zellen von Tieren, die noch nicht auffällig waren und daher als noch gesund klassifiziert wurden, enthielten etwa 60 % der Transkriptmenge. Die Unterschiede in den drei Gruppen waren nach ANOVA-Test signifikant ($P < 0,001$). Die Analyse auf Transkriptebene bestätigte also das Ergebnis auf Proteinebene.

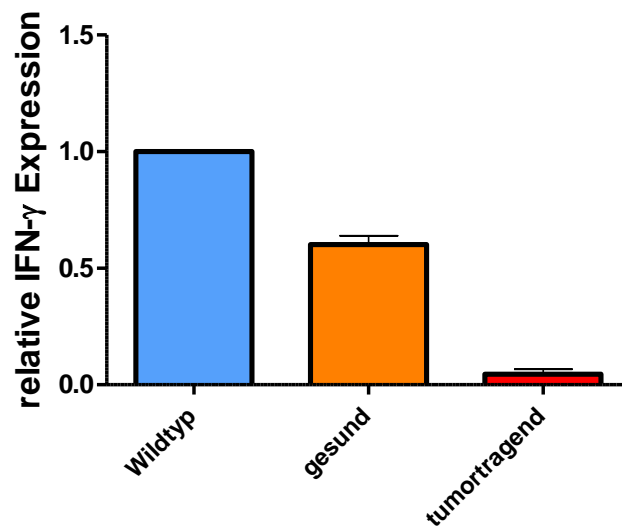


Abb. 3.5 IFN- γ -Gehalt in aufgereinigten NK-Zellen aus Wildtypmäusen, gesunden und tumortragenden c-myc-Tieren. Gemessen mittels quantitativer PCR und ausgedrückt als Relativwert bezogen auf Wildtypmäuse und normiert auf HPRT. Es ergibt sich hier die gleiche Hierarchie von Wildtyptieren über unauffällige c-myc-Mäuse zu tumorerkrankten c-myc-Mäusen wie in der Analyse auf Proteinebene. Die Unterschiede waren jeweils mit $P < 0,001$ signifikant.

3.1.4. Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber YAC-1

Um die Effektorfunktion von NK-Zellen zu überprüfen, wurden immunmagnetisch angereicherte NK-Zellen aus Milzen isoliert und mittels Chromfreisetzungsversuchen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht (Abb. 3.6). NK-Zellen aus erkrankten Tieren waren nicht in der Lage, YAC-1-Zielzellen zu lysieren. Wurden NK-Zellen aus Tieren gewonnen, die noch keine sichtbaren Tumoren aufwiesen, so zeigten auch diese schon eine Beeinträchtigung in der Fähigkeit zu lysieren. Nur Wildtyp-NK-Zellen zeigten die erwarteten Lyseraten.

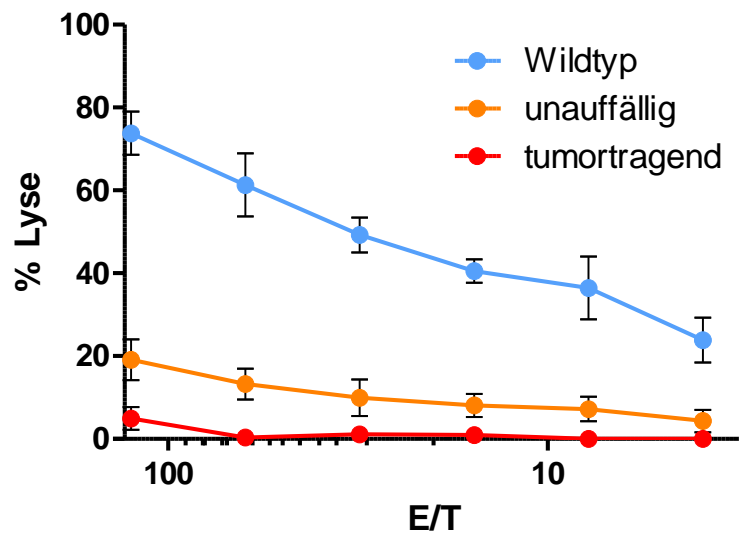


Abb. 3.6 Zytotoxizitätsversuche mit angereicherten NK-Zellen. NK-Zellen aus erkrankten Tieren können Zielzellen nicht lysieren. Im Gegensatz zu NK-Zellen aus Wildtyp-Mäusen sind auch die aus klinisch unauffälligen Mäusen gewonnenen NK-Zellen schon zu einem gewissen Grade beeinträchtigt.

3.1.5. Kokultur von NK- und Tumorzellen führt zu verminderter Lyse

Um den Einfluss eines sich entwickelnden Tumors auf die NK-Zellen *in vitro* abzubilden, wurden aus Spontanlymphomen Zelllinien (siehe 2.2.2) etabliert und Wildtyp-NK-Zellen mit diesen kokultiviert. Die Tumorzellen wurden durch Bestrahlung replikationsinkompetent gemacht. Nach verschieden langer Zeit der Kokultur wurden die NK-Zellen in Chromfreisetzungsexperimenten auf ihre zytotoxische Funktion hin untersucht. Dabei zeigte sich eine verminderte Lysefähigkeit, wenn NK-Zellen aus Wildtypmäusen über längere Zeit mit Tumorzellen kokultiviert worden waren.

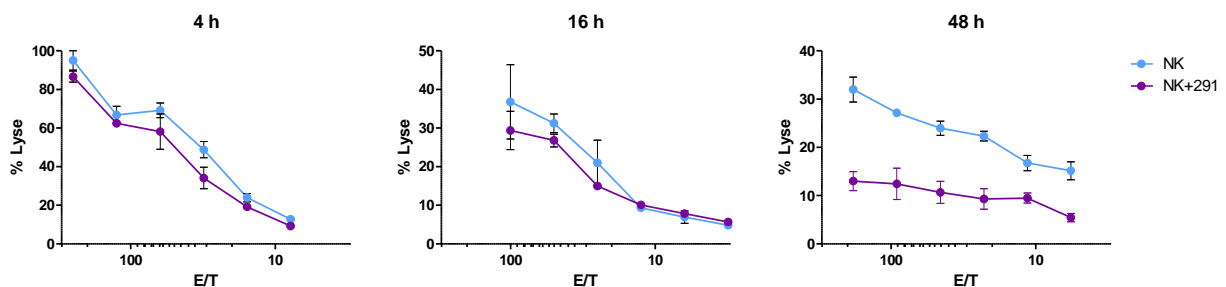


Abb. 3.7 Lyse von YAC-1 durch Wildtyp-NK-Zellen nach Kokultur mit der Tumorzelllinie 291. Nach längerer Kokultur von NK- und Tumorzellen lässt die Lysefähigkeit der NK-Zellen nach.

Um zu zeigen, dass die Kokultur die Situation im Organismus widerspiegelt, wurden Wildtypmäuse mit der Tumorzelllinie 291 inokuliert. Nachdem die Tumorzellen in den Mäusen angewachsen waren, wurden die Mäuse geopfert und aus den Milzen NK-Zellen isoliert. Diese NK-Zellen zeigten im Vergleich zu NK-Zellen aus unbehandelten Wildtypmäusen ebenso einen Defekt in der Lysefähigkeit gegenüber Zielzellen, wie dies bereits im Kokulturversuch nach 48h sichtbar wurde und auch bei der Entstehung der Spontantumoren in den transgenen c-myc-Tieren der Fall war.

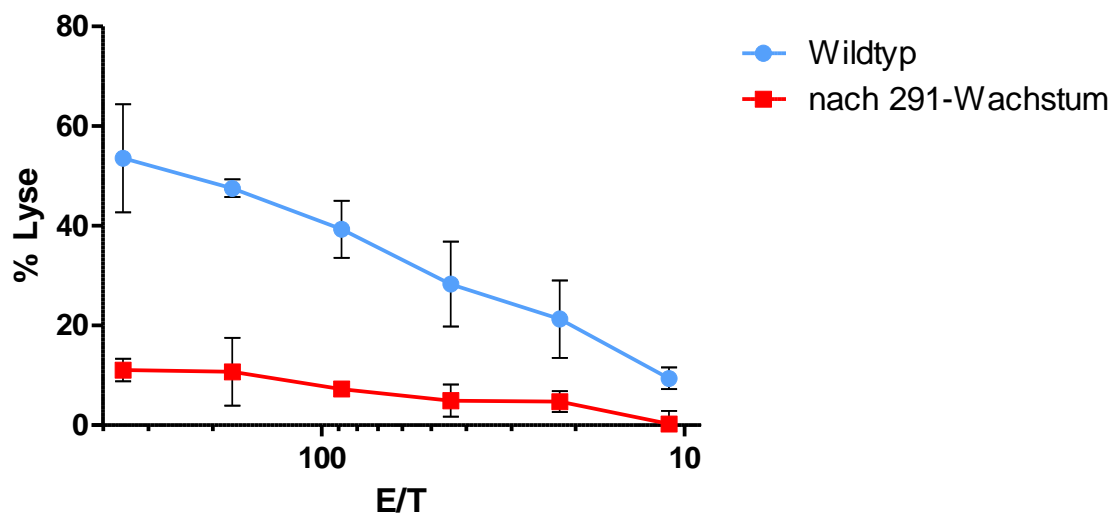


Abb. 3.8 Lyse von YAC-1 durch NK-Zellen aus einer Wildtypmaus und einer Maus, in der die Tumorzelllinie 291 angewachsen war. Mäuse erhielten 5×10^6 291-Zellen i.v. verabreicht. Nach Wachstum der Tumorzellen waren NK-Zellen nicht mehr in der Lage, Zielzellen zu lysieren.

Aus dem unter 3.1.4 beschriebenen zytotoxischen Defizit der NK-Zellen aus tumorkranken Mäusen ergab sich die Frage, ob NK-Zellen erkrankter Tiere normale Wildtyp-NK-Zellen in ihrer Zytotoxizität hemmen. Dies sollte durch zwei unterschiedliche Mischungsversuche mit anschließender Zytotoxizitätstestung beantwortet werden. Immunmagnetisch angereicherte NK-Zellen aus kranken Mäusen und Wildtyp-Tieren wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Die Mischungen wurden anschließend als Effektorzellen für eine Chromfreisetzung verwendet. Die gemessenen Lyseraten bestätigten das Unvermögen von NK-Zellen tumortragender Tiere, Zielzellen zu lysieren. Mischungen von NK-Zellen aus Wildtyp-Mäusen und aus tumortragenden Tieren führten zu geringfügig niedrigeren Lyseraten als NK-Zellen aus

Wildtypmäusen allein (Abb. 3.9 A). Die beobachtete geringfügige Änderung könnte auf einen Effekt, der durch die NK-Zellen erkrankter Tiere vermittelt wurde, zurückzuführen sein oder nur durch Konkurrenz um die Zielzellen zustande kommen.

Deshalb wurden weitere Kokultivversuche mit markierten NK-Zellen durchgeführt. Immunmagnetisch angereicherte NK-Zellen aus GFP-transgenen Mäusen (vgl. 2.3), die sich wie NK-Zellen aus Wildtyptieren verhalten, wurden mit NK-Zellen aus erkrankten c-myc-Mäusen kokultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die NK-Zellen per FACS wieder getrennt und die GFP-NK-Zellen in Zytotoxizitätstests als Effektorzellen verwendet. Wie in Abb. 3.9 B gezeigt, führen die NK-Zellen immer zu gleich hohen Lyseraten. Als Positiv-Kontrolle dienten reine GFP-NK-Zellen, die nicht sortiert wurden. Hierdurch wird auch ersichtlich, dass die NK-Zellen aus GFP-Tieren durch den Sortiervorgang keinen Schaden nehmen. Eine weitere Kontrolle bildeten wiederum c-myc-NK-Zellen, die wie erwartet kaum Lyse zeigten. Durch diese zweite Versuchsanordnung konnte somit gezeigt werden, dass NK-Zellen erkrankter Tiere ihr funktionelles Defizit nicht auf Wildtyp-NK-Zellen übertragen können.

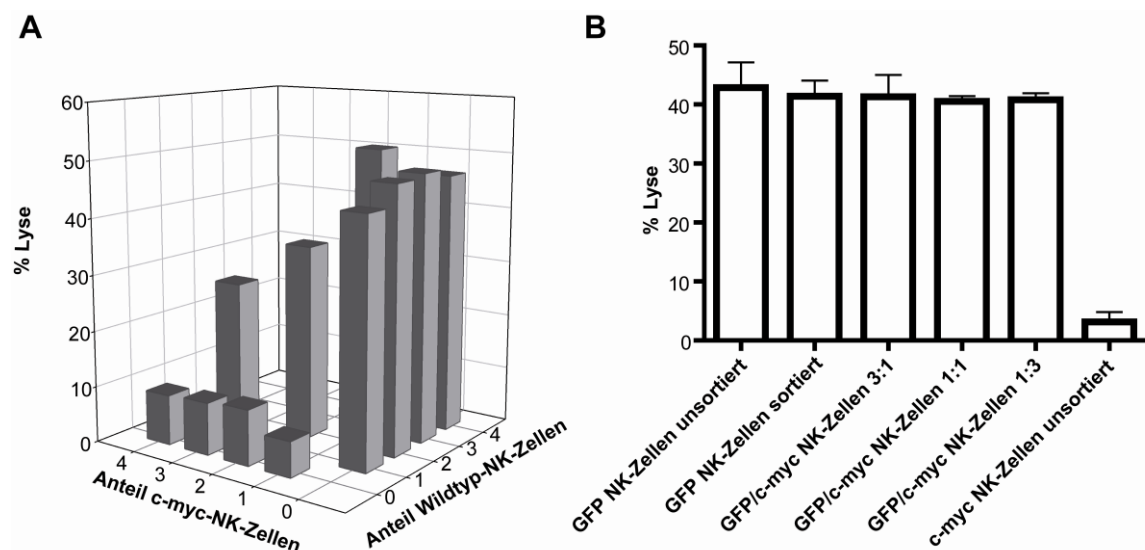


Abb. 3.9 Zytotoxizität von Mischungen aus NK-Zellen aus Wildtyp- und kranken c-myc-Mäusen. (A) Konkurrenz um die Zielzellen führt zu geringfügiger Abnahme der Lyserate von NK-Zell-Mischungen aus erkrankten und Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu reinen Wildtyp-NK-Zellen. (B) Nach Kokultiv mit NK-Zellen aus tumortragenden Tieren sortierte NK-Zellen zeigen keine Verminderung in den erzielten Lyseraten. Auch die Sortierung selbst führt zu keiner Beeinträchtigung der NK-Zellen, wie der Vergleich mit unsortierten, angereicherten NK-Zellen als Kontrolle zeigt.

3.1.6. TLR-Liganden aktivieren NK-Zellen

Toll-like Rezeptoren sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die Strukturen von Krankheitserregern erkennen und so die Zellen des angeborenen Immunsystems zu aktivieren vermögen. CpG-Oligonukleotide sind synthetische Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-reiche Sequenzen, wie sie in bakterieller DNS vermehrt vorkommen. Sie sind in der Lage, Zellen über TLR zu aktivieren. Es ist bekannt, dass auch NK-Zellen sich *in vivo* durch CpG-ODN stimulieren lassen [Roda *et al.* 2005]. Daher wurde untersucht, ob dies auch mit NK-Zellen aus Tieren mit Spontantumoren möglich ist.

In einem *In-vitro*-Ansatz wurden angereicherte NK-Zellen aus verschiedenen Tieren über Nacht mit 1 μ M CpG-ODN behandelt. Anschließend wurde die Effizienz der Lysefähigkeit in Chromfreisetzungsexperimenten untersucht. Bei NK-Zellen aus Mäusen ohne manifesten Tumor konnte so die Lyserate auf das Niveau von Wildtypmäusen angehoben werden (Abb. 3.10). Wurden jedoch NK-Zellen aus tumortragenden Mäusen verwendet, so konnte die Behandlung mit CpG-ODN keine Wiederherstellung oder Erhöhung der Lysefähigkeit bewirken. Diese NK-Zellen sind also offensichtlich schon so beeinträchtigt, dass sie funktional nicht wieder rekonstituiert werden können.

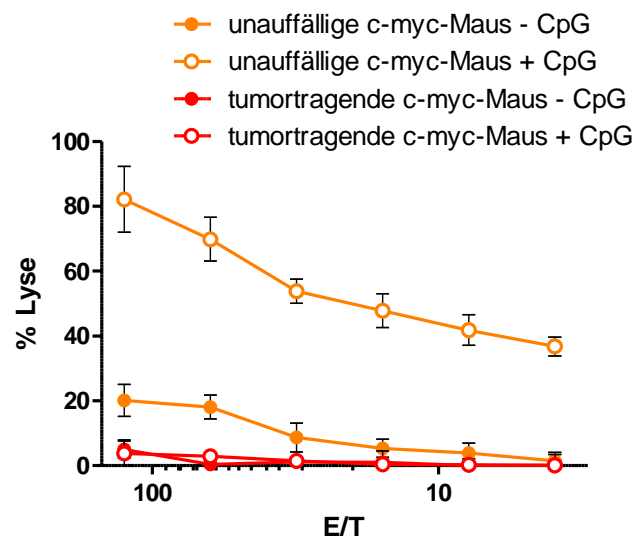


Abb. 3.10 Lyse von YAC-1-Zellen durch NK-Zellen aus Milzen von c-myc-Mäusen vor und nach Behandlung mit CpG-ODN *in vitro*. NK-Zellen aus tumortragenden Tieren können nicht durch CpG-ODN zu höheren Lyseraten gebracht werden, wie dies bei Zellen aus nicht-tumortragenden Mäusen möglich ist.

Wurden gesunde c-myc-Mäuse regelmäßig mit 10 nmol CpG-ODN i.p. behandelt, so ergab sich eine Verlängerung des tumorfreien Überlebens. Der Nachweis, dass dieser Effekt NK-Zell-abhängig war, gelang durch gleichzeitige NK-Zell-Depletion unter Behandlung mit CpG-ODN (je 8 Gaben i.p.). Mäuse, die diese Doppelbehandlung erfuhren, zeigten ähnlich schnelles Wachstum spontaner Lymphome, wie unbehandelte c-myc-Kontrolltiere. Die Behandlung mit CpG-ODN war vergleichbar erfolgreich wie eine Behandlung mit DC, die ebenfalls NK-Zellen stimulieren können [Ralph Mocikat, persönliche Mitteilung]. Durch die so erfolgte NK-Zell-Aktivierung zeigte sich zwar ein verlängertes Überleben, jedoch konnte das letztendlich letale Tumorwachstum nicht komplett verhindert werden (Abb. 3.11).

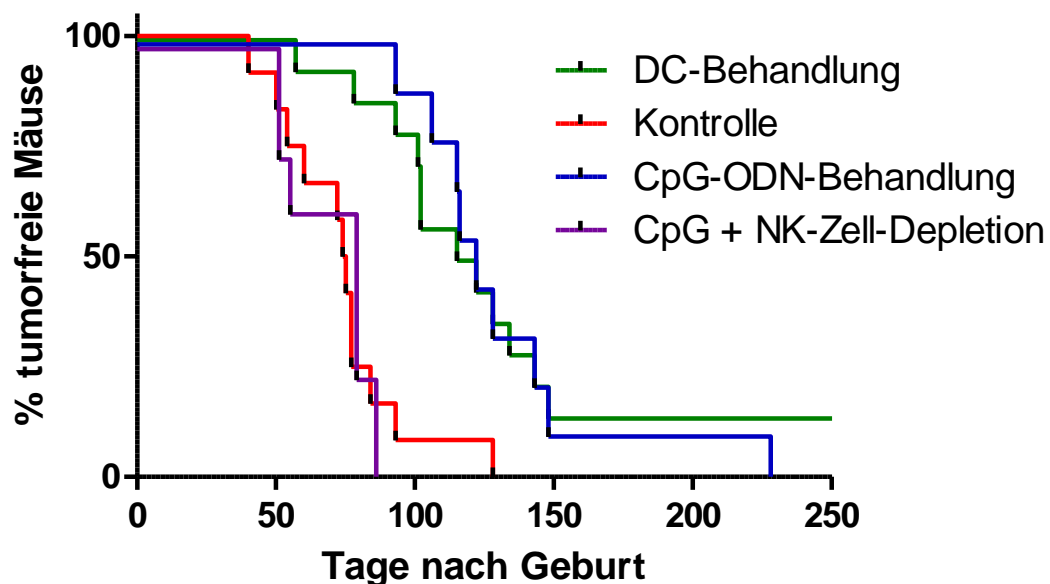


Abb. 3.11 Überleben von c-myc Mäusen nach wiederholter Behandlung mit CpG-ODN *in vivo*. CpG-ODN-Behandlung verlängert das tumorfreie Überleben von c-myc-Mäusen ähnlich stark wie die Behandlung mit DC. Gleichzeitige Gabe von CpG-ODN unter Depletion von NK-Zellen lässt den überlebensverlängernden Effekt verschwinden.

3.1.7. Aktivierung von NK-Zellen nach DC-Gabe

Wie ebenfalls aus Vorarbeiten [Adam *et al.* 2005] bekannt war, sind DC in der Lage, NK-Zellen zu aktivieren. Wie in Abb. 3.11 zu sehen, übt die wiederholte Gabe von DC einen überlebensverlängernden Effekt auf die c-myc-Mäuse aus. Um den Einfluss dieser DC-Gaben auf die Aktivierung von NK-Zellen zu messen, wurden verschiedene Aktivierungsmarker auf NK-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit gereiften DC

gemessen. Normale Wildtypmäuse wurden dazu zweimal im Abstand von einer Woche mit 5×10^5 DC s.c. immunisiert und drei Tage nach der letzten Immunisierung bezüglich der Aktivierung ihrer NK-Zellen in der Milz untersucht. Es zeigte sich eine Steigerung der Aktivierungsmarker CD45R und CD69 um fast das Doppelte bezogen auf unbehandelte Wildtyptiere (Abb. 3.12).

Da in Wildtyp-Mäusen nach DC-Behandlung die NK-Zellen *ex vivo* eine verstärkte Zytotoxizität zeigten [Adam, nicht publiziert], ist hier also eine Korrelation von Phänotyp und Funktion festzustellen. Im Gegensatz hierzu wurden in dem Spontan-Tumormodell NK-Zellen aktiviert (Abb. 3.2), ohne dass sie eine lytische Wirkung (Abb. 3.6) entwickeln konnten. Dort war also eine Entkopplung von Phänotyp und Funktion zu beobachten. Wie in Abb. 3.10 gezeigt, konnten die NK-Zellen in frühen Tumorstadien durch zusätzliche Stimuli noch aktiviert werden. In späteren Stadien war die Anergie der NK-Zellen nicht mehr umkehrbar (Abb. 3.10).

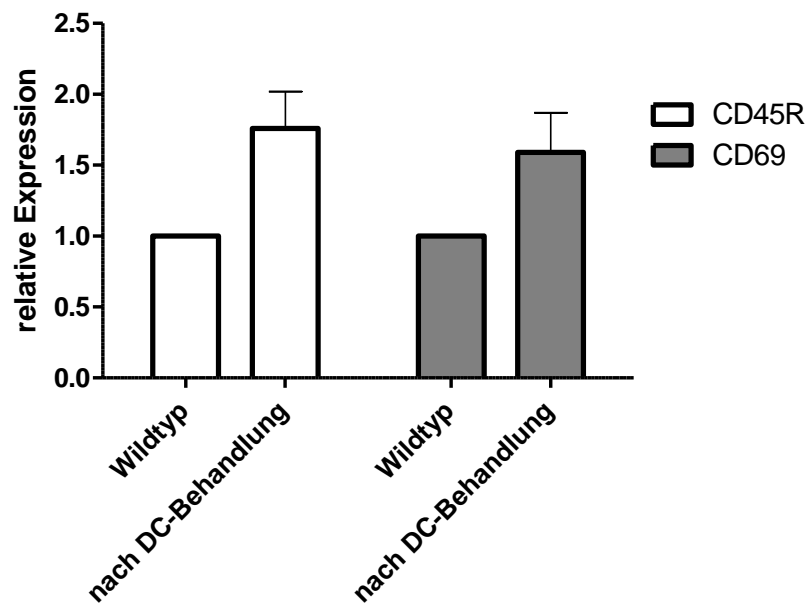


Abb. 3.12 Aktivierung von NK-Zellen nach DC-Immunisierung. Die Immunisierung erfolgte zweimal im Abstand von einer Woche mit reifen DC. Drei Tage nach der zweiten Immunisierung wurde der Aktivierungsstatus der NK-Zellen anhand der Expression von CD45R und CD69 im Vergleich zu Wildtyp-Tieren bestimmt.

3.1.8. Bedeutung von NKG2D-Liganden für die NK-Zell-Aktivierung und die Tumorabstoßung

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Tumoren NKG2D-Liganden exprimieren [Cerwenka *et al.* 2001; Diefenbach *et al.* 2001; Hayakawa *et al.* 2006] und diese in der Lage sind, NK-Zellen zu aktivieren und *in vivo* zu einer Tumorabstoßung führen können. Daher wurde der Einfluss der NKG2D-Liganden im vorliegenden Spontan-Tumormodell näher untersucht. In Abb. 3.2 wurde bereits gezeigt, dass NK-Zellen aus Tumormäusen eine verminderte NKG2D-Expression zeigen. Dieser Befund führte zu der Hypothese, dass entweder eine direkte Interaktion zwischen NK- und Tumorzellen oder lösliche NKG2D-Liganden für die Abregulation von NKG2D auf NK-Zellen verantwortlich sein müssen.

3.1.8.1. Lösliche NKG2D-Liganden?

Im humanen System sind lösliche Liganden für NKG2D bekannt. Dies sind MIC-A und MIC-B (MHC-I related chain). Diese löslichen NKG2D-Liganden spielen auch als Vermittler der Tumorevasion eine große Rolle. Um zu untersuchen, ob auch im hier verwendeten Spontantumormodell der Maus lösliche Liganden für NKG2D vorkommen, wurden verschiedene Tests durchgeführt.

Untersuchung des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen

Setzt man Zellen, die den Rezeptor NKG2D exprimieren, löslichen Liganden für diesen Rezeptor aus, so ist zu erwarten, dass dieser Rezeptor abreguliert wird [Groh *et al.* 2002]. Um lösliche NKG2D-Liganden im Serum nachzuweisen, wurden NK-Zellen aus den Milzen normaler Wildtypmäuse angereichert und mit Seren sowohl von Wildtypmäusen als auch von c-myc-transgenen Tieren in unterschiedlichen Tumorstadien inkubiert. Bei anschließenden durchflusszytometrischen Messungen konnten allerdings nie Änderungen in der NKG2D-Expression festgestellt werden (Abb. 3.13). Diese war, unabhängig vom Tumorstadium der Mäuse, immer mit derjenigen in normalen Wildtypkontrollen vergleichbar.

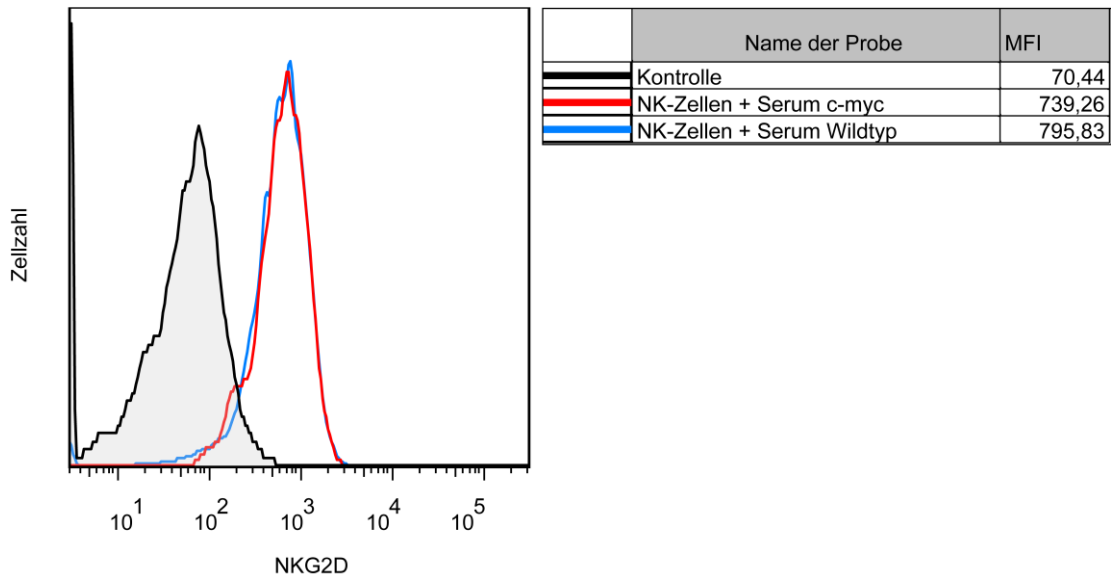


Abb. 3.13 Expression von NKG2D auf NK-Zellen nach Inkubation mit Seren von Wildtypmäusen und tumortragenden c-myc-Mäusen. Das grau schattierte Histogramm zeigt die Isotypkontrolle.

Kompetition mit NKG2D-Ligand auf der Zelloberfläche

Auch in einem weiteren Nachweissystem ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtypmäusen und c-myc-Mäusen unterschiedlicher Tumorstadien (Abb. 3.14). Diese zweite Strategie beruhte auf der Kompetition zwischen möglichen löslichen NKG2D-Liganden und Liganden auf der Oberfläche von A20-Zellen um die Bindung an NKG2D-Multimere.

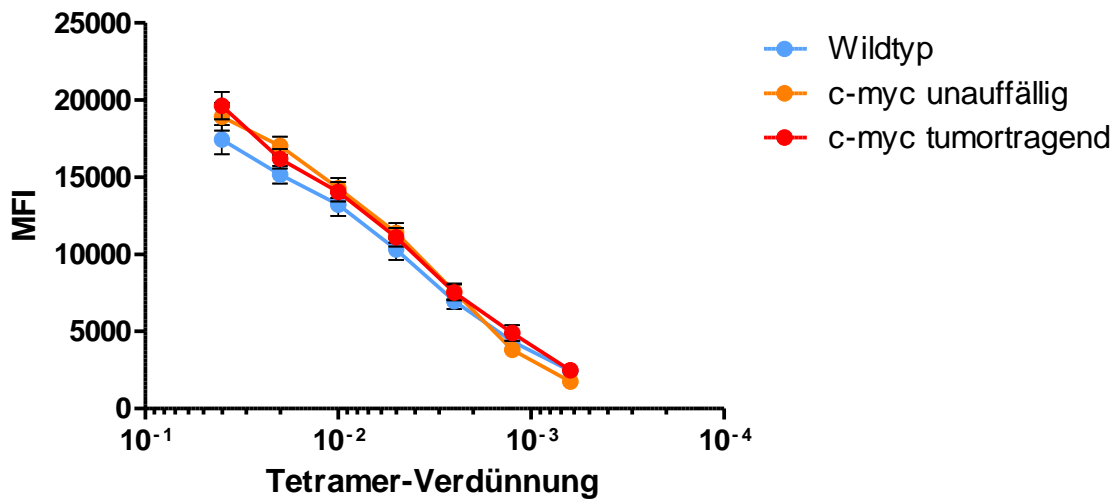


Abb. 3.14 Messung der NKG2D-Liganden auf A20-Zellen mit Multimer, welches zuvor mit Serum von Mäusen inkubiert wurde.

3.1.8.2. Modulation der NKG2D-Expression auf NK-Zellen nach Kontakt mit Tumorzellen

Nachdem sich somit keine Anhaltspunkte für die Existenz löslicher NKG2D-Liganden im murinen System ergaben, wurde die Auswirkung von Liganden für NKG2D auf NK-Zellen *in vitro* modellhaft gemessen. NK-Zellen, die in Kontakt mit Tumorzellen waren, welche NKG2D-Liganden exprimieren, zeigten nach 4,5 h eine Abnahme in der Expression des NKG2D-Rezeptors (Abb. 3.15). Diese Abregulation von NKG2D auf normalen NK-Zellen nach Koinkubation ist Zellkontakt-abhängig, da in einem Doppelkammersystem, in dem die Zellen durch eine Membran getrennt sind, keine Änderung bezüglich NKG2D auf den NK-Zellen zu beobachten war (Abb. 3.15).

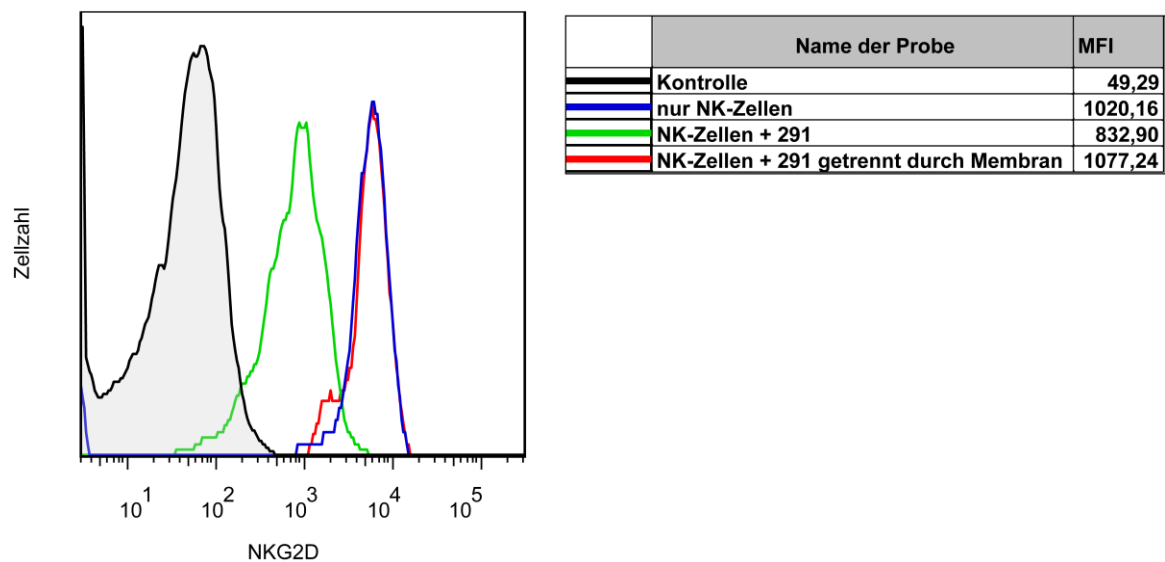


Abb. 3.15 Abregulation auf normalen NK-Zellen nach 4,5 h Koinkubation mit der Tumorzelllinie 291S. Die Abregulation ist Zellkontakt-abhängig. Im Doppelkammersystem ist keine Verminderung der NKG2D-Expression zu messen.

3.1.8.3. Einfluss von NKG2D-Liganden auf die Tumorabstoßung

Für den direkten Nachweis des Einflusses der NKG2D-Ligand-Expression auf das Tumorstadium *in vivo* wurden Zelllinien, welche aus dem transgenen c-myc-Tumormodell generiert wurden, verwendet. Die Zelllinien myc-B und myc-E zeigen beide geringe MHC-I-Expression, unterscheiden sich aber hinsichtlich der NKG2D-Liganden. Während die Zelllinie myc-E wenig NKG2D-Liganden exprimiert, ist die Expression bei myc-B hoch. Wurden 10^4 dieser Tumorzellen in Mäuse i.v. appliziert, so zeigte sich im Fall von myc-E ein schnelles Anwachsen der Tumorzellen. Die Zellen

myc-B wurden hingegen in 50% der Fälle komplett abgestoßen und benötigten auch in den übrigen Fällen wesentlich länger, um zum Anwachsen zu gelangen [Susan King, persönliche Mitteilung]. Jedoch ließen sich auch diese Zellen durch Blockade der NKG2D-Liganden mit dem NKG2D-Multimer zum Anwachsen in der gleichen Zeit wie myc-E bringen. Derselbe Effekt war auch zu sehen, wenn die NK-Zellen in den Empfängertieren depletiert wurden (Abb. 3.16). Dies zeigt sowohl die Abhängigkeit der Tumorabstoßung von den NKG2D-Liganden als auch die Bedeutung der NK-Zellen für die Abstoßung der Zellen. Das Fehlen einer genügend hohen Expression von NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen stellt somit einen Mechanismus der Evasion des Tumors vor dem Immunsystem dar.

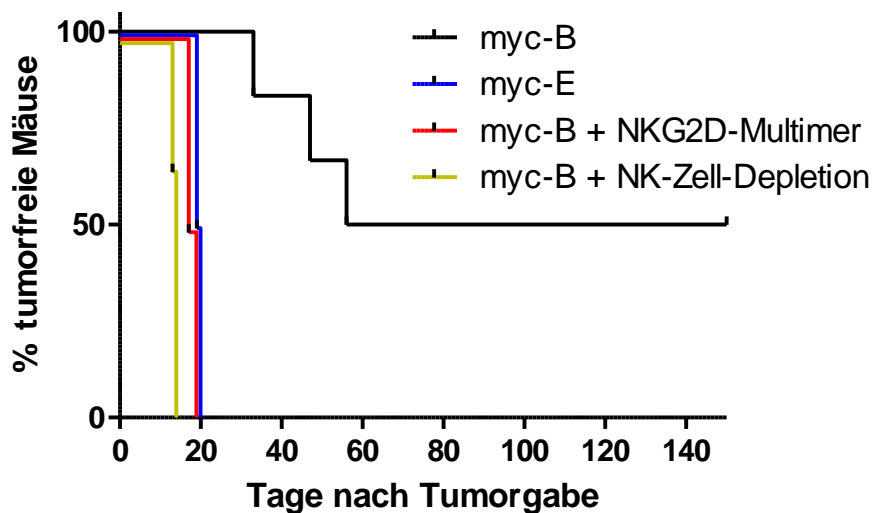


Abb. 3.16 Tumorwachstum in Abhängigkeit von NKG2D-Liganden und NK-Zellen. Die Zelllinie myc-B, welche viel NKG2D-Ligand exprimiert, benötigt sehr lange, um in Empfängermäusen anzuwachsen, und wird in der Hälfte der Fälle sogar abgestoßen. Hingegen wachsen myc-E-Tumorzellen, welche niedrige NKG2D-Ligand-Expression aufweisen, sehr schnell in den Mäusen an. Durch Blockade der NKG2D-Liganden mittels Multimer oder durch Depletion der NK-Zellen kann jedoch auch die Tumorzelllinie myc-B zum schnellen Anwachsen in Empfängertieren gebracht werden.

3.1.9. Einfluss von Bortezomib auf die NKG2D-Ligand-Expression

In der Therapie des Multiplen Myeloms wird Bortezomib aufgrund seiner Eigenschaft als Proteasom-Inhibitor angewandt. Die Blockade des Proteasoms führt zu einer Fehlregulation verschiedener Signalproteine in der Zelle und dadurch letztendlich zur Apoptose der Zelle. Daneben ist auch bekannt, dass Bortezomib die Expression von

NKG2D-Liganden auf Tumoren unterschiedlichen Ursprungs beeinflussen kann [Armeanu *et al.* 2008; Butler *et al.* 2009]. Da auch im vorliegenden Spontantumormodell, wie unter 3.1.8 gezeigt, den NKG2D-Liganden eine wichtige Rolle in der Tumorabstoßung zukommt, wurde der Einfluss von Bortezomib auf die aus dem Tumormodell stammende Zelllinie 291 untersucht. Tumorzellen wurden über unterschiedlich lange Zeit verschiedenen Konzentrationen Bortezomib ausgesetzt und anschließend durchflusszytometrisch bezüglich ihrer NKG2D-Ligand-Expression charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass in dieser Tumorzelllinie unter dem Einfluss von Bortezomib die Expression von NKG2D-Liganden hochreguliert wird (Abb. 3.17).

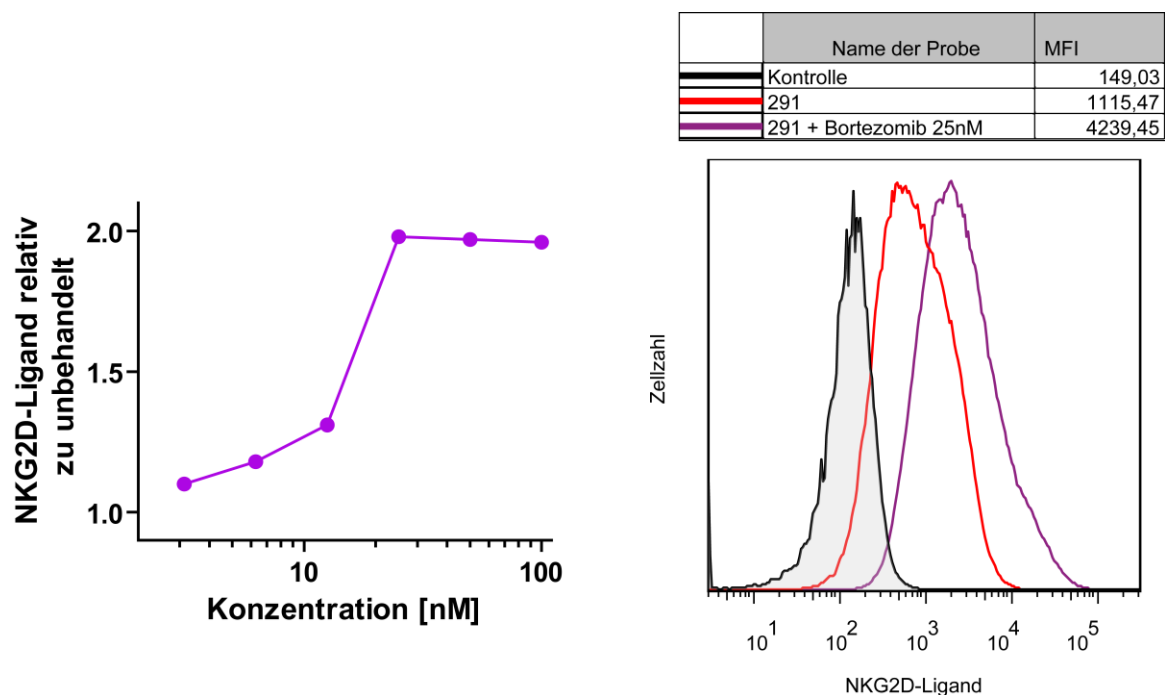


Abb. 3.17 Zunahme von NKG2D-Liganden auf der Tumorzelllinie 291 nach Behandlung mit Bortezomib. Nach 16 h Behandlung der Tumorzelllinie 291 mit verschiedenen Konzentrationen Bortezomib ergibt sich die links dargestellte konzentrationsabhängige Steigerung der NKG2D-Ligand-Expression bis etwa zum Doppelten der Ursprungs-Expression. Bei längeren Inkubationszeiten bis 48 h konnten zum Teil auch noch höhere NKG2D-Ligand-Werte gemessen werden (rechts mit 25 nM Bortezomib).

Um die Sensibilität der Tumorzellen nach Erhöhung der NKG2D-Liganden mittels Bortezomib gegenüber NK-Zellen *in vitro* zu messen, wurden Chromfreisetzungsversuche durchgeführt. NK-Zellen waren nicht in der Lage, Zellen der Zelllinie 291 zu lysieren. Nach Behandlung der Tumorzelllinie mit 25 nM Bortezomib

über Nacht zeigten die behandelten Zellen jedoch höhere Lyseraten durch NK-Zellen (Abb. 3.18). Sowohl der Befund *in vivo* (vgl. Abb. 3.16), als auch das in Abb. 3.18 gezeigte Experiment demonstrieren somit, dass NKG2D-Liganden als Signal für die Zytotoxizität von NK-Zellen fungieren.

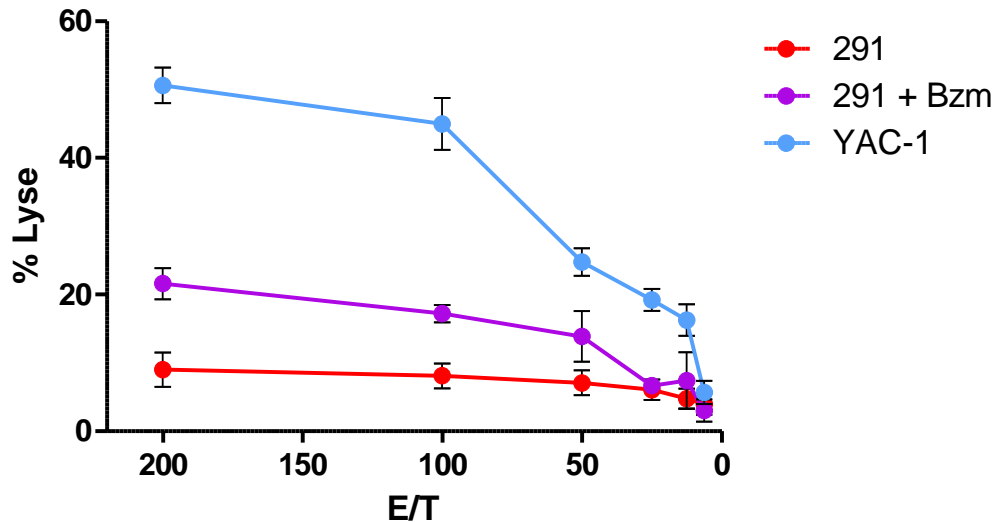


Abb. 3.18 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen die Tumorzelllinie 291. Die Tumorzelllinie 291 wurde normalerweise nicht durch NK-Zellen lysiert. Nach Behandlung der Tumorzellen mit Bortezomib konnte die Lyserate aber leicht gesteigert werden. Eine Steigerung auf das Niveau der Lyseraten von den Zielzellen YAC-1 konnte durch die Bortezomibbehandlung jedoch nicht erzielt werden.

Die Konsequenzen der Bortezomib-induzierten NKG2D-Ligand-Hochregulation für die Tumorabstoßung wurde *in vivo* überprüft. Als Kontrolle wurden Mäusen 5×10^6 291-Zellen i.v. verabreicht. Parallel dazu erhielt eine Gruppe die gleiche Anzahl 291-Zellen, welche zuvor mit Bortezomib behandelt wurden. Zwei weitere Versuchsgruppen wurden ebenfalls mit 291-Zellen mit oder ohne Bortezomib-Behandlung behandelt. Allerdings erhielten diese Versuchsgruppen zusätzlich noch 14 und 7 Tage vor Tumorzellgabe 10^5 gereifte DC s.c. verabreicht. Dies diente dazu, die NK-Zellen *in vivo* zusätzlich zu aktivieren (vgl. Abb. 3.11 und Abschnitt 3.1.7). Die Hälfte der Tiere, welche die Bortezomib-behandelten Tumorzellen erhielten, konnte den Tumor abstoßen. Wenn die Tiere zusätzlich vorher mit DC behandelt wurden, waren 80 % der Tiere in der Lage, den Tumor abzustößen. Dies war unabhängig davon, ob die Tumorzellen zuvor mit Bortezomib behandelt wurden (Abb. 3.19). Für die Tumorabstoßung kam hier also der

Aktivierung der NK-Zellen durch DC eine größere Bedeutung zu als der alleinigen Aktivierung über den NKG2D-Rezeptor.

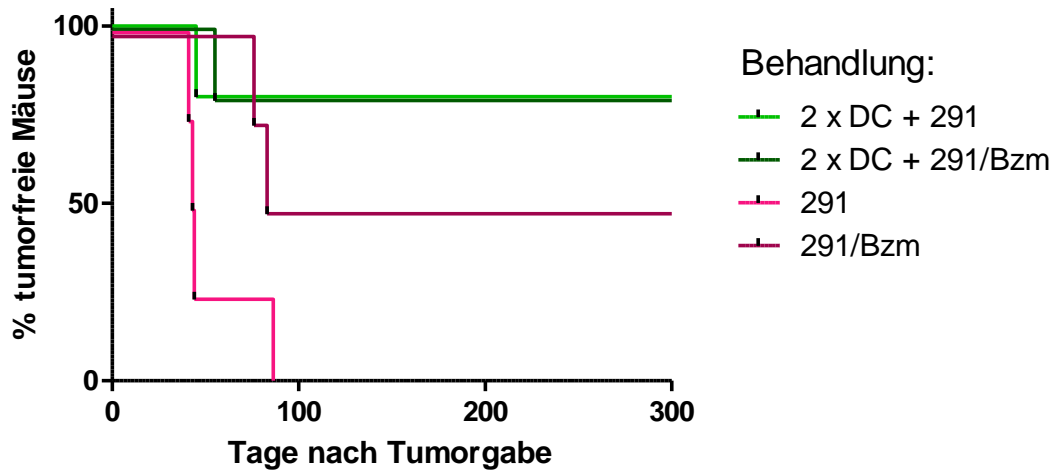


Abb. 3.19 Tumortransfer vor/nach Bortezomib-Behandlung mit/ohne vorausgehende DC-Gabe. Alle Mäuse, die 5×10^6 291-Zellen i.v. erhielten, entwickelten Tumoren. Wurden die Tumorzellen 291 zuvor mit Bortezomib behandelt, um die NKG2D-Expression auf den Zellen zu erhöhen, konnten 50 % der Mäuse den Tumor abstoßen. Eine vorausgehende Behandlung mit zwei Gaben von je 10^5 gereiften DC ermöglichte 80 % der behandelten Gruppen, die Tumorzellen abzustoßen.

Nachdem die Bortezomib-Behandlung also mindestens teilweise zur Abstoßung von Tumorzellen beitragen konnte, wurden auch Mäuse des Spontantumormodells mit wiederholten Gaben geringer Dosen Bortezomib behandelt. Die Tiere erhielten zweimal pro Woche 25 µg Bortezomib i.p. verabreicht. Die Behandlung von c-myc-Tieren mit wiederholten Gaben von niedrig dosiertem Bortezomib führte zu einem signifikant erhöhten Überleben.

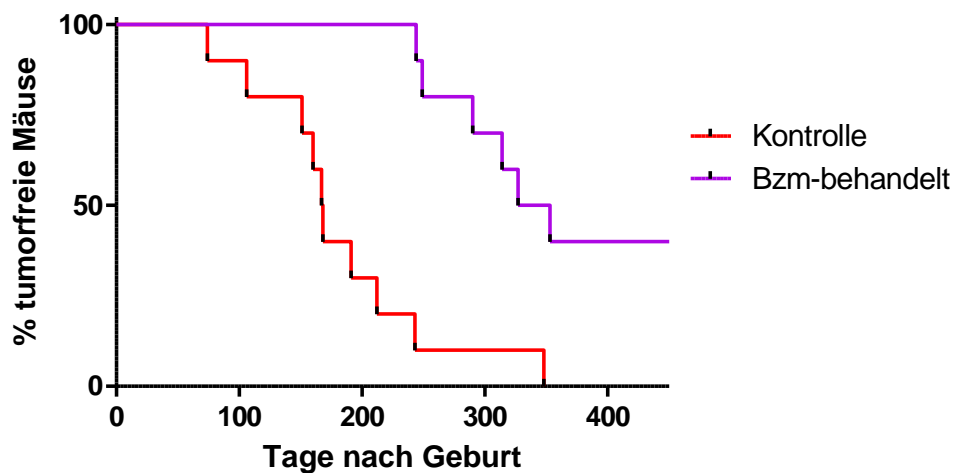


Abb. 3.20 Überlebenskurve von c-myc-Mäusen unter Bortezomib-Behandlung.

Eine Analyse der Tumoren, die sich dennoch entwickelten, ergab eigenartige Befunde. Entgegen der zu erwartenden und sonst im Tumormodell auch vorwiegend angetroffenen Expression von CD19 als B-Zellmarker auf den Tumoren zeigten die untersuchten Proben keine Expression von CD19 (Abb. 3.21 A). Stattdessen war der Hauptteil der Zellen positiv bezüglich CD4-Expression (Abb. 3.21 C). Daher galt es die Frage zu klären, ob es sich noch um B-Zellen oder evtl. um eine maligne T-Zell-Veränderung nach Bortezomib-Behandlung handelte. Die weitere Untersuchung der Ex-vivo-Tumoren zeigte jedoch weder CD3 (Abb. 3.21 B) als Charakteristikum für T-Zellen, noch konnte der T-Zell-Rezeptor auf den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.21 C). Auch regulatorische T-Zellen (Abb. 3.21 D) machten nur einen verschwindend geringen Teil der Zellen aus. Dafür waren sie aber positiv bezüglich CD45R (Abb. 3.21 B), was sie ebenfalls als B-Zellen ausweisen kann, da CD45R auf B-Zellen aller Entwicklungsstufen zu finden ist, CD19 hingegen bei der Ausreifung von B-Zellen zu Plasmazellen verloren gehen kann.

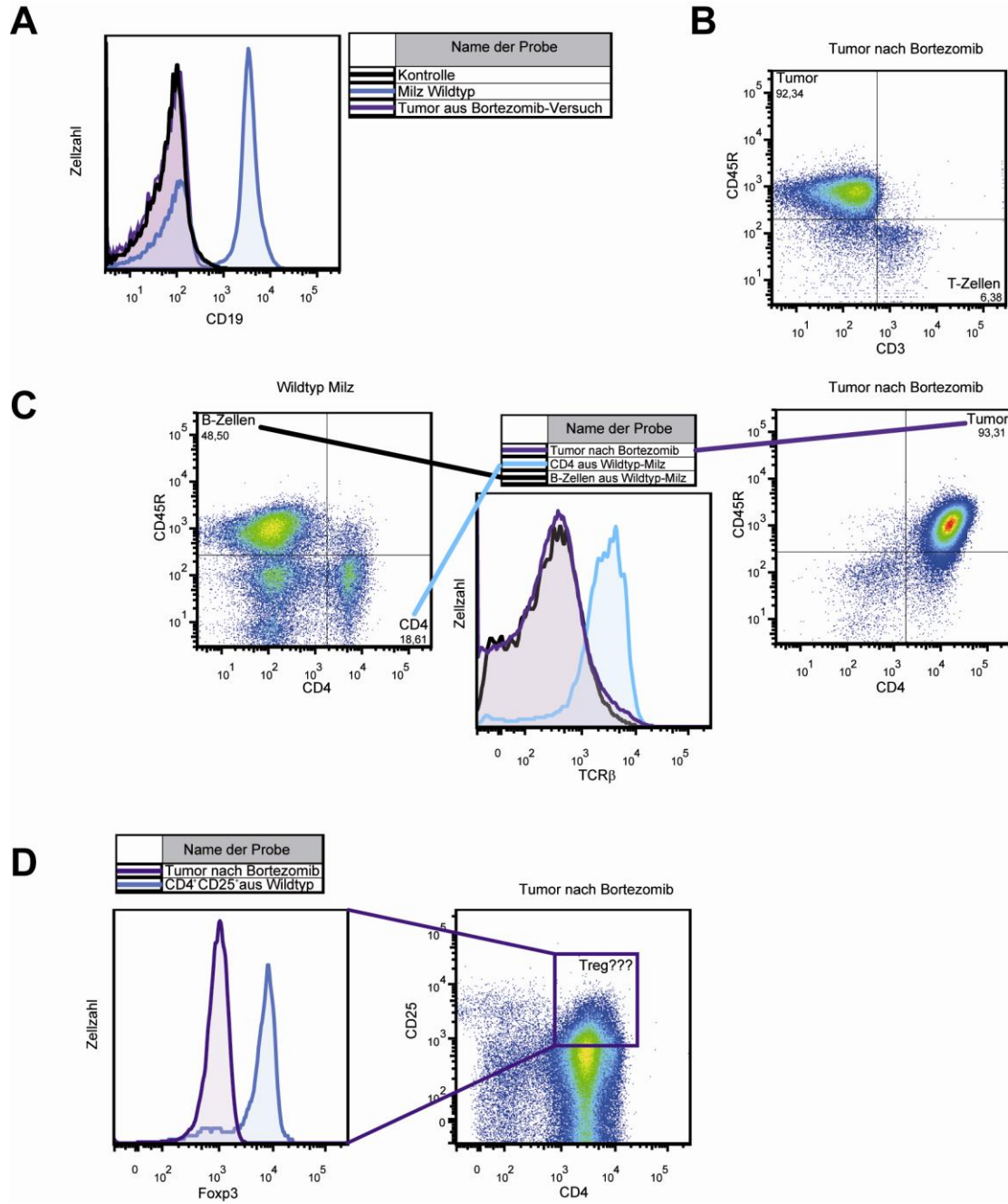


Abb. 3.21 Analyse eines Tumors, der in c-myc-Mäusen nach Behandlung mit Bortezomib auftrat. (A). Während Wildtyp-Milzzellen (hellblaue Linie) sich gut in B-Zellen und andere CD19⁺-Zellen unterscheiden lassen, tragen Tumorzellen (violett) kein CD19. (B) Die Tumorzellen tragen kein CD3, jedoch CD45R. (C) Tumorzellen tragen, obwohl positiv bezüglich CD4, keinen T-Zell-Rezeptor. (D) Obwohl Tumorzellen eine hohe CD25-Expression aufweisen, sind es keine Foxp3⁺-Treg.

3.2. T-Zellen

Die zum adaptiven Immunsystem zählenden T-Zellen üben ihre Immunantwort Antigen-abhängig aus. Die zwei wichtigsten Vertreter der T-Zellen sind die CD4⁺ T-Helferzellen und die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen.

3.2.1. T-Zell-Anteil und Verschiebung von CD4/CD8

Interessanterweise verändert sich die Absolutzahl von T-Zellen in der Milz praktisch nicht, hingegen ist in den Tumor-Lymphknoten eine massive Zunahme der Absolutzahl zu beobachten (Abb. 3.22 A).

Um die Veränderungen der T-Zell-Populationen genauer zu fassen, wurden Verhältnisse von CD4⁺/CD8⁺-Zellen gebildet. Dieses Verhältnis nimmt in der Milz leicht, allerdings nicht signifikant ($P=0,673$) ab, jedoch in Lymphknoten im Mittel leicht zu (ebenfalls nicht signifikant mit $P=0,330$). Bei Betrachtung der Lymphknoten erkrankter Tiere gibt es zwei Gruppen von Mäusen, die sich hinsichtlich ihres CD4/CD8-Verhältnisses deutlich unterscheiden (Abb. 3.22 B).

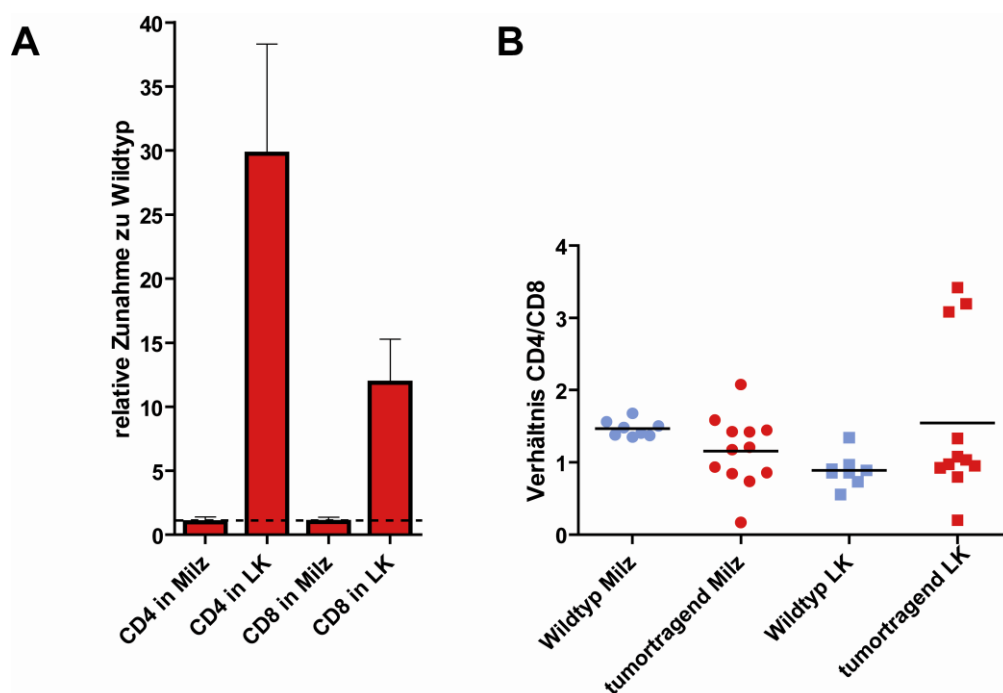


Abb. 3.22 T-Zellen im Spontantumormodel. (A) Während die Absolutzahl der T-Zellen in der Milz tumortragender Tiere praktisch konstant bleibt, nimmt die Anzahl relativ zu Wildtypetieren in den Lymphknoten massiv zu. Sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen zeigen diese Zunahme. (B) Das Verhältnis von CD4/CD8-Zellen verändert sich nur wenig bei tumortragenden Mäusen.

3.2.2. T-Zellen phänotypisch aktiviert

Ähnlich wie bei den NK-Zellen, so konnte auch in den T-Zell-Populationen bei kranken Tieren eine Aktivierung festgestellt werden. Zur Untersuchung der Aktivierung wurden die T-Zellen – aufgeteilt nach CD4⁺- und CD8⁺-Zellen – hinsichtlich ihrer Expression von CD44, CD62L und CD69 untersucht. Sowohl CD44 als auch CD69 waren in Milz und Lymphknoten der tumortragenden Tiere dabei durchweg erhöht (Abb. 3.23). Der Anstieg dieser beiden Marker war hierbei in der CD4⁺-Population und in den Lymphknoten jeweils noch stärker ausgeprägt als in CD8⁺-Zellen und der Milz. Neben der Zunahme dieser beiden Marker spricht ebenso die Abnahme von CD62L für die Aktivierung der T-Zellen.

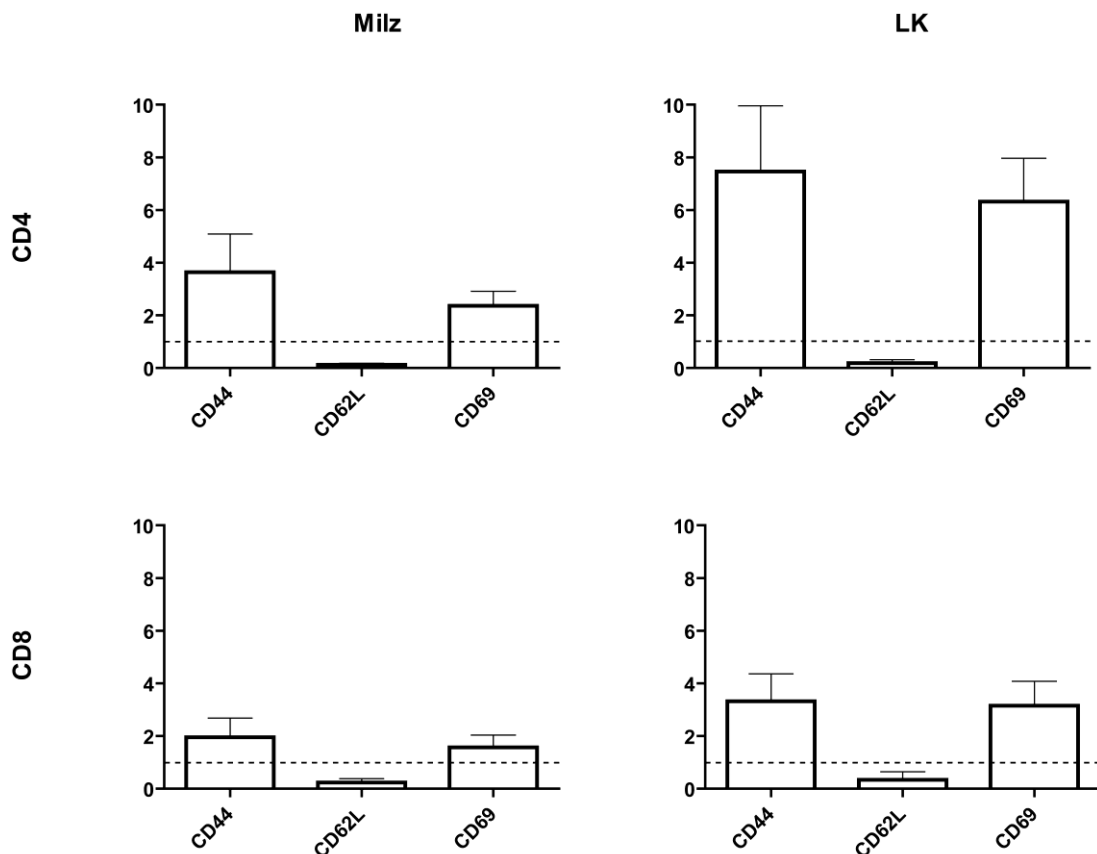


Abb. 3.23 Aktivierungsmarker auf T-Zellen in unterschiedlichen Geweben tumortragender Mäuse. Die Expression von CD44, CD62L und CD69 wurde bei 11 Tieren mittels Durchflusszytometrie bestimmt und jeweils zur Expression auf vergleichbaren Wildtyp-Kontrolltieren (gestrichelte Linie) in Relation gesetzt. Abgebildet sind die daraus gebildeten Mittelwerte und Standardabweichungen. Sowohl die Zunahme von CD44 und CD69 in Milz und Lymphknoten als auch die Abnahme von CD62L sprechen für eine Aktivierung sowohl der CD4⁺- als auch der CD8⁺-T-Zellen.

3.2.3. T-Zellen und IFN- γ

Nachdem NK-Zellen in tumortragenden Mäusen eine Einschränkung der Produktion von IFN- γ gezeigt hatten, wurden analoge Untersuchungen auch für die T-Zell-Populationen durchgeführt. In den lymphatischen Organen wurden die T-Zellen, aufgeteilt nach CD4⁺ und CD8⁺, sowohl durch intrazelluläre Proteinfärbung und anschließende Analyse im Durchflusszytometer als auch mittels RT-PCR untersucht. Dabei wurde sichtbar, dass beide T-Zell-Populationen in der Milz nicht in der Lage waren, IFN- γ in nennenswerter Weise zu produzieren. Im Gegensatz dazu und auch zu den NK-Zellen waren T-Zellen in den Lymphknoten besser in der Lage, IFN- γ zu synthetisieren, wie sich im Durchflusszytometer zeigte (nicht abgebildet). Sie enthielten auch wesentlich mehr Transkript für IFN- γ , wie in den PCR-Analysen gezeigt werden konnte (Abb. 3.24). Dabei waren die Verschiebungen gegenüber den entsprechenden Wildtyp-Populationen bei den Transkriptmengen noch deutlich ausgeprägter als die per Durchflusszytometer gemessenen Proteinmengen.

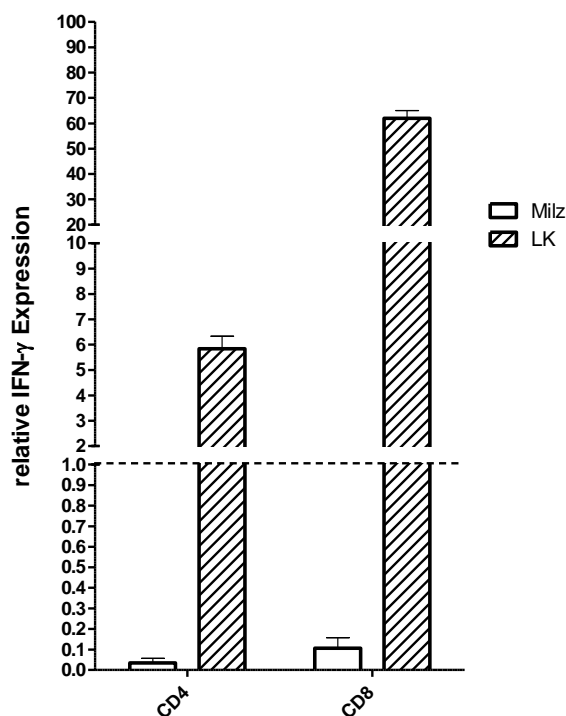


Abb. 3.24 Fähigkeit von T-Zellen im Spontantumormodell, IFN- γ zu bilden. Die Transkriptmengen für IFN- γ , bezogen auf *HPRT* und Wildtyp-Zellen, in T-Zellen differieren stark. Während in der Milz die Transkriptmengen in CD4⁺- und CD8⁺-Zellen vermindert sind, steigen sie in der Milz auf das 6-Fache bei CD4⁺-Zellen und das 62-Fache bei CD8⁺-Zellen an.

3.2.4. Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind im Organismus wichtig zur Suppression anderer T-Zellen. Sie werden benötigt, um die Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen sicherzustellen.

Neben den klassischen T-Zell-Populationen der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen wurden auch die regulatorischen T-Zellen im Spontantumormodell untersucht. Der Anteil regulatorischer T-Zellen in Mäusen mit sich entwickelndem Spontantumor war dabei durchweg höher als in Wildtyptieren. Während der Treg-Anteil in Milzen aus Wildtyptieren bei 2 % und in den Lymphknoten knapp darüber lag, war in den Milzen und Lymphknoten von c-myc-Tieren etwa ein doppelt so großer Treg-Anteil vorhanden (Abb. 3.25 A).

Regulatorische T-Zellen supprimieren nicht nur T-Zellen, sondern bilden auch eine Brücke zum angeborenen Immunsystem, indem sie unter anderem auch die NK-Zell-Aktivität unterdrücken. Neben den im Abschnitt 3.1 erwähnten Maßnahmen, die NK-Zell-Aktivität zu steigern, wurde deshalb auch versucht, die Immunantwort in c-myc-Mäusen durch Depletion von Treg zu beeinflussen.

Versuche, den Anteil von regulatorischen T-Zellen durch Gabe von anti-CD25-Ak zu vermindern, führten zu durchweg niedrigeren Werten (Abb. 3.25 B).

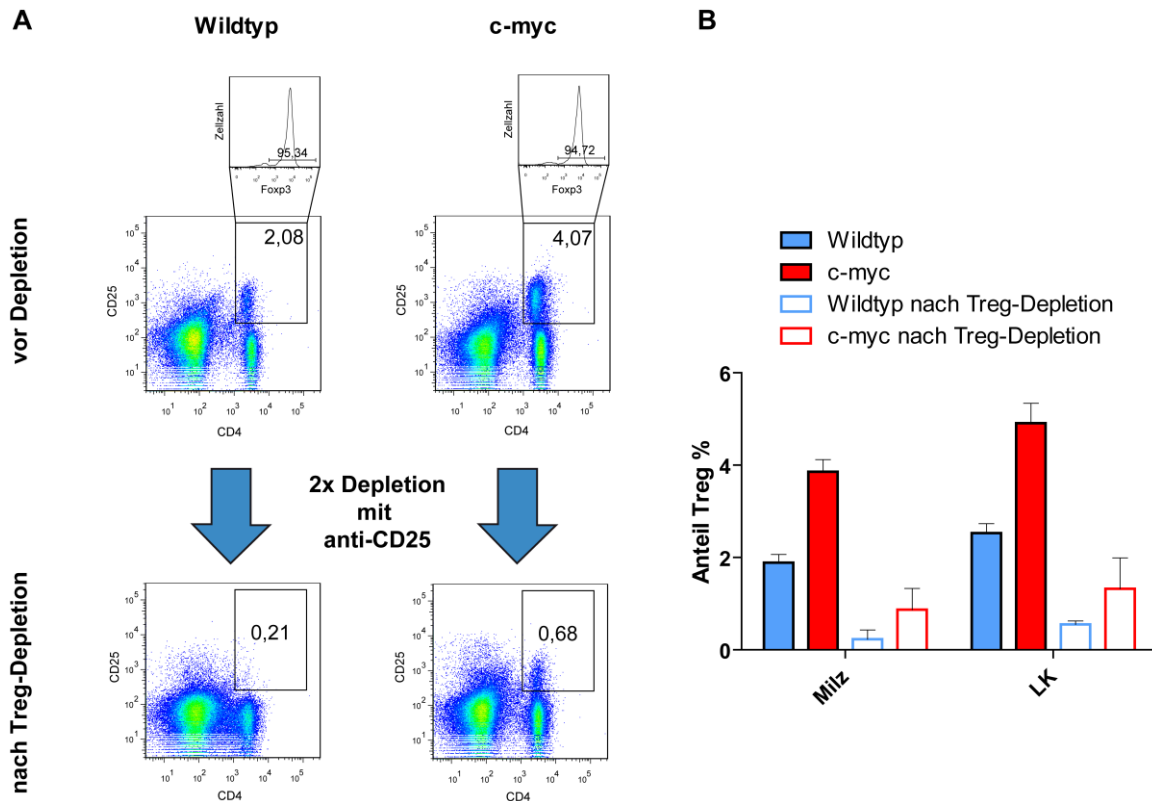


Abb. 3.25 Regulatorische T-Zellen in Wildtyp und c-myc-Mäusen. (A) Eine exemplarische FACS-Analyse in der Milz einer Wildtypmaus und einer c-myc-Maus ist gezeigt. Die CD4⁺/CD25⁺-Population wurde durch intrazelluläre Färbung von Foxp3 zu etwa 95% als Treg-Population identifiziert. Der Treg-Anteil in c-myc-transgenen Tieren war dabei stets um etwa den Faktor zwei höher als der von Wildtyp-tieren. Nach zweimaliger Depletion mit anti-CD25-Ak sind auch die Treg stark vermindert. Dazu ist wieder exemplarisch eine FACS-Analyse der Milzen von einer Wildtyp- und eine c-myc-Maus im unteren Teil der Abbildung zu sehen. (B) Zusammengefasste Messwerte aus 5-8 Tieren mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Die Depletion mit anti-CD25-Ak bewirkte eine deutliche Abnahme der Treg, wobei diese in c-myc-Tieren nicht ganz so deutlich war wie bei Wildtypen.

Die Behandlung von jungen noch unauffälligen c-myc-Mäusen mit anti-CD25-Ak zur Depletion von Treg führte zu einem deutlich längeren Überleben im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 3.26).

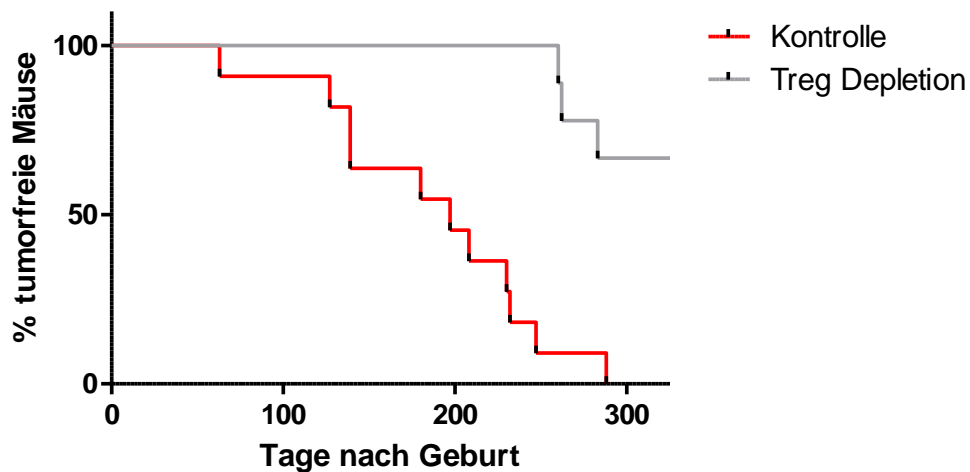


Abb. 3.26 Überlebenskurve von Mäusen unter Depletion der regulatorischen T-Zellen im Vergleich mit unbehandelten c-myc-Mäusen. Ab einem Alter zwischen 8 und 10 Wochen wurden c-myc-Mäuse fünfmal mit anti-CD25-Ak über einen Zeitraum von 3 Monaten behandelt, um die Treg-Population zu depletieren. Die Depletion der regulatorischen T-Zellen bewirkte einen deutlichen, signifikanten Überlebensvorteil der behandelten Tiere gegenüber unbehandelten c-myc-Kontrollen, die schnell Spontantumoren ausbilden.

3.3. Lösliche Faktoren

3.3.1. Th1/Th2-Zytokine

Die Zytokine bestehen aus einer Familie löslicher Proteine, die eine Fülle von Immunantworten sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems beeinflussen. Für die Bildung eines Zytokins kommen unterschiedliche Zellen als Quelle in Frage. Für die adaptive Immunantwort ist das vorhandene Zytokinmilieu in einem Organismus ein entscheidender Faktor. Zytokine vermitteln die Interaktion zwischen den Effektorfunktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Die Untersuchung von Seren aus Wildtyp-Mäusen, unauffälligen c-myc-Mäusen sowie tumortragenden c-myc-Mäusen diente dem Ziel, die Zytokinumgebung näher zu untersuchen. Aus den mittels Bioplex-Analyse erfassten Zytokinen wurden Mittelwerte gebildet, die zwischen den drei Gruppen verglichen wurden. Ein Anstieg wurde bei den Zytokinen IL-4, IL-5, IL-10 und GM-CSF beobachtet. Dagegen nahm TNF von Wildtyp- über unauffällige c-myc- zu tumortragenden c-myc-Mäusen hin ab (Abb. 3.27). Dieses Muster spricht für die Induktion einer T-Zell-Antwort in Th2-Richtung.

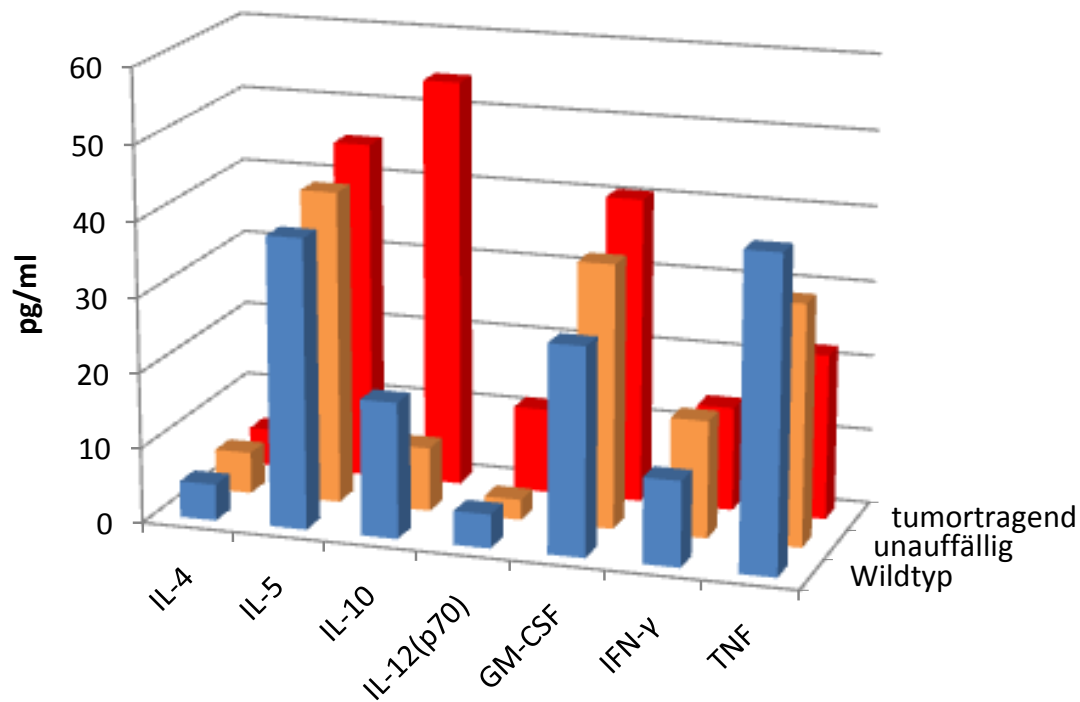


Abb. 3.27 Zytokine in Seren von Mäusen. Gemessen wurden 4-8 Tiere aus denen Mittelwerte gebildet wurden.

3.3.2. TGF- β nimmt in Serum und Treg ab

Im Zusammenhang mit regulatorischen T-Zellen (vgl. 3.2.4) von besonderer Bedeutung ist das Zytokin TGF- β . Es stellt einen maßgeblichen Faktor für die Induktion von regulatorischen T-Zellen dar. Die Bestimmung von TGF- β in Seren von tumortragenden Mäusen und Wildtyptieren mittels ELISA zeigte, dass mit 7500 pg/ml in tumortragenden Mäusen im Vergleich zu 12600 pg/ml in Wildtyptieren deutlich weniger (P = 0,0188) TGF- β zu finden war (Abb. 3.28).

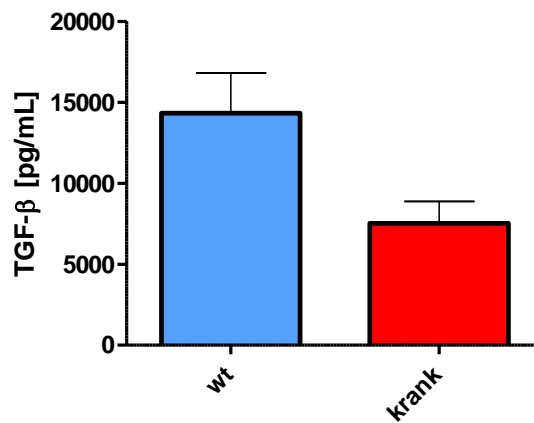


Abb. 3.28 TGF-β in Seren von Mäusen. Wildtypiere haben deutlich höhere Werte TGF-β im Serum als tumortragende c-myc-Tiere. Der Unterschied ist mit $P = 0,0188$ signifikant.

Als Quelle für TGF-β kommen vor allem regulatorische T-Zellen in Frage. Deshalb wurde in regulatorischen T-Zellen im Durchflusszytometer intrazellulär der Gehalt an TGF-β bestimmt (Abb. 3.29). Treg aus Lymphknoten von Wildtypmäusen zeigen höhere Werte an TGF-β als solche aus der Milz. Jedoch zeigen regulatorische T-Zellen aus tumortragenden c-myc-Mäusen bei beiden Organen geringere Werte von TGF-β.

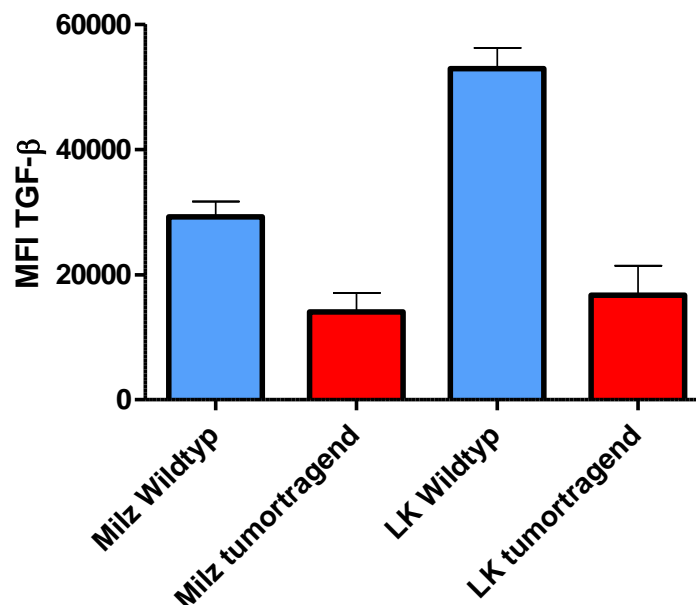


Abb. 3.29 Durchflusszytometrische Messung von TGF-β in regulatorischen T-Zellen. Treg aus tumortragenden Tieren zeigten stets niedrigere Werte an TGF-β als Wildtypmäuse.

3.3.3. Chemokine

Ähnlich den Zytokinen stellen die Chemokine (Chemotaktische Zytokine) eine große Familie strukturell verwandter Polypeptide dar. Ihre Hauptfunktion erfüllen die Chemokine als Lockstoffe, indem sie Leukozyten entgegen einem Konzentrationsgradienten an den Ort eines Immungeschehens anlocken können. Dabei wirken einige Chemokine gleichermaßen auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. So werden etwa sowohl T- als auch NK-Zellen durch die Chemokine CXCL9 und CXCL10 angelockt. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die in den Seren der untersuchten Mäuse gemessenen Chemokine während des Krankheitsverlaufs von unauffälligen zu tumortragenden Tieren ansteigen (Abb. 3.30). Die deutlichsten Zunahmen waren dabei bei CCL4 (4,8-fach) CXCL9 (3,6-fach) und CXCL10 (3-fach) zu verzeichnen. Die Akkumulation von NK- und T-Zellen in den Lymphknoten erkrankter Tiere (Abb. 3.1 A, Abb. 3.22 A) könnte also eine Reaktion auf die Ausschüttung von Chemokinen in diesen Bereichen sein.

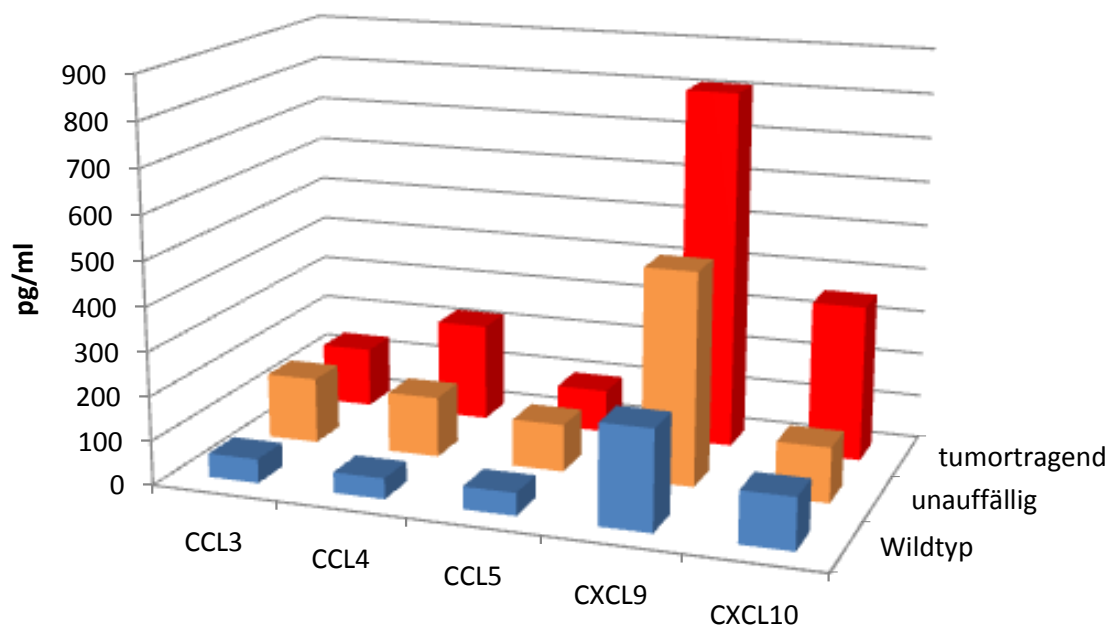


Abb. 3.30 Chemokine in Seren von Mäusen. Gemessen wurden die Seren von 4-8 Tieren mit anschließender Mittelwertbildung. Alle gemessenen Chemokine nehmen im Krankheitsverlauf zu.

4. Diskussion

4.1. Analyse der NK-Zellen im Spontan-Tumormodell

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass NK-Zellen eine Rolle in der Abwehr von Tumoren spielen [Übersicht in Ljunggren *et al.* 2007]. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht anhand eines Spontantumormodells, dass auch beim Lymphom NK-Zellen bei der Tumorabwehr beteiligt sind. Das Spontantumormodell hat gegenüber den transplantierbaren Tumormodellen wesentliche Vorteile. Die Entwicklung und der Verlauf der Tumorerkrankung können unter diesen Bedingungen im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen entarteter Zelle und Organismus untersucht werden.

Beeinträchtigung der NK-Zellen

Trotz vielfacher Anzeichen von Aktivierung (Abb. 3.2) sind die NK-Zellen in dem Modell nicht in der Lage, Zielzellen zu zerstören (Abb. 3.6) oder IFN- γ zu bilden (Abb. 3.4 und Abb. 3.5). Auch bei Tumorpatienten gibt es Berichte von unzureichender NK-Zell-Funktion. Als Beispiele seien die akute myeloische Leukämie [Costello *et al.* 2002] oder Kopf-Hals-Karzinome und das Mamma-Karzinom [Bauernhofer *et al.* 2003] genannt. Bei Tumortransplantationsversuchen in Mäusen zeigten sich teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Zwar wurde auch hier die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen gehemmt und die Maturierung beeinträchtigt, jedoch konnten NK-Zellen immer noch normale Zytotoxizität ausüben [Richards *et al.* 2006]. Andere Arbeiten beschreiben hingegen eine verminderte Lysefähigkeit nach Gabe von Leukämiezelllinien in Mäuse [Ebata *et al.* 2006].

In der Situation des Spontantumors war zu beobachten, dass die NK-Zellen bereits sehr früh bei klinisch noch unauffälligen Mäusen beeinträchtigt waren (Abb. 3.6). Die NK-Zell-Aktivität junger Mäuse, die noch ohne Anzeichen von Tumorerkrankung waren, war aber noch nicht komplett stillgelegt und konnte durch Behandlung mit CpG-ODN wieder auf das Niveau von Wildtyp-Mäusen angehoben werden (Abb. 3.10). Bei NK-Zellen aus Mäusen mit fortgeschrittenem Tumor war eine Reaktivierung nicht möglich.

Diese Entkopplung von Funktion und Phänotyp der NK-Zellen könnte durch Anergie als Folge der permanenten Aktivierung oder durch hemmende Einflüsse der Tumorzellen verursacht werden.

Entwicklungsstand der NK-Zellen

Es stellt sich außerdem die Frage nach dem Maturierungszustand der NK-Zellen, die im Tumor vermehrt vorkommen (Abb. 3.1). Der Entwicklungszustand von NK-Zellen kann anhand ihrer CD27-Expression bestimmt werden [Silva *et al.* 2008].

Dabei nimmt die Expression im Laufe der Entwicklung auf den NK-Zellen zu. NK-Zellen mit geringer CD27-Expression, wie sie auch in den Lymphknoten der erkrankten Tiere vermehrt gefunden wurden (Abb. 3.3), sind in ihrer lytischen Aktivität nicht effektiv [Hayakawa *et al.* 2006]. Andere Autoren berichten jedoch von vier Entwicklungsstufen bei murinen NK-Zellen, wobei hier neben CD27 auch CD11b berücksichtigt wird [Chiossone *et al.* 2009]. Nach diesen Daten entwickeln sich NK-Zellen von $CD11b^-/CD27^-$ über $CD11b^-/CD27^+$ und $CD11b^+/CD27^+$ zu $CD11b^+/CD27^-$. Die Analyse von CD27 ohne CD11b wäre demnach nicht geeignet, eine Aussage über den genauen Entwicklungsstand der NK-Zellen zu treffen.

Tumoreinfluss auf NK-Zellen

Um zu ermitteln, welchen Einfluss die Tumorzellen auf die Aktivierung der NK-Zellen haben, wurden Lymphomzellen aus tumortragenden Mäusen analysiert. Bei frühen Tumorstadien konnte eine Verringerung von MHC-Klasse-I-Molekülen um bis zu Faktor 20 im Vergleich zu Wildtyp-B-Zellen gemessen werden. Außerdem konnte ein bis zu 10-facher Anstieg von NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen detektiert werden [Brenner *et al.* 2010]. In fortschreitendem Tumorverlauf erhöhten die Tumorzellen die MHC-I-Expression und verloren die NKG2D-Liganden wieder. Da diese beiden Regulationsvorgänge geeignet sind, die Abwehr durch NK-Zellen zu unterdrücken, ist das ein Hinweis auf einen Immunevasions-Mechanismus [Waldhauer *et al.* 2008], der für die Beteiligung von NK-Zellen an der Abwehr spricht.

Eine Aussage zum Beitrag von vermindertem MHC-I und erhöhter NKG2D-Ligand-Expression ergibt sich aus Korrelationen zu dem jeweiligen Aktivierungszustand von NK-Zellen. So konnte gezeigt werden, dass die Verminderung von MHC-I auf Tumorzellen mit einer Aktivierung von NK-Zellen korreliert. Hingegen besteht keine Korrelation zwischen NKG2D-Liganden auf Tumoren und der NK-Zell-Aktivierung [Brenner *et al.* 2010].

Immunevasion des Tumors

Diese Befunde weisen darauf hin, dass für die Aktivierung von NK-Zellen primär der Verlust von MHC-I auf den Tumorzellen verantwortlich ist. Da in späteren Tumorstadien aber sowohl MHC-I wieder hoch- und NKG2D-Liganden herunterreguliert werden, kommen beide Änderungen als Immunevasionsmechanismus in Frage.

Die Verminderung von NKG2D-Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen ist ein Tumorevasionsmechanismus, der z.B. auch das humane Melanom dem Einfluss von NK-Zellen entzieht [Fuertes *et al.* 2008]. Andererseits führt bei Tumorpatienten die Ausschüttung von löslichen NKG2D-Liganden auch zur Abnahme von NKG2D auf NK-Zellen und damit zu einem Schutz der Tumorzellen vor NK-Zell-vermittelter Lyse [Groh *et al.* 2002; Salih *et al.* 2003]. Im Fall des untersuchten Modells konnten keine löslichen Liganden für NKG2D gefunden werden (Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Für die Modulation von NKG2D auf den NK-Zellen ist vielmehr direkter Zellkontakt zwischen NK-Zellen und Tumorzellen nötig (Abb. 3.15). Ähnliche Befunde lassen sich auch aus anderen Arbeiten ableiten, die in transgenen Mausmodellen humane NKG2D-Liganden oder NKG2D-Ligand-exprimierende Tumorzellen verwendeten [Coudert *et al.* 2005; Epling-Burnette *et al.* 2007; Oppenheim *et al.* 2005; Wiemann *et al.* 2005]. Auch in diesen Modellen wurden eine Abregulation von NKG2D auf NK-Zellen und ein damit einhergehender Verlust der Aktivität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen gefunden. Eine Abhängigkeit der Tumorüberwachung von NKG2D-Liganden wurde auch durch ein anderes Spontantumormodell der Prostata bzw. lymphatischer Organe gezeigt [Guerra *et al.* 2008]. Dabei resultierte die Abwesenheit von NKG2D in einem schnelleren Tumorwachstum. Die Identifizierung als Immunevasionsmechanismus gelang den Autoren allerdings nur im Prostata-Karzinom-Modell.

Zwei-Schritt-Aktivierung von NK-Zellen

Da, wie bereits erwähnt, die NKG2D-Ligand-Expression auf Tumorzellen nicht mit der Aktivierung von NK-Zellen korreliert war, kann es sich bei NKG2D nur um ein sekundäres Signal handeln.

Die These einiger Autoren, dass zur Aktivierung von NK-Zellen ein sogenanntes „Priming“-Signal unumgänglich ist und dafür Zytokine wie IL-15 [Lucas *et al.* 2007] oder die Vermittlung von DC [Chaix *et al.* 2008] benötigt wird, haben andere Autoren

dahingehend erweitert, dass zwei Schritte zur Aktivierung von NK-Zellen nötig sind [North *et al.* 2007]. Sie postulieren, dass ruhende NK-Zellen über mindestens zwei verschiedene Rezeptoren aktiviert werden müssen und damit zwei Schritte – „Priming“ und „Triggering“ – verbunden sind. Als Vermittler für das „Priming“ nennen sie IL-2 und als Rezeptoren für das „Triggering“ die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren. Durch Umgehung eines dieser beiden Schritte kann es Tumorzellen gelingen, der Immunantwort im Sinne eines Evasions-Mechanismus zu entkommen.

Im hier untersuchten Spontantumor-Modell stellt sich die Situation analog zu dieser Zwei-Schritt Hypothese dar. Zwar korreliert die MHC-I-Expression von Tumorzellen mit der phänotypisch gemessenen Aktivierung von NK-Zellen und ist hierfür notwendig, aber nicht hinreichend [Brenner *et al.* 2010]. Zusätzlich zu der ersten Voraussetzung muss noch ein zweites Signal vorhanden sein, dass über NKG2D-Liganden vermittelt wird. Über den reinen Verlust von MHC-I hinaus, bedürfen die NK-Zellen also eines weiteren Aktivierungssignals [Watzl 2003], das sie durch NKG2D-Liganden erhalten.

Therapeutischer Eingriff in das NKG2D-Signal

Ein möglicher Therapieansatz besteht deshalb darin, Tumorzellen so zu beeinflussen, dass sie eine für das „Triggering“ von NK-Zellen ausreichende Expression von NKG2D-Liganden aufweisen. Diese Wirkung kann durch Proteasomen-Inhibitoren [Vales-Gomez *et al.* 2008] erreicht werden. Für den Proteasomen-Inhibitor Bortezomib (Abb. 2.1) wurde schon für verschiedene Tumorklinien eine Erhöhung von NKG2D-Liganden gezeigt [Armeanu *et al.* 2008]. Es gibt aber auch einen Bericht, der zeigt, dass Zellen nach nur kurzzeitiger (24 h) Inkubation mit Bortezomib nicht anfälliger für NK-Zell-vermittelte Lyse waren [Hallett *et al.* 2008].

Bei Versuchen mit humanen Zellen scheint Bortezomib vor allem den NKG2D-Liganden ULBP1 (UL-16-Bindendes-Protein-1) hochzuregulieren [Butler *et al.* 2009].

Unterschiedliche Liganden scheinen also verschieden reguliert zu sein. Welche der bisher bekannten NKG2D-Liganden [Eagle *et al.* 2007] beim verwendeten Tumormodell involviert sind, wurde in der Arbeit nicht untersucht, könnte aber in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden. Offensichtlich werden die NKG2D-Liganden durch Stress und andere Stimuli auf Ebene der RNS reguliert [Spies 2008].

In den hier gezeigten Untersuchungen wurde durch Bortezomib sowohl die NKG2D-Expression auf den aus dem Tumormodell generierten Zelllinien erhöht (Abb. 3.17) als auch die Lysierbarkeit durch NK-Zellen verstärkt (Abb. 3.18).

Ein Therapieversuch mit niedrigen Dosen Bortezomib bewirkte ein verlängertes Überleben der c-myc-transgenen Mäuse (Abb. 3.20). Trotzdem entwickelten behandelte Tiere nach einiger Zeit Tumoren. Die Analyse dieser Tumoren zeigte einige Auffälligkeiten. Waren die Tumoren des Spontan-Tumormodells sonst, wie zu erwarten (2.3), aus der B-Zell-Reihe abgeleitet und exprimierten CD19, so sind bei den Tumorzellen, die sich unter Bortezomib-Behandlung entwickelten, vor allem die fehlende CD19-Expression sowie die CD4-Expression bemerkenswert (Abb. 3.21). Die weitere Analyse der Tumorzellen zeigte zwar, dass es sich offensichtlich nicht um CD4-T-Zellen handelt, da die Tumoren weder CD3 noch einen T-Zell-Rezeptor tragen. Es konnte aber nicht abschließend geklärt werden, warum die Zellen die CD19-Expression verloren hatten und ob es sich sicher um ein B-Zell-Lymphom handelte. Dafür spricht aber die mögliche Erklärung, dass entartete B-Zellen zu Beginn der Erkrankung noch eliminiert werden konnten und erst spätere Stadien der B-Zellen, welche zwar kein CD19, dafür aber CD45R tragen, rasch genug proliferieren konnten um, ein voll entwickeltes Lymphom sichtbar werden zu lassen. Die Frage der CD4-Expression auf den Tumoren bleibt dennoch ungeklärt.

Zytotoxizität von NK-Zellen aus Kokulturversuchen

Die Frage nach der Zeit, in der NK-Zellen durch Tumorzellen anergisiert werden können, wurde durch eine Kinetik von Zytotoxizitätsversuchen nach Kokultur von Wildtyp-NK-Zellen mit Tumorzellen beantwortet (3.1.5 und Abb. 3.7). Als Folge des Absterbens von NK-Zellen *in vitro* nehmen die Lyseraten mit der Zeit insgesamt ab. Mit Tumorzellen kokultivierte NK-Zellen zeigen nach einiger Zeit über dieses Maß hinaus verminderte Lyseraten. Offensichtlich induzieren die Tumorzellen die Anergie in NK-Zellen. Dosisabhängig wurde dieser Effekt auch für NK-Zellen in der Peritonealhöhle von Mäusen beschrieben [Das *et al.* 2002].

Um auch die Übertragbarkeit des funktionellen Defizits von anergen NK-Zellen aus tumortragenden Mäusen auf funktionale Wildtyp-NK-Zellen zu untersuchen, wurden weitere Kokulturversuche unternommen. Hierbei wurden keine Hinweise auf eine

Beeinträchtigung der Zytotoxizität normaler NK-Zellen durch Tumor-NK-Zellen gefunden (Abb. 3.9).

Therapeutische Aktivierung von NK-Zellen

Die Zytotoxizität der NK-Zellen klinisch unauffälliger Mäuse war zwar beeinträchtigt, konnte aber *in vitro* durch Stimulation mit CpG-ODN wiederhergestellt werden (Abb. 3.10). Eine Behandlung junger Mäuse mit CpG-ODN *in vivo* über mehrere Wochen zeigte ein statistisch signifikant längeres Überleben behandelter Tiere (Abb. 3.11). Bisher ging man vielfach davon aus, dass CpG-ODN NK-Zellen vor allem über DC aktivieren [Ballas 2007]. Nur in einem einzelnen Bericht [Roda *et al.* 2005] wurde die direkte Aktivierung von NK-Zellen durch CpG-ODN aufgezeigt. Bei einer Untersuchung verschiedener TLR-Agonisten wurde für CpG-ODN die beste antitumoröse Wirksamkeit beschrieben [Sharma *et al.* 2008], weshalb CpG als potente Tumorthérapeutika [Vollmer *et al.* 2009] und Immunstimulanzien [Weiner *et al.* 1997] vorgeschlagen wurden. Allerdings besteht unter Behandlung mit TLR-Agonisten für Tumoren auch die Möglichkeit für bisher nicht bekannte Evasionsmechanismen, da es Hinweise darauf gibt dass auch Tumorzellen TLR exprimieren können [Huang *et al.* 2005]. Damit könnten diese Tumorzellen TLR-Liganden abfangen oder sogar selbst durch die Liganden im Wachstum gefördert werden.

Die NK-Zell-Abhängigkeit des Therapieerfolgs durch CpG-ODN-Behandlung konnte demonstriert werden, indem NK-Zellen zeitgleich zur Behandlung depletiert wurden (Abb. 3.11). Dabei ging der überlebensverlängernde Effekt verloren.

Eine weitere Möglichkeit, die NK-Zellen initial zu aktivieren, besteht in der Gabe von DC [Adam *et al.* 2005]. Nach DC-Immunisierung zeigen NK-Zellen, die *ex vivo* untersucht wurden, deutliche Aktivierungszeichen (Abb. 3.12) und erhöhte Zytotoxizität (3.1.7). Der Vergleich von CpG-Gaben und DC-Immunisierungen zeigt *in vivo* (Abb. 3.11) eine vergleichbare Verlängerung des tumorfreien Überlebens der c-myc-transgenen Tiere.

NK-Zell-Gedächtnis

Als Vertreter des angeborenen Immunsystems sind NK-Zellen nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Dennoch mehren sich seit einiger Zeit

Veröffentlichungen, in denen davon berichtet wird, dass NK-Zellen eine Art Gedächtnis bilden können. Neben den klassischerweise von T-Zellen vermittelten Immunreaktionen vom Typ IV konnte auch eine Beteiligung von NK-Zellen bei verzögerten Immunreaktionen gezeigt werden [Yokoyama 2006]. Ebenso konnte in Modellen viraler Infektion gezeigt werden, dass NK-Zellen ein Gedächtnis aufbauen können, um bei einer zweiten Infektion unter schneller Proliferation verbleibender Gedächtnis-NK-Zellen einen schnellen Schutz vor den Erregern zu bilden [Sun *et al.* 2009; Ugolini *et al.* 2009]. Falls NK-Gedächtnis-Zellen auch bei Tumorerkrankungen eine Rolle spielen sollten, hätte dies Konsequenzen für neue Ansätze einer möglichen adoptiven Immuntherapie mit NK-Zellen.

Übertragbarkeit auf humane NK-Zellen

Insgesamt herrscht derzeit noch keine Einigkeit, inwiefern NK-Zellen aus der Maus mit NK-Zellen im Menschen direkt vergleichbar sind und sich basale Experimente dadurch direkt auf die klinische Situation übertragen lassen. Zwar existieren viele Parallelen in den Organismen, vor allem was die Ausstattung an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen angeht [Lanier 2005; Walzer *et al.* 2007], jedoch bestehen bezüglich der Eigenschaften von NK-Zellen auch Unterschiede zwischen den Spezies [Colucci *et al.* 2002]. So ist etwa die Einteilung humaner NK-Zellen in CD56^{bright} und CD56^{dim} ein Aspekt, der sich nicht ohne weiteres auf die murine Situation übertragen lässt. Andere Autoren haben aber vorgeschlagen, stattdessen CD127 als Unterscheidungsmerkmal für diese NK-Zell-Populationen heranzuziehen. Nach ihren Untersuchungen lassen sich durch CD127, sowohl im Menschen als auch in der Maus, zwei Populationen von NK-Zellen unterscheiden, deren Eigenschaften denen der zwei CD56-Populationen im Menschen vergleichbar sind [Vosshenrich *et al.* 2006].

4.2. Bedeutung regulatorischer und anderer T-Zellen sowie löslicher Faktoren

Veränderungen der T-Zellen

Wie die Untersuchungen in dem Spontan-Tumormodell zeigten, sind auch die T-Zellen in den Tumorlymphknoten vermehrt (Abb. 3.22 A) und zeigen phänotypische

Aktivierungszeichen (Abb. 3.23). Trotz dieser Aktivierung und Zunahme sind auch die T-Zellen unfähig, das Tumorwachstum zu unterbinden. Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Rolle der NK-Zellen aufgezeigt. Im Zusammenhang mit den T-Zellen ergeben sich weitere Fragen. So sind für Tumoren im Zentralnervensystem Fälle beschrieben [Prins *et al.* 2006], in denen CD4-Zellen gemeinsam mit NK-Zellen für die Tumorabwehr verantwortlich sind. Wenn jedoch schon die zuerst stattfindende Antwort des angeborenen Immunsystems lahmgelegt ist, ist es fraglich, ob das adaptive Immunsystem überhaupt noch adäquat auf eine Bedrohung in Form eines sich entwickelnden Tumors reagieren kann.

Wie in Abb. 3.22 B gezeigt, ändert sich in den tumortragenden Tieren das Verhältnis der CD4- zu den CD8-Zellen in den Lymphknoten. Hierbei ist besonders auffällig, dass es offensichtlich zwei Gruppen unter den tumortragenden Mäusen gibt. Während eine Gruppe kaum eine Veränderung des CD4/CD8-Verhältnisses zeigt, steigt dieses Verhältnis in der anderen Gruppe an. Die letzte Gruppe stellt nur eine Minderheit in den erkrankten Tieren dar, so dass hier nicht genügend Daten für eine weitere Analyse gesammelt werden konnten. Der Anstieg im CD4/CD8-Verhältnis könnte sowohl auf einer erhöhten Einwanderung oder Proliferation von CD4-Zellen in den Lymphknoten oder einer verminderter Einwanderung und/oder Proliferation von CD8-Zellen im Vergleich zu anderen kranken Tieren begründet sein. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass auch CD8-Zellen einen regulatorischen Phänotyp entwickeln können und dadurch die anderen CD8-Zellen in Ihrer Proliferation hemmen, wie in einem Prostatamodell gezeigt werden konnte [Shafer-Weaver *et al.* 2009].

Regulatorische T-Zellen und TGF- β

Die Anzahl regulatorischer T-Zellen in tumorösen Mäusen war stets um etwa den Faktor zwei erhöht (Abb. 3.25). Auch in anderen Modellen wurden vielfach erhöhte Konzentrationen von regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe gefunden [Zhou *et al.* 2009]. Teilweise war eine Änderung der Anzahl an Treg auch von der Lokalisation des Tumors abhängig [Biollaz *et al.* 2009]. Die erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Tumor korreliert mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung [Menetrier-Caux *et al.* 2009].

Eine Schlüsselrolle im Zusammenhang mit regulatorischen T-Zellen nimmt TGF- β ein [Wan *et al.* 2007]. Einerseits induziert TGF- β regulatorische T-Zellen [Fantini *et al.* 2004], zum anderen nutzen regulatorische T-Zellen selbst TGF- β als eine von verschiedenen Möglichkeiten, um ihre suppressive Funktion auszuüben.

Zu den Mechanismen der Suppression durch Treg [Sakaguchi *et al.* 2009] gehören daneben die Sekretion von IL-10 [Larmonier *et al.* 2007] und die damit verbundene Unterdrückung der DC-Reifung [Grauer *et al.* 2008]. Neben der Suppression einer T-Zell-Antwort interagieren regulatorische T-Zellen auch auf vielfältige Weise mit NK-Zellen [Zimmer *et al.* 2008]. Dabei inhibieren zum einen Treg die NK-Zellen [Smyth *et al.* 2006], umgekehrt können auch NK-Zellen die Bildung von Treg IFN- γ -abhängig verhindern [Brillard *et al.* 2007].

Trotz der auch in der vorliegenden Arbeit gezeigten Zunahme von regulatorischen T-Zellen und den funktionellen Defekten von NK-Zellen in den tumortragenden Tieren waren die im Serum von kranken Mäusen gemessenen Konzentrationen an TGF- β stark vermindert (Abb. 3.28). Auch die in regulatorischen T-Zellen intrazellulär gemessenen Werte sind vermindert (Abb. 3.29).

Berücksichtigt man, dass sich die Anzahl regulatorischer T-Zellen in tumortragenden Tieren einerseits etwa verdoppelt hat (3.2.4) und die darin intrazellulär bestimmten Werte an TGF- β andererseits mehr als halbiert sind (Abb. 3.29), so kann die Abnahme von freiem TGF- β im Serum nicht durch eine Erhöhung der intrazellulären Menge an TGF- β in Treg erklärt werden.

In den meisten Berichten sind erhöhte Mengen TGF- β in Tumoren gezeigt worden [Tada *et al.* 1991]. Dies steht im Widerspruch zu den gefundenen Daten. Als Lösungsansatz kommt in Betracht, dass die TGF- β -Konzentration im lokalen Tumormilieu höher sein kann. Hierfür kommen verschiedene Zellen als Produzenten in Frage.

Auch apoptotische Tumorzellen selbst sind in der Lage, Membran-gebundenes TGF- β zu bilden und dadurch eine Suppression von CD8-Antworten und regulatorischen T-Zellen zu induzieren [Xie *et al.* 2009]. Dieses Membran-gebundene TGF- β kann die beschriebenen Effekte auslösen, ohne im Serum gelöst und dadurch detektierbar zu sein. Ferner wäre zu betrachten, ob im Verlauf der Tumorentstehung nicht eine temporär erhöhte Konzentration von TGF- β zur Induktion von Treg führt, die Treg aber später über andere Mechanismen ihre suppressive Wirkung entfalten können.

Andere Zellen, die weder dem Tumor entstammen noch zum Immunsystem gehören, kommen ebenfalls als Quelle für TGF- β in Frage. Für Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass sie durch Sekretion von TGF- β NK-Zellen hemmen können [Kopp *et al.* 2009]. Dieser Effekt wurde über eine Abregulation von NKG2D auf den NK-Zellen vermittelt, wie sie auch im untersuchten Spontan-Tumormodell gezeigt wurde (Abb. 3.2).

Therapeutische Depletion der regulatorischen T-Zellen

Neben ihrer suppressiven Funktion gegenüber T-Zellen kontrollieren regulatorische T-Zellen die Interaktion von DC und NK-Zellen [Terme *et al.* 2008], indem sie die NK-Zellen inhibieren. Die Depletion von regulatorischen T-Zellen wurde als möglicher Therapieansatz genannt [Sutmuller *et al.* 2001] und auch in unserem Modell durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikant verlängertes Überleben von Mäusen, in denen mittels anti-CD25-Ak die Treg depletiert wurden (Abb. 3.26). Nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in gesunden Mäusen wurde eine um etwa den Faktor 4-7 erhöhte Anzahl von NK-Zellen in den lymphatischen Organen gefunden [Kim *et al.* 2007]. Wünschenswert wäre für eine klinische Anwendung eine spezifische Depletion der regulatorischen T-Zellen nur im Tumor, um dort die Immunantwort zu erhöhen, aber ohne eine systemische Aktivierung von T- und NK-Zellen, die zu Autoimmunerkrankungen führen könnte.

Als ein Nebeneffekt von Bortezomib ist die Induktion von regulatorischen T-Zellen beschrieben worden [Blanco *et al.* 2009]. Andere Gruppen arbeiten in Modellversuchen deshalb mit Kombinationen aus NK-Zell-Transfer unter gleichzeitiger Gabe von Bortezomib und zusätzlicher Treg-Depletion [Lundqvist *et al.* 2009]. Diese Kombination wurde als mögliche Therapie gegen Krebs vorgeschlagen.

Zytokine und Chemokine

Von den beobachteten Veränderungen der gemessenen Zytokine im Serum (Abb. 3.27) ist die Zunahme von IL-10 bei erkrankten Tieren die am höchsten ausgeprägte. Wie bereits diskutiert, kommen als Quelle dafür insbesondere regulatorische T-Zellen in Frage [Larmonier *et al.* 2007]. IL-10 übt einen suppressiven Effekt auf T-Zellen aus und beeinflusst die Differenzierung von DC.

Bei den ebenfalls im Serum gemessenen Chemokinen stiegen im Verlauf der Tumorprogression die Konzentrationen vor allem von CXCL9 und CXCL10 an (Abb. 3.30). Diese Chemokine locken sowohl T-Zellen als auch NK-Zellen an und leiten sie gegen einen Konzentrationsgradienten an den Ort der Chemokinausschüttung [Luster 2002]. Es kann angenommen werden, dass diese Chemokine in den Tumorlymphknoten entstehen, und dass dadurch die erhöhten Zahlen von NK- und T-Zellen (Abb. 3.1 A und Abb. 3.22 A) zu erklären sind.

4.3. Ausblick

Die Untersuchungen im Serum ergaben einen ersten Einblick in das Zytokinprofil der tumortragenden Mäuse. Für das Verständnis der Zusammenhänge wäre es sinnvoll, noch weitere Zytokine zu bestimmen und auch die Zellen aufzufindig zu machen, welche jeweils die Quelle dieser Zytokine sind. Zum Beispiel könnten immunhistologische Färbungen von Tumorlymphknoten Aufschluss geben, welche Zellen für die Bildung des Zytokinmilieus im Tumor verantwortlich sind. Auch sollte dabei beachtet werden, dass es im Laufe der Tumorentwicklung zu Änderungen in den beteiligten Zytokinen kommen kann.

Auch der Einfluss einiger Chemokine in den Seren erkrankter Tiere wurde in dieser Arbeit erörtert (Abb. 3.30). Diese Untersuchungen sollten ebenfalls auf die Lymphknoten ausgedehnt und möglicherweise um zusätzliche Chemokine erweitert werden, um so festzustellen, wie der beobachtete Anstieg an NK- und T-Zellen in den Tumorlymphknoten zu erklären ist und welche Chemokine dafür verantwortlich sind. Proliferationsuntersuchungen könnten zusätzlich zeigen, ob neben einer Migration in den Tumor auch die Vermehrung der Zellen am Ort des Geschehens von Bedeutung ist.

Zwar konnte durch die Behandlung junger Tiere mit DC eine Verlängerung des tumorfreien Überlebens erreicht werden (Abb. 3.11), und es konnte die Aktivierung von NK-Zellen durch DC demonstriert werden (Abb. 3.12), über die Rolle der endogenen DC im verwendeten Spontan-Tumormodell ist aber noch nichts bekannt. Dabei wäre durch die vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten, die DC haben, gerade diese Zellpopulation für künftige Untersuchungen von Interesse. Es sollte geklärt werden, ob die DC mit der Tumorentwicklung möglicherweise ähnlich den NK-Zellen funktionelle Defizite erleiden.

Zusätzlich kommen DC als Produzenten für verschiedene Zytokine, wie etwa die suppressiv wirksamen Stoffe TGF- β und IL-10, in Frage. Auch die gegenseitige Beeinflussung von DC und Treg bietet Anlass für weitere Nachforschungen.

Die aufgezeigten Strategien zur Behandlung des Spontantumors (CpG-Behandlung Abb. 3.11, Bortezomib-Behandlung Abb. 3.20, Treg-Depletion Abb. 3.26) zeigen Erfolge, die weiter optimiert werden könnten. Eine Verbesserungsmöglichkeit ergibt sich aus der Kombination verschiedener Therapieansätze. Ein erster Schritt dazu war die bereits durchgeführte Kombination von DC-Immunisierung unter gleichzeitiger Behandlung mit Bortezomib (Abb. 3.19).

Durch die gezeigte Bedeutung der NK-Zellen im untersuchten Modell bieten sich nicht nur neue Einblicke in die Regulation deren Aktivierung [Brenner *et al.* 2010], sondern auch neue Ansätze für eine Behandlung mit NK-Zellen. So könnten etwa NK-Zellen, die *ex vivo* z.B. durch CpG-ODN (Abb. 3.10) stimuliert wurden, in kranke Tiere transferiert werden, um so einen verbesserten Schutz vor den sich entwickelnden Lymphomen zu bieten.

5. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K. & A. H. Lichtman (2005). **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia, PA, Saunders.
- Ada, G. (1994). **Twenty years into the saga of MHC-restriction**. *Immunol Cell Biol* 72(6): 447-454.
- Adam, C., S. King, T. Allgeier, H. Braumüller, C. Lüking, J. Mysliwicz, A. Kriegeskorte, D. H. Busch, M. Röcken & R. Mocikat (2005). **DC-NK cell cross talk as a novel CD4⁺ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction**. *Blood* 106(1): 338-344.
- Akira, S., K. Takeda & T. Kaisho (2001). **Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity**. *Nat Immunol* 2(8): 675-680.
- Armeanu, S., M. Krusch, K. M. Baltz, T. S. Weiss, I. Smirnow, A. Steinle, U. M. Lauer, M. Bitzer & H. R. Salih (2008). **Direct and natural killer cell-mediated antitumor effects of low-dose bortezomib in hepatocellular carcinoma**. *Clin Cancer Res* 14(11): 3520-3528.
- Ballas, Z. K. (2007). **Modulation of NK cell activity by CpG oligodeoxynucleotides**. *Immunol Res* 39(1-3): 15-21.
- Bauernhofer, T., I. Kuss, B. Henderson, A. S. Baum & T. L. Whiteside (2003). **Preferential apoptosis of CD56^{dim} natural killer cell subset in patients with cancer**. *Eur J Immunol* 33(1): 119-124.
- Biollaz, G., L. Bernasconi, C. Cretton, U. Puntener, K. Frei, A. Fontana & T. Suter (2009). **Site-specific anti-tumor immunity: differences in DC function, TGF- β production and numbers of intratumoral Foxp3⁺ Treg**. *Eur J Immunol* 39(5): 1323-1333.
- Bird, A. P. (1980). **DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA**. *Nucleic Acids Res* 8(7): 1499-1504.
- Blanco, B., J. A. Perez-Simon, L. I. Sanchez-Abarca, T. Caballero-Velazquez, S. Gutierrez-Cossio, P. Hernandez-Campo, M. Diez-Campelo, C. Herrero-Sanchez, C. Rodriguez-Serrano, C. Santamaria, F. M. Sanchez-Guijo, C. Del Canizo & J. F. San Miguel (2009). **Treatment with bortezomib of human CD4⁺ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population**. *Haematologica* 94(7): 975-983.
- Bornkamm, G. W. (2009). **Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers**. *Int J Cancer* 124(8): 1745-1755.

Brenner, C. D., S. King, M. Przewoznik, I. Wolters, C. Adam, G. W. Bornkamm, D. H. Busch, M. Rocken & R. Mocikat (2010). **Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells.** Eur J Immunol 40(2): 494-504.

Brillard, E., J. R. Pallandre, D. Chalmers, B. Ryffel, A. Radlovic, E. Seilles, P. S. Rohrlich, X. Pivot, P. Tiberghien, P. Saas & C. Borg (2007). **Natural killer cells prevent CD28-mediated Foxp3 transcription in CD4⁺CD25⁻ T lymphocytes.** Exp Hematol 35(3): 416-425.

Burkitt, D. (1958). **A sarcoma involving the jaws in African children.** Br J Surg 46(197): 218-223.

Burnet, M. (1957). **Cancer; a biological approach. I. The processes of control.** Br Med J 1(5022): 779-786.

Busch, D. H., I. M. Pilip, S. Vijh & E. G. Pamer (1998). **Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection.** Immunity 8(3): 353-362.

Butler, J. E., M. B. Moore, S. R. Presnell, H. W. Chan, N. J. Chalupny & C. T. Lutz (2009). **Proteasome regulation of ULBP1 transcription.** J Immunol 182(10): 6600-6609.

Carayannopoulos, L. N., O. V. Naidenko, D. H. Fremont & W. M. Yokoyama (2002). **Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D.** J Immunol 169(8): 4079-4083.

Cerwenka, A., A. B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J. H. Phillips & L. L. Lanier (2000). **Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice.** Immunity 12(6): 721-727.

Cerwenka, A., J. L. Baron & L. L. Lanier (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(20): 11521-11526.

Chaix, J., M. S. Tessmer, K. Hoebe, N. Fuseri, B. Ryffel, M. Dalod, L. Alexopoulou, B. Beutler, L. Brossay, E. Vivier & T. Walzer (2008). **Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18.** J Immunol 181(3): 1627-1631.

Chiossone, L., J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier & T. Walzer (2009). **Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program.** Blood 113(22): 5488-5496.

Colucci, F., J. P. Di Santo & P. J. Leibson (2002). **Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons?** Nat Immunol 3(9): 807-813.

Costello, R. T., S. Sivori, E. Marcenaro, M. Lafage-Pochitaloff, M. J. Mozziconacci, D. Reviron, J. A. Gastaut, D. Pende, D. Olive & A. Moretta (2002). **Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia.** *Blood* 99(10): 3661-3667.

Coudert, J. D. & W. Held (2006). **The role of the NKG2D receptor for tumor immunity.** *Semin Cancer Biol* 16(5): 333-343.

Coudert, J. D., J. Zimmer, E. Tomasello, M. Cebecauer, M. Colonna, E. Vivier & W. Held (2005). **Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells.** *Blood* 106(5): 1711-1717.

Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo & C. M. Croce (1982). **Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(24): 7824-7827.

Dalpke, A., S. Zimmermann & K. Heeg (2002). **Immunopharmacology of CpG DNA.** *Biol Chem* 383(10): 1491-1500.

Danaei, G., E. L. Ding, D. Mozaffarian, B. Taylor, J. Rehm, C. J. Murray & M. Ezzati (2009). **The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors.** *PLoS Med* 6(4): e1000058.

Das, S. & A. Khar (2002). **Regulation of NK cell function in vivo by the dose of tumour transplanted in the peritoneum.** *Immunol Lett* 83(2): 133-142.

Davis, A. C., M. Wims, G. D. Spotts, S. R. Hann & A. Bradley (1993). **A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice.** *Genes Dev* 7(4): 671-682.

Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri & D. H. Raulet (2000). **Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.** *Nat Immunol* 1(2): 119-126.

Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson & D. H. Raulet (2001). **Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity.** *Nature* 413(6852): 165-171.

DIMDI (2009). **"Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision German Modification Version 2009."** Aufgerufen am: 26. Nov. 2009, von <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2009/index.htm>.

Dunn, G. P., L. J. Old & R. D. Schreiber (2004). **The three Es of cancer immunoediting.** *Annu Rev Immunol* 22: 329-360.

Eagle, R. A. & J. Trowsdale (2007). **Promiscuity and the single receptor: NKG2D**. *Nat Rev Immunol* 7(9): 737-744.

Ebata, K., Y. Shimizu, Y. Nakayama, M. Minemura, J. Murakami, T. Kato, S. Yasumura, T. Takahara, T. Sugiyama & S. Saito (2006). **Immature NK cells suppress dendritic cell functions during the development of leukemia in a mouse model**. *J Immunol* 176(7): 4113-4124.

Ehrlich, P. (1909). **Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung**. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5: 273-290.

Epling-Burnette, P. K., F. Bai, J. S. Painter, D. E. Rollison, H. R. Salih, M. Krusch, J. Zou, E. Ku, B. Zhong, D. Boulware, L. Moscinski, S. Wei, J. Y. Djeu & A. F. List (2007). **Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors**. *Blood* 109(11): 4816-4824.

Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle & M. F. Neurath (2004). **Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7**. *J Immunol* 172(9): 5149-5153.

Fuertes, M. B., M. V. Girart, L. L. Molinero, C. I. Domaica, L. E. Rossi, M. M. Barrio, J. Mordoh, G. A. Rabinovich & N. W. Zwirner (2008). **Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity**. *J Immunol* 180(7): 4606-4614.

Fujita, S., N. Buziba, A. Kumatori, M. Senba, A. Yamaguchi & K. Toriyama (2004). **Early stage of Epstein-Barr virus lytic infection leading to the "starry sky" pattern formation in endemic Burkitt lymphoma**. *Arch Pathol Lab Med* 128(5): 549-552.

Grauer, O. M., R. P. Suttmüller, W. van Maren, J. F. Jacobs, E. Bennink, L. W. Toonen, S. Nierkens & G. J. Adema (2008). **Elimination of regulatory T cells is essential for an effective vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells in a murine glioma model**. *Int J Cancer* 122(8): 1794-1802.

Groh, V., J. Wu, C. Yee & T. Spies (2002). **Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation**. *Nature* 419(6908): 734-738.

Guerra, N., Y. X. Tan, N. T. Joncker, A. Choy, F. Gallardo, N. Xiong, S. Knoblaugh, D. Cado, N. M. Greenberg & D. H. Raulet (2008). **NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy**. *Immunity* 28(4): 571-580.

Hallett, W. H., E. Ames, M. Motarjemi, I. Barao, A. Shanker, D. L. Tamang, T. J. Sayers, D. Hudig & W. J. Murphy (2008). **Sensitization of tumor cells to NK cell-mediated killing by proteasome inhibition**. *J Immunol* 180(1): 163-170.

Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2000). **The hallmarks of cancer**. Cell 100(1): 57-70.

Harris, N. L., E. S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H. K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T. A. Lister & C. D. Bloomfield (1999). **The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997**. Ann Oncol 10(12): 1419-1432.

Hayakawa, Y. & M. J. Smyth (2006). **CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity**. J Immunol 176(3): 1517-1524.

Hayakawa, Y. & M. J. Smyth (2006). **NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance**. Semin Immunol 18(3): 176-185.

Herberman, R. B., M. E. Nunn & D. H. Lavrin (1975). **Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity**. Int J Cancer 16(2): 216-229.

Hiddemann, W., D. L. Longo, B. Coiffier, R. I. Fisher, F. Cabanillas, F. Cavalli, L. M. Nadler, V. T. De Vita, T. A. Lister & J. O. Armitage (1996). **Lymphoma classification--the gap between biology and clinical management is closing**. Blood 88(11): 4085-4089.

Huang, B., J. Zhao, H. Li, K. L. He, Y. Chen, S. H. Chen, L. Mayer, J. C. Unkeless & H. Xiong (2005). **Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance**. Cancer Res 65(12): 5009-5014.

Huber, C. H. & T. Wolfel (2004). **Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice**. J Cancer Res Clin Oncol 130(7): 367-374.

Jamieson, A. M., A. Diefenbach, C. W. McMahon, N. Xiong, J. R. Carlyle & D. H. Raulet (2002). **The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing**. Immunity 17(1): 19-29.

Kärre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek & R. Kiessling (1986). **Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy**. Nature 319(6055): 675-678.

Kiessling, R., E. Klein & H. Wigzell (1975). **"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype**. Eur J Immunol 5(2): 112-117.

Kim, J. M., J. P. Rasmussen & A. Y. Rudensky (2007). **Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice**. Nat Immunol 8(2): 191-197.

Kim, K. J., C. Kanellopoulos-Langevin, R. M. Merwin, D. H. Sachs & R. Asofsky (1979). **Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties.** *J Immunol* 122(2): 549-554.

Kopp, H. G., T. Placke & H. R. Salih (2009). **Platelet-derived transforming growth factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity.** *Cancer Res* 69(19): 7775-7783.

Kovalchuk, A. L., C. F. Qi, T. A. Torrey, L. Taddesse-Heath, L. Feigenbaum, S. S. Park, A. Gerbitz, G. Klobeck, K. Hoertnagel, A. Polack, G. W. Bornkamm, S. Janz & H. C. Morse, 3rd (2000). **Burkitt lymphoma in the mouse.** *J Exp Med* 192(8): 1183-1190.

Lanier, L. L. (2005). **NK cell recognition.** *Annu Rev Immunol* 23: 225-274.

Larmonier, N., M. Marron, Y. Zeng, J. Cantrell, A. Romanoski, M. Sepassi, S. Thompson, X. Chen, S. Andreansky & E. Katsanis (2007). **Tumor-derived CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF- β and IL-10.** *Cancer Immunol Immunother* 56(1): 48-59.

Ljunggren, H. G. & K. Kärre (1990). **In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.** *Immunol Today* 11(7): 237-244.

Ljunggren, H. G. & K. J. Malmberg (2007). **Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer.** *Nat Rev Immunol* 7(5): 329-339.

Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele & A. Diefenbach (2007). **Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15.** *Immunity* 26(4): 503-517.

Lüscher, B. (2001). **Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network.** *Gene* 277(1-2): 1-14.

Lundqvist, A., H. Yokoyama, A. Smith, M. Berg & R. Childs (2009). **Bortezomib treatment and regulatory T-cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells.** *Blood* 113(24): 6120-6127.

Luster, A. D. (2002). **The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity.** *Curr Opin Immunol* 14(1): 129-135.

Matzinger, P. (1994). **Tolerance, danger, and the extended family.** *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.

Matzinger, P. (2002). **An innate sense of danger.** *Ann N Y Acad Sci* 961: 341-342.

Medzhitov, R. (2009). **Approaching the asymptote: 20 years later.** *Immunity* 30(6): 766-775.

- Medzhitov, R. & C. A. Janeway, Jr. (1997). **Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.** *Cell* 91(3): 295-298.
- Menetrier-Caux, C., M. Gobert & C. Caux (2009). **Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome.** *Cancer Res* 69(20): 7895-7898.
- Mocikat, R., H. Braumüller, A. Gumy, O. Egeter, H. Ziegler, U. Reusch, A. Bubeck, J. Louis, R. Mailhammer, G. Riethmüller, U. Koszinowski & M. Röcken (2003). **Natural killer cells activated by MHC class I^{Low} targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses.** *Immunity* 19(4): 561-569.
- Murphy, K. P., P. Travers, M. Walport & C. Janeway (2008). **Janeway's immunobiology.** New York, Garland Science.
- North, J., I. Bakhsh, C. Marden, H. Pittman, E. Addison, C. Navarrete, R. Anderson & M. W. Lowdell (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(1): 85-94.
- Oppenheim, D. E., S. J. Roberts, S. L. Clarke, R. Filler, J. M. Lewis, R. E. Tigelaar, M. Girardi & A. C. Hayday (2005). **Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance.** *Nat Immunol* 6(9): 928-937.
- Prins, R. M., D. D. Vo, H. Khan-Farooqi, M. Y. Yang, H. Soto, J. S. Economou, L. M. Liao & A. Ribas (2006). **NK and CD4 cells collaborate to protect against melanoma tumor formation in the brain.** *J Immunol* 177(12): 8448-8455.
- Rajewsky, K. (1996). **Clonal selection and learning in the antibody system.** *Nature* 381(6585): 751-758.
- Richards, J. O., X. Chang, B. W. Blaser, M. A. Caligiuri, P. Zheng & Y. Liu (2006). **Tumor growth impedes natural-killer-cell maturation in the bone marrow.** *Blood* 108(1): 246-252.
- Roda, J. M., R. Parihar & W. E. Carson, 3rd (2005). **CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells.** *J Immunol* 175(3): 1619-1627.
- Rozen, S. & H. Skaletsky (2000). **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
- Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi & T. Nomura (2006). **Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.** *Immunol Rev* 212: 8-27.

Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin & T. Yamaguchi (2009). **Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?** *Int Immunol* 21(10): 1105-1111.

Salih, H. R., H. Antropius, F. Gieseke, S. Z. Lutz, L. Kanz, H. G. Rammensee & A. Steinle (2003). **Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia.** *Blood* 102(4): 1389-1396.

Shafer-Weaver, K. A., M. J. Anderson, K. Stagliano, A. Malyguine, N. M. Greenberg & A. A. Hurwitz (2009). **Cutting Edge: Tumor-specific CD8⁺ T cells infiltrating prostatic tumors are induced to become suppressor cells.** *J Immunol* 183(8): 4848-4852.

Sharma, S., A. L. Dominguez, D. B. Hoelzinger & J. Lustgarten (2008). **CpG-ODN but not other TLR-ligands restore the antitumor responses in old mice: the implications for vaccinations in the aged.** *Cancer Immunol Immunother* 57(4): 549-561.

Sheiness, D. & J. M. Bishop (1979). **DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus.** *J Virol* 31(2): 514-521.

Silva, A., D. M. Andrews, A. G. Brooks, M. J. Smyth & Y. Hayakawa (2008). **Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets.** *Int Immunol* 20(4): 625-630.

Smyth, M. J., M. W. Teng, J. Swann, K. Kyparissoudis, D. I. Godfrey & Y. Hayakawa (2006). **CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer.** *J Immunol* 176(3): 1582-1587.

Spies, T. (2008). **Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair.** *Nat Immunol* 9(9): 1013-1015.

Sun, J. C. & L. L. Lanier (2009). **Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?** *Eur J Immunol* 39(8): 2059-2064.

Sutmuller, R. P., L. M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T. N. Schumacher, M. E. Wildenberg, J. P. Allison, R. E. Toes, R. Offringa & C. J. Melief (2001). **Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25⁺ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses.** *J Exp Med* 194(6): 823-832.

Tada, T., S. Ohzeki, K. Utsumi, H. Takiuchi, M. Muramatsu, X. F. Li, J. Shimizu, H. Fujiwara & T. Hamaoka (1991). **Transforming growth factor- β -induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state.** *J Immunol* 146(3): 1077-1082.

- Terme, M., N. Chaput, B. Combadiere, A. Ma, T. Ohteki & L. Zitvogel (2008). **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(7): 4679-4686.
- Ugolini, S. & E. Vivier (2009). **Immunology: Natural killer cells remember.** *Nature* 457(7229): 544-545.
- Vales-Gomez, M., S. E. Chisholm, R. L. Cassady-Cain, P. Roda-Navarro & H. T. Reyburn (2008). **Selective induction of expression of a ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors.** *Cancer Res* 68(5): 1546-1554.
- Vita, M. & M. Henriksson (2006). **The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer.** *Semin Cancer Biol* 16(4): 318-330.
- Vollmar, A. & T. Dingermann (2005). **Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe.** Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges.
- Vollmer, J. & A. M. Krieg (2009). **Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists.** *Adv Drug Deliv Rev* 61(3): 195-204.
- Vosshenrich, C. A., M. E. Garcia-Ojeda, S. I. Samson-Villeger, V. Pasqualetto, L. Enault, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, D. Guy-Grand, B. Rocha, A. Cumano, L. Rogge, S. Ezine & J. P. Di Santo (2006). **A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127.** *Nat Immunol* 7(11): 1217-1224.
- Waldhauer, I. & A. Steinle (2008). **NK cells and cancer immunosurveillance.** *Oncogene* 27(45): 5932-5943.
- Walzer, T., M. Blery, J. Chaix, N. Fuseri, L. Chasson, S. H. Robbins, S. Jaeger, P. Andre, L. Gauthier, L. Daniel, K. Chemin, Y. Morel, M. Dalod, J. Imbert, M. Pierres, A. Moretta, F. Romagne & E. Vivier (2007). **Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3384-3389.
- Wan, Y. Y. & R. A. Flavell (2007). **'Yin-Yang' functions of transforming growth factor- β and T regulatory cells in immune regulation.** *Immunol Rev* 220: 199-213.
- Watzl, C. (2003). **The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"?** *Microbes Infect* 5(1): 31-37.
- Weidmann, E. & E. Jäger (2008). **Tumor-Escape-Mechanismen.** in *Krebsimmuntherapien - Standards und Innovationen.* C. Huber, H.-G. Rammensee, T. Wölfel and C. Britten. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag: 67-76.
- Weiner, G. J., H. M. Liu, J. E. Wooldridge, C. E. Dahle & A. M. Krieg (1997). **Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as**

immune adjuvants in tumor antigen immunization. Proc Natl Acad Sci U S A 94(20): 10833-10837.

Wiemann, K., H. W. Mittrucker, U. Feger, S. A. Welte, W. M. Yokoyama, T. Spies, H. G. Rammensee & A. Steinle (2005). **Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo.** J Immunol 175(2): 720-729.

Xie, Y., O. Bai, J. Yuan, R. Chibbar, K. Slattery, Y. Wei, Y. Deng & J. Xiang (2009). **Tumor apoptotic bodies inhibit CTL responses and antitumor immunity via membrane-bound transforming growth factor- β 1 inducing CD8⁺ T-cell anergy and CD4⁺ Tr1 cell responses.** Cancer Res 69(19): 7756-7766.

Yokoyama, W. M. (2006). **Contact hypersensitivity: not just T cells!** Nat Immunol 7(5): 437-439.

Zhou, Q., C. Bucher, M. E. Munger, S. L. Highfill, J. Tolar, D. H. Munn, B. L. Levine, M. Riddle, C. H. June, D. A. Valleria, B. J. Weigel & B. R. Blazar (2009). **Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia.** Blood 114(18): 3793-3802.

Zimmer, J., E. Andres & F. Hentges (2008). **NK cells and Treg cells: a fascinating dance cheek to cheek.** Eur J Immunol 38(11): 2942-2945.

6. Anhang

6.1. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in

Fachpublikationen

Christoph Brenner, Susan King, Margarethe Przewoznik, Imke Wolters, Christian Adam, Georg Bornkamm, Dirk Busch, Martin Röcken und Ralph Mocikat (2010).

Requirements for control of B-cell lymphoma by natural killer cells, Eur J Immunol 40(2): 494-504, DOI: 10.1002/eji.200939937.

Poster/Kongressbeiträge

Christoph Brenner, Susan King, Imke Wolters, Georg Bornkamm, Martin Röcken und Ralph Mocikat, **Tumour control by natural killer cells in a spontaneous mouse lymphoma model**, 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Heidelberg 2007

Christoph Brenner, Margarethe Przewoznik, Susan King, Imke Wolters, Dirk Busch, Georg Bornkamm, Martin Röcken und Ralph Mocikat, **Tumour escape from innate immune responses in a spontaneous murine lymphoma model**, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie und der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Wien 2008

Margarethe Przewoznik, Christoph Brenner, Susan King, Imke Wolters, Dirk Busch, Georg Bornkamm, Martin Röcken und Ralph Mocikat, **Phenotypic and functional characterization of natural killer cells in spontaneous mouse lymphomas**, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie und der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie, Wien 2008

Christoph Brenner, Margarethe Przewoznik, Marcella Naujoks, Susan King, Dirk Busch, Georg Bornkamm, Martin Röcken und Ralph Mocikat, **Interplay between innate and adaptive immunity in tumour control**, 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009

Marcella Naujoks, Christoph Brenner, Margarethe Przewoznik, Georg Bornkamm und Ralph Mocikat, **Phenotypic and functional characterization of dendritic cells in spontaneous mouse lymphoma**, 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009

Margarethe Przewoznik, Christoph Brenner, David Anz, Marcella Naujoks, Carole Bourquin, Georg Bornkamm, Martin Röcken und Ralph Mocikat, **Function of natural killer cells in a spontaneous mouse lymphoma model**, 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009

6.2. Danksagung

Mein Dank gebührt besonders Prof. Dr. med. Ralph Mocikat, der mir bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit ein vorzüglicher Betreuer und Mentor war, und dessen Rat und Erfahrungen ich außerordentlich schätzen lernen durfte.

Dafür, dass sie die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Vertretung vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München übernommen hat, und ich auch in den Arbeitsseminaren ihrer Gruppe stets freundlich aufgenommen wurde, danke ich Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. D. J. Schendel für die Aufnahme am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrums München.

Meine Zeit in der Arbeitsgruppe wäre nicht das gewesen, was sie war, ohne die Begleitung durch die Kollegen und Mitstreiter in der Gruppe: Carolin, Nadine, Albert, Mäggi, Marcella, Hannes und Nina. Durch ihre Begeisterung und Fröhlichkeit haben sie ein Arbeitsklima geschaffen, das nicht nur von gegenseitiger Hilfsbereitschaft geprägt war, sondern in dem das Arbeiten auch eine Freude war.

Der Mannschaft des Tierhauses um Michael Hagemann gilt mein besonderer Dank für die gute und professionelle Zusammenarbeit bei den Arbeiten mit den Mäusen.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des IMI möchte ich mich herzlich bedanken. Die angenehme Atmosphäre, sei es bei der Wissenschaft oder auch in sozialer Hinsicht, beim gemeinsamen Mittagstisch oder in der Laufrunde, die den Kopf wieder für neue Einfälle freimachen half, wird mir eine bleibende Erinnerung sein.

Meiner Familie danke ich für ihren Beitrag, mich auf meinem Lebensweg zu unterstützen.

Schließlich danke ich meiner Frau für ihr Vertrauen, ihre Rücksicht und ihr Verständnis während der Phase meiner Doktorarbeit.