

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München  
Vorstand: Frau Prof. Dolores J. Schendel, Ph.D.

**Thema der Dissertation:**  
**Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von**  
**natürlichen Killerzellen in einem murinen**  
**Spontan-Tumormodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Margarethe Przewoznik

aus  
Nikolai  
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld  
Prof. Dr. rer. nat. Ludger Klein  
Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2011

**Für meine Eltern**

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2007 bis August 2011 im Institut für Molekulare Immunologie am Helmholtz-Zentrum München angefertigt.

Teile der Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

Original-Veröffentlichungen:

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

Przewoznik M., Hömberg N., Naujoks M., Pötzl J., Brenner C. D., Anz D., Bourquin C., Nelson P. J., Röcken M. und Mocikat R.: Recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma: Implications for therapeutic cell transfer.

Journal of Immunotherapy 35 (3): 217-22 (2012)

Publizierte Abstrakts und Kongressbeiträge:

Przewoznik M., Brenner C. D., King S., Wolters I., Busch D., Bornkamm G., Röcken M. und Mocikat R.: Phenotypic and functional characterization of natural killer cells in spontaneous mouse lymphomas. Wiener Klin. Wochenschr. 120 (S1), 106 (2008)

Brenner C. D., Przewoznik M., King S., Wolters I., Busch D., Bornkamm G., Röcken M. und Mocikat R.: Tumour escape from innate immune responses in a spontaneous murine lymphoma model. Wiener Klin. Wochenschr. 120 (S1), 96 (2008)

Przewoznik M., Brenner C. D., Naujoks M., Bornkamm G., Röcken M. und Mocikat R.: Function of natural killer cells in a spontaneous mouse lymphoma model. Eur. J. Immunol. (S1), 341 (2009)

Brenner C. D., Przewoznik M., Naujoks M., King S., Busch D., Bornkamm G., Röcken M. und Mocikat R.: Interplay between innate and adaptive immunity in tumour control. Eur. J. Immunol. (S1), 341 (2009)

Naujoks M., Brenner C. D., Przewoznik M., Bornkamm G. und Mocikat R.: Phenotypic and functional characterization of dendritic cells in spontaneous mouse lymphoma. Eur. J. Immunol. (S1), 370 (2009)

Naujoks M., Brenner C. D., Przewoznik M., Bornkamm G. und Mocikat R.: Dendritic cells in spontaneous mouse lymphoma show an activated phenotype but are functionally impaired and induce immunosuppression. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Leipzig (2010)

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2 Das erworbene Immunsystem .....	2
1.1.3 Tumorummunologie .....	3
1.2 Natürliche Killerzellen .....	4
1.3 Tumorerkrankungen .....	7
1.3.1 Burkitt-Lymphom.....	7
1.4 Modell des spontanen B-Zell-Lymphoms .....	9
2. Fragestellung .....	10
3. Material und Methoden	
3.1 Material	
3.1.1 Mäuse.....	12
3.1.2 Antikörper.....	12
3.1.3 Reagenzien und Chemikalien .....	14
3.1.4 Kits.....	15
3.1.5 Puffer .....	15
3.1.6 Geräte und Hilfsmittel .....	16
3.1.7 Software .....	17
3.2 Methoden	
3.2.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus murinen Organen.....	18

---

3.2.3	Zellzahl-Bestimmung .....	19
3.2.4	Durchflusszytometrie (FACS) .....	19
3.2.5	Intrazelluläre FACS-Färbung .....	20
4.	Ergebnisse	
4.1	NK-Zellen akkumulieren in Tumorlymphknoten .....	30
4.2	NK-Zellen zeigen Aktivierungszeichen .....	31
4.3	NK-Zellen zeigen gestörte Effektorfunktionen .....	33
4.4	Zytokinprofil im Tumorgewebe .....	37
4.5	Zelluläre Herkunft des TGF- $\beta$ .....	38
4.6	NK-Zellen proliferieren in Tumorlymphknoten .....	39
4.7	NK-Zellen migrieren zum Tumorlymphknoten .....	41
4.8	Chemokinprofil im Tumorgewebe .....	42
4.9	Chemokinrezeptoren .....	44
4.10	In-vitro-Migration nach Neutralisierung von CXCL9 und CXCL10 .....	46
4.11	In-vitro-Migration unter Zugabe von CXCL9 und CXCL10 .....	47
4.12	Immunhistologische Darstellung von NK-Zellen .....	49
5.	Diskussion	
5.1	NK-Zellen im Tumorgewebe .....	51
5.2	Funktionalität von NK-Zellen .....	52
5.3	Zytokine im Tumorgewebe .....	53
5.4	Proliferation .....	54
5.5	Migration .....	55
5.6.	Ausblick .....	59

6.	Zusammenfassung .....	60
7.	Literaturverzeichnis .....	62

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
°C	Grad Celsius
CFSE	Carboxyfluoreszin-Succimidylester
Cr	Chrom
Cy2	Cyaninfarbstoff 2
DAPI	Diamidinphenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELC	EB/1 ligand chemokine (EB/1 Liganden-Chemokin)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter Immunabsorptionstest)
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
G1-/2-Phase	Gap-Phase (Pausen-/Ruhephase)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung

---

GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
HRP	horseradish-peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IP10	interferone-inducible proteine 10 (durch Interferon induzierbares Protein 10)
I-TAC	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (durch Interferon induzierbarer T-Zell-Lockstoff)
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
LAMP-1	lysosomal-associated membrane proteine 1 (Lysosomen-assoziiertes Membran-Protein 1)
LK	Lymphknoten
MACS	magnetic-activated cell separation (magnetische Zellseparation)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC-A/B	major histocompatibility complex class I related chain A/B
MIG	monokine induced by gamma-interferone (durch Interferon- $\gamma$ induziertes Zytokin)
MIP1- $\alpha/\beta$	macrophage inflammatory protein 1- $\alpha/\beta$
$\mu$	Mikro
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA (Botenstoff-Ribonucleinsäure)
MULT-1	murine ULBP-like transcript 1
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein complex

---

pg	Picogramm
PMA	Phorbolmyristataacetat
PRR	pattern recognition receptors (Muster-Erkennungsrezeptoren)
RAE-1	retinoic acid early indubible-1 gene
RNS	Ribonukleinsäure
RRX	Rhodamin Rot-X
SLC	secondary lymphoid organ chemokine
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand)
ULBP	UL16-binding protein (UL-16-bindendes Protein)
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Persönlichkeiten wie Emil von Behring und Paul Ehrlich haben im 19. und zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Wissenschaft der Immunologie begründet und geprägt. Das Immunsystem lässt sich entwicklungsgeschichtlich und funktionell in zwei eng miteinander verknüpfte Systeme unterteilen.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Jeder Mensch ist lebenslang von Pathogenen umgeben, und dennoch ist eine manifeste Erkrankung kein Dauerzustand des Organismus, sondern wird als Ausnahmezustand empfunden. Diese Aufgabe der permanenten Abwehr gegen uns befallende Mikroorganismen übernimmt in erster Linie das angeborene Immunsystem. Es ist der entwicklungsgeschichtlich ältere Teil des Abwehrsystems und besteht sowohl aus mechanischen Barrieren wie zum Beispiel der Haut und Schleimhaut als auch aus zellulären und azellulären Komponenten. Der zelluläre Teil umfasst neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, ferner Mastzellen, dendritische Zellen, Monozyten und die aus ihnen entstehenden Makrophagen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Murphy et al. 2008). Zur azellulären Komponente gehören das Komplementsystem und einige bakterizid wirkende Substanzen wie beispielsweise das Lysozym. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, Mikroorganismen und virusinfizierte oder entartete Zellen unspezifisch bereits beim ersten Kontakt zu erkennen und zu eliminieren. Diese primäre Abwehr basiert auf der Erkennung von hoch konservierten Molekülstrukturen auf Pathogenen. Die sogenannten PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) sind für Pathogene meist essentiell und werden von sogenannten PRRs (pattern recognition receptors) auf Immunzellen erkannt. Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren auf den Zellen resultieren in direkter Eliminierung der Zielzellen und in einer Zytokin-vermittelten Aktivierung der erworbenen Immunabwehr. Zu den wichtigsten und bestuntersuchten Rezeptoren zählen die Toll-like-Rezeptoren (Rock et al. 1998). Sie erkennen je nach Untergruppe zum

Beispiel konservierte Strukturen von Pathogenen und setzen intrazelluläre Signalkaskaden in Gang (Akira und Takeda 2004). Somit stellt die angeborene Immunabwehr ein System dar, das darauf spezialisiert ist, den Organismus frühzeitig und antigenunspezifisch vor Infektionen und Entartungen zu schützen.

### 1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Die zwei wichtigsten Eigenschaften des erworbenen Immunsystems, die eine Unterscheidung von der angeborenen Abwehr ermöglichen, sind die Spezifität und das immunologische Gedächtnis. Die zellulären Vertreter des erworbenen Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. Wie alle Blutzellen entstehen sie im Knochenmark. Sie zeichnen sich durch antigenspezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aus. Auf B-Zellen bestehen diese Rezeptoren aus membranständigen Immunglobulinen, die durch somatische Rekombination und Hypermutation ein breites Spezifitätsspektrum abdecken (Kim et al. 1981). Nach Bindung eines Antigen an den spezifischen B-Zell-Rezeptor wird das Antigen internalisiert, prozessiert und, an ein MHC-Klasse-II-Molekül gebunden, an der Zelloberfläche der B-Zelle präsentiert. Zur maximalen Aktivierung der B-Zellen wird in den meisten Fällen neben der Antigen-Bindung noch ein weiteres Signal benötigt. Dieses beinhaltet die Bindung des T-Zell-Rezeptors einer Th2-Zelle an den Antigen-MHC-II-Komplex, woraufhin die T-Zelle über Mediatoren wie zum Beispiel IL-4 die B-Zelle aktiviert (Murphy et al. 2008). Diese Aktivierung resultiert in einer klonalen Expansion und Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle. Plasmazellen sind in der Lage, Antikörper gegen das zuvor gebundene Antigen zu produzieren und stellen somit den humoralen Teil des erworbenen Immunsystems dar. T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in den Thymus, wo sie einen Reifungsprozess durchlaufen. Während dieses Prozesses werden die T-Zellen, die körpereigene Strukturen erkennen, eliminiert. Die selektierten T-Lymphozyten erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors Antigene nur dann, wenn diese an ein MHC-Molekül gebunden präsentiert werden (Howard und Wilson 1974). MHC-Moleküle der Klasse I werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während die Antigen-Präsentation über MHC-Moleküle der Klasse II nur von darauf spezialisierten, sogenannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Monozyten und B-Zellen, ausgeübt wird. T-Lymphozyten

differenzieren zu verschiedenen Subpopulationen wie beispielsweise zu CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen mit den jeweils spezifischen Effektorfunktionen.

Sowohl B- als auch T-Zellen sind in der Lage, nach Antigen-Kontakt zu Gedächtniszellen zu differenzieren. Diese besitzen die Fähigkeit, nach erneuter Bindung des gleichen Antigens in kürzester Zeit ihren maximalen Aktivierungszustand zu erreichen.

Durch die Wirkungsweise der B- und T-Zellen gelingt es der erworbenen Immunabwehr, sich im Laufe des Lebens an eine Vielzahl von Erregern anzupassen und eine Anzahl von etwa  $10^8$ - $10^{10}$  Spezifitäten zu entwickeln. Aus diesem Grund wird das erworbene Immunsystem auch als adaptives Immunsystem bezeichnet. Die angeborene und die erworbene Immunabwehr sollten jedoch nicht als zwei voneinander unabhängige Systeme betrachtet werden, denn es gibt eine Vielzahl von Schnittstellen beider Systeme. Über direkten Zellkontakt oder durch lösliche Mediatoren vermittelt, stehen beide Systeme stets in Verbindung zueinander und beeinflussen sich gegenseitig. Um die Funktionstüchtigkeit solch komplexer Systeme zu gewährleisten, ist eine strenge zeitliche und räumliche Organisation notwendig. Zytokine und Chemokine spielen bei dieser Organisation eine entscheidende Rolle (Wuest und Carr 2008, Groom und Luster 2011).

### 1.1.3 Tumorimmunologie

Die Idee, mit Hilfe immunologischer Konzepte Tumorerkrankungen zu heilen, ist nicht neu. Die Zulassung des monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab® im Jahr 1997 war ein Meilenstein in der modernen Immuntherapie (Anderson et al. 1997). Es folgte eine Reihe weiterer Tumorantigen-spezifischer Antikörper, deren Wirksamkeit und Überlegenheit gegenüber früheren Therapiestrategien in zahlreichen Studien entweder bereits bewiesen wurde oder zur Zeit geprüft wird (Dawood et al. 2010, Quintas-Cardama et al. 2010).

Nicht nur Antikörper, sondern auch andere Möglichkeiten der Immunmodulation können in der Tumorthherapie genutzt werden. Um diese Ansätze möglichst zielgerichtet, effektiv und nebenwirkungsarm einsetzen zu können, ist die genaue Kenntnis der immunologischen Vorgänge während der Tumorgenese die wichtigste

Voraussetzung. Die ursprüngliche Idee, dass das Immunsystem Tumorzellen erkennen und eliminieren kann, ist als „immune surveillance“-Theorie („Immunüberwachungs-Theorie“) bereits im Jahr 1957 publiziert worden (Burnet 1957). Diese Theorie ist durch neue Erkenntnisse erweitert worden, die nicht nur Erklärungen dafür liefern, wie es dem Immunsystem gelingt, Tumorwachstum zu verhindern, sondern auch, wie es Tumorzellen gelingt, der Immunabwehr zu entgehen. Bei der sogenannten „Tumorevasion“ spielen folgende Faktoren eine Rolle (Murphy et al. 2008, Weidmann und Jäger 2008, Loose und Van de Wiele 2009):

- Tumorzellen können ihre Immunogenität verringern, indem sie die Expression von MHC-Molekülen, Adhäsions- oder kostimulatorischen Molekülen vermindern.
- Tumorzellen können die Expression von Tumor-spezifischen Antigenen herunterregulieren oder einstellen.
- Tumorzellen können gebundene Antikörper mit den Tumor-spezifischen Antigenen zusammen internalisieren.
- Tumorzellen können immunsuppressive Moleküle wie TGF- $\beta$  und IL-10 sezernieren und dadurch Immunzellen direkt inhibieren oder immunsuppressive regulatorische T-Zellen rekrutieren.
- Tumorzellen können in Immunzellen Apoptose induzieren.
- Tumoren können durch Substanzen wie Kollagen eine physikalische Barriere zu den Immunzellen aufbauen.

## 1.2 Natürliche Killerzellen

Im Jahr 1975 erschienen unabhängig voneinander die beiden ersten Publikationen über natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Herberman et al. 1975, Kiessling et al. 1975). Zunächst als große, granuläre Lymphozyten mit zytotoxischen Eigenschaften gegen Leukämiezellen beschrieben, sind NK-Zellen seitdem fester Bestand der immunologischen Forschung.

Neben B- und T-Zellen stellen die NK-Zellen eine dritte Subpopulation von Lymphozyten dar, die jedoch Antigen-unspezifisch agieren und somit dem angeborenen Immunsystem angehören. Es werden allerdings auch adaptive Eigenschaften von NK-Zellen diskutiert (Sun et al. 2009), die die besondere Stellung dieser Lymphozyten als

Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität bekräftigen würden. Der Aktivierungszustand von NK-Zellen wird über eine Vielzahl an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren vermittelt, deren Signale intrazellulär integriert werden. Überwiegen die aktivierenden Signale, können NK-Zellen ihre Effektorfunktionen ausführen. Die Effektorfunktionen umfassen die direkte Zytotoxizität gegenüber virusinfizierten und entarteten Zellen sowie die Produktion wichtiger Zytokine wie zum Beispiel IFN- $\gamma$ , TNF oder TGF- $\beta$ , durch die wiederum andere Immunzellen beeinflusst werden. Die direkte Zelllyse durch NK-Zellen kann über verschiedene Wege erfolgen. Die Freisetzung von intrazellulären Granula, die lytische Enzyme wie beispielsweise Perforin und Granzyme enthalten, kann zur Apoptose der Zielzelle führen (Lieberman 2003). Dieser Prozess kann sowohl Antikörper-unabhängig als auch -abhängig erfolgen. Geht der Zytolyse eine Antikörperbindung an den Fc $\gamma$ -Rezeptor III (CD16) auf NK-Zellen voraus, spricht man von „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC) (Ojo und Wigzell 1978). Ein anderer Weg zur Zielzellelimination basiert auf Interaktionen zwischen dem Rezeptor Fas auf der Zielzelle und Fas-Ligand auf der Effektorzelle. Neben TNF und TRAIL können NK-Zellen mit Fas-Ligand noch ein drittes Mitglied der TNF-Familie exprimieren (Kayagaki et al. 1999, Takeda et al. 2001, Zou et al. 2010). Die Bindung von Fas-Ligand an seinen sogenannten „Todesrezeptor“ Fas auf der Zielzelle induziert über Caspase-abhängige Kaskaden deren Apoptose. Dass NK-Zellen die oben beschriebenen zytotoxischen Mechanismen nicht auch gegen körpereigene Zellen richten, führte zu der Annahme, dass sie zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden können. Diese Vermutung wurde im Jahr 1986 in Form der „Missing-self“-Hypothese formuliert (Ljunggren und Kärre 1990). MHC-I ist der Ligand für inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen. Gesunde körpereigene Zellen exprimieren dieses Molekül auf ihrer Oberfläche und präsentieren daran gebundene körpereigene Peptide den T-Zellen. Gleichzeitig schützen sie sich durch die Interaktion zwischen MHC-I-Molekülen und inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen vor der NK-Zell-vermittelten Lyse. Transformierte und virusinfizierte Zellen setzen die MHC-I-Expression herab, um nicht von T-Zellen erkannt zu werden. Dadurch bleiben die aktivitätshemmenden Signale für NK-Zellen jedoch aus, und es folgt die Zytolyse. Die inhibitorischen Rezeptoren von murinen NK-Zellen umfassen verschiedene Ly49-Rezeptoren aus der Familie der C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren (Ly49A, B, C, E, F, G2, I). Sie entsprechen funktionell den humanen Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen

Rezeptoren (KIR). Der heterodimere Komplex aus CD94 und NKG2A dient sowohl auf murinen als auch auf humanen NK-Zellen als inhibitorischer Rezeptor-Komplex.

Die Gruppe der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren umfasst im murinen System unter anderem aus der Familie der C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren die Unterformen Ly49D und Ly49H, außerdem die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D. Diese aktivierenden Rezeptoren besitzen im Gegensatz zu den inhibitorischen Rezeptoren eine MHC-I-unabhängige Bindungsspezifität. NKG2D ist ein homodimerer C-Typ-Lektin-ähnlicher Rezeptor, dessen Liganden im murinen System RAE-1, MULT-1 und H-60 und im humanen System MIC-A, MIC-B, RAE-1 und ULBP sind. Diese Liganden sind strukturell mit MHC-I-Molekülen verwandt und werden von virusinfizierten sowie entarteten Zellen im Rahmen einer Stressantwort überexprimiert. Die Interaktion von NKG2D und NKG2D-Liganden nimmt eine entscheidende Stellung bei der Tumorkontrolle ein. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von NKG2D-Liganden auf Tumorzellen positiv mit der Tumorabstoßung korreliert und dass diese Abstoßung NK-Zell-abhängig ist (Brenner et al. 2010). NKp30, 44 und 46 gehören zur Gruppe der Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren, deren Liganden zum großen Teil noch unbekannt sind. NKp44 und 46 interagieren mit viralem Hämagglutinin und viraler Neuraminidase (Jarajian et al. 2009). Nicht-virale Liganden sind weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

NK-Zellen gehören zusammen mit zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu den effektivsten Immunzellen zur Elimination von Tumorzellen. Sie stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Das in ihrem aktivierten Zustand produzierte IFN- $\gamma$  kann zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen stimulieren. Über andere Zytokine sind NK-Zellen in der Lage, auch die Reifung von B-Lymphozyten zu beeinflussen. Von besonderer Wichtigkeit ist die Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen (DZ), die die Effektivität einer Immunantwort steigert. Über Zytokine wie beispielsweise IL-12 und IL-15 können dendritische Zellen NK-Zellen aktivieren, die daraufhin ihre Effektorfunktionen ausführen. Lysieren NK-Zellen die Zielzelle, können Fragmente dieser Zelle von DZ internalisiert und präsentiert werden, was anschließend zu einer T-Zell-Antwort führt. Auch die von der aktivierten NK-Zelle produzierten Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF und GM-CSF haben Einfluss auf die dendritischen Zellen, indem sie deren Reifungsprozess stimulieren. Allerdings können NK-Zellen dendritische Zellen auch lysieren und somit einer unkontrollierten Immunantwort effektiv entgegenwirken (Lucas et al. 2010).

Für eine adäquate Immunreaktion und Tumorelimination ist neben der Funktionstüchtigkeit auch die richtige Lokalisation und Organisation der Immunzellen entscheidend (Galon et al. 2006). NK-Zellen werden im Knochenmark gebildet und sind im ausgereiften Organismus in verschiedenen Organen vertreten. In der Maus repräsentieren NK-Zellen in der Milz etwa 4 % der Lymphozyten, im Lymphknoten ca. 1 %. Dabei befinden sie sich in der Milz hauptsächlich in der roten Pulpa, getrennt von B- und T-Lymphozyten, in den Lymphknoten sind sie ebenfalls meist getrennt von B- und T-Zellen in den parafollikulären und parakortikalen Regionen lokalisiert. Den höchsten prozentualen Anteil mit etwa 8 % der Lymphozyten stellen NK-Zellen in der Lunge dar. Die höchste Absolutzahl mit bis zu 3 Millionen NK-Zellen ist im murinen Organismus in der Milz zu finden (Grégoire et al. 2007).

### **1.3 Tumorerkrankungen**

Tumorerkrankungen stellen nach Herz- und Kreislauferkrankungen zur Zeit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Die steigende Lebenserwartung wird die Prävalenzraten weiter anheben. Gleichzeitig führen neue Forschungsergebnisse zu einer kontinuierlichen Weiterentwicklung von Therapiekonzepten. Diese setzen jedoch genaue Kenntnisse über die immunologische Situation bei der entsprechenden Tumorerkrankung voraus.

#### **1.3.1 Burkitt-Lymphom**

Lymphome nehmen eine besondere Stellung unter den Tumorerkrankungen ein. Denn es handelt sich hierbei um eine Entartung des Systems, dessen Aufgabe die Tumoreliminierung ist.

Maligne Lymphome werden historisch begründet in Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Non-Hodgkin-Lymphome sind ein Sammelbegriff für eine sehr heterogene Gruppe von Entartungen der lymphatischen Zellen. Sie können hinsichtlich verschiedener Kriterien wie beispielsweise der entarteten Zellreihe, der zu Grunde liegenden Translokation oder des Malignitätsgrades differenziert werden (Hiddemann et al. 1996). Etwa 80 % aller NHL sind auf eine Entartung der B-Zellreihe

zurückzuführen. Zu ihnen zählt auch das Burkitt-Lymphom. Es ist auf Grund seiner hohen Zellteilungsrate ein sehr aggressives Lymphom (Herold 2007). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden drei Typen unterschieden: das endemische Burkitt-Lymphom, das hauptsächlich bei Kindern in Zentralafrika vorkommt, das sporadische Burkitt-Lymphom, das in gemäßigten Klimazonen auftritt und das HIV-assoziierte Burkitt-Lymphom, das unabhängig von der geographischen Lage vorkommt. Während eine EBV-Assoziation beim endemischen und HIV-assoziierten Typ regelmäßig vorliegt, ist dies beim sporadischen Typ in nur maximal 20 % der Fälle (Bornkamm 2009). Der Pathogenese aller drei Typen gemeinsam ist eine Translokation des Protoonkogens c-myc. Dabei entstehen durch Verlagerung eines Chromosomenabschnittes auf ein anderes Chromosom Hybrid-Gene. Beim Burkitt-Lymphom sind bislang drei Translokationen des Protoonkogens c-myc bekannt: t(8;14), t(2;8) und t(8;22). In ca. 80 % der Fälle liegt die Translokation t(8;14) vor (Herold 2007). Die Konsequenz aller drei Translokationen ist eine Dysregulation des c-myc-Gens, das nun unter der Kontrolle des Enhancers einer Immunglobulinkette exprimiert wird. Das Genprodukt c-myc ist unter anderem an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt. Eine Überexpression dieses Proteins führt dementsprechend zu unkontrolliertem Zellwachstum. Auch bei anderen Tumorerkrankungen wie beispielsweise dem Melanom oder Neuroblastom ist eine c-myc-Dysregulation ursächlich (Vita und Henriksson 2006). Die gesteigerte B-Zell-Proliferation manifestiert sich beim Burkitt-Lymphom in Form einer Splenomegalie und einer ausgeprägten Lymphadenopathie. Beim endemischen Burkitt-Lymphom sind vorwiegend die submandibulären Lymphknoten betroffen, oftmals mit Infiltration der Mandibula und Maxilla. Der sporadische Typ befällt bevorzugt intraabdominelle Lymphknoten.

Die Prognose beim Burkitt-Lymphom ist von einigen Faktoren abhängig, vor allem vom Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung sowie vom Alter der Patienten, wobei Kinder und Jugendliche eine bessere Prognose haben als Erwachsene. Mit den heutigen Therapiestandards, bestehend aus einer zyklischen Polychemotherapie eventuell mit Verabreichung des Anti-CD20-Antikörpers (Rituximab®) bei CD20-positiven Tumoren bei Erwachsenen und autologer Stammzelltransplantation bei Kindern, kann bei Erwachsenen in etwa 50 % der Fälle eine Heilung erzielt werden, bei Kindern sogar in über 80 % der Fälle (Herold 2007, Muntau 2009).

#### 1.4 Modell des spontanen B-Zell-Lymphoms

In transplantierbaren Lymphommodellen der Maus konnten mit immunologischen Methoden bereits Therapieerfolge erzielt werden (Adam et al. 2007). Doch diese Erkenntnisse sind nur eingeschränkt auf die klinische Situation übertragbar. Denn ein Tumor entsteht aus einer einzigen entarteten Zelle und entwickelt sich erst im Verlauf zu einer manifesten Erkrankung. Im transplantierbaren Modell hingegen wird der Maus eine große Tumorzellzahl appliziert und das Immunsystem somit mit einer anderen Situation konfrontiert. Der entscheidende Vorteil eines Spontan-Tumormodells ist also, dass der gesamte Prozess einer Anti-Tumorantwort beobachtet werden kann. Ein Spontan-Tumormodell spiegelt die klinische Situation besser wider.

Die vorliegende Arbeit basiert auf einem Modell des spontanen B-Zell-Lymphoms. Es wurde mit transgenen Mäusen gearbeitet, die das humane Protoonkogen *c-myc* unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Enhancer für die  $Ig\lambda$ -Kette exprimieren (Kovalchuk et al. 2000). Dies ähnelt der Situation beim humanen Burkitt-Lymphom (s. Kapitel 1.3.1). Die Überexpression des proliferations-regulierenden *c-myc*-Genproduktes resultiert in einem unkontrollierten Wachstum der B-Zellen. Genauso wie beim Burkitt-Lymphom führt dies wiederum zu einer ausgeprägten Hyperplasie der lymphatischen Gewebe. Alle transgenen *c-myc*-Mäuse zeigen im Alter von etwa 16 Wochen erste klinische Krankheitszeichen. Die primäre Lokalisation sind auch in diesem Modell die submandibulären Lymphknoten. Im Verlauf sind auch alle anderen Lymphknoten betroffen und es zeigt sich eine ausgeprägte Splenomegalie. Verhaltensauffälligkeiten wie zum Beispiel eine Trinkschwäche und äußere Merkmale wie struppiges Fell gehen der Lymphknotenvergrößerung oftmals voraus.

In einem Spontan-Tumormodell sind interindividuelle Unterschiede bezüglich des Krankheitsausbruchs sowie des Verlaufs zu berücksichtigen. Doch auch dieser scheinbare Nachteil spiegelt die klinische Situation realistisch wider.

## 2. Fragestellung

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf den natürlichen Killerzellen in einem murinen Spontan-Tumormodell. Dieser Schwerpunkt wurde auf Grund bereits erhobener Daten, die eine entscheidende Rolle von NK-Zellen bei der Tumorentstehung belegt haben, gewählt. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass NK-Zellen das Wachstum von transplantierten Tumorzellen mit erniedrigter MHC-I-Expression verhindern können, indem sie über dendritische Zellen eine T-Zell-Antwort induzieren (Mocikat et al. 2003). Weitere Experimente ergaben, dass in diesem transplantierbaren Tumormodell eine Abhängigkeit zwischen der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen und NKG2D-Liganden auf den entarteten Zellen besteht. Außerdem führte die NK-Zell-Aktivierung neben der sofortigen Tumorabstoßung auch zu einem Langzeit-Gedächtnis von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unter Umgehung von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen (Adam et al. 2005). All diese Erkenntnisse belegen in ihrer Gesamtheit die zentrale Rolle von NK-Zellen bei der Tumorabstoßung. Da ein transplantierbares Tumormodell jedoch nicht der klinischen Situation entspricht, sollten nun die NK-Zellen in einem Spontan-Tumormodell untersucht werden. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurden hierfür c-myc-transgene Mäuse verwendet, die im Alter von etwa 16 Wochen B-Zell-Tumoren entwickeln.

Die Fragestellung der Arbeit betraf zunächst die Quantifizierung von NK-Zellen in den Tumorlymphknoten und die phänotypische Charakterisierung der Tumor-infiltrierenden NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie, um daraus Hinweise auf den Aktivierungszustand der Zellen zu erhalten. Abhängig vom Aktivierungszustand sollte dann in einem Zytotoxizitätsversuch die NK-Zell-Funktionalität überprüft werden. Eine weitere Aufgabenstellung war die Beschreibung des Proliferations- und Migrationsverhaltens von NK-Zellen sowie der damit möglicherweise im Zusammenhang stehenden Zusammensetzung des Zytokin- und Chemokinmilieus im Tumorgewebe. Es sollten einzelne Faktoren definiert werden, die für die funktionellen Unterschiede zwischen NK-Zellen in gesunden WT-Mäusen und Tumor-tragenden c-myc-Mäusen verantwortlich sind. Zudem war ein Ziel der Arbeit die histologische Darstellung von NK-Zellen im Tumorgewebe und die Beantwortung der Frage, ob NK-Zellen direkten Kontakt zu den Tumorzellen aufnehmen. Alle Untersuchungen konzentrierten sich hauptsächlich auf die Lymphknoten, an denen sich die Tumorerkrankung primär manifestiert.

Zusammengefasst lässt sich die Aufgabenstellung der Untersuchungen als phänotypische und funktionelle Charakterisierung von natürlichen Killerzellen in einem murinen Spontan-Tumormodell definieren. Die Befunde sollen zu einem besseren Verständnis der immunologischen Prozesse bei der Tumorgenese verhelfen und langfristig zu neuen immunologischen Therapiekonzepten in der Onkologie führen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Mäuse

Die Arbeit basiert auf einem murinen Spontan-Tumormodell. Es wurden c-myc-transgene Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund verwendet, bei denen das humane c-myc-Protoonkogen unter der Kontrolle des Enhancers für die Ig $\lambda$ -Kette exprimiert wird. Diese Mäuse entwickeln im Alter von etwa vier Monaten spontan B-Zell-Tumoren, die sich hauptsächlich an den Lymphknoten, der Milz und teilweise am Thymus manifestieren.

Als Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere (WT) vom Stamm C57BL/6 verwendet. Alle Tiere wurden von Bommice, Ry (Dänemark) bezogen und im institutsinternen Tierstall unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Versuche erfolgten nach Genehmigung der Regierung von Oberbayern.

##### 3.1.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet:

**Tab. 1: Verwendete Antikörper**

Antigen	Spezies	Isotyp	Klon	Markierung	Firma
CD2	Ratte	IgG2a, $\kappa$	RM2-5	FITC	BioLegend
CD3	Ratte	IgG2b, $\kappa$	17A2	PE-Cy5	BD Pharmingen
CD8a	Ratte	IgG2a, $\kappa$	53-6.7	PerCP	BD Pharmingen
CD16/32	Ratte	IgG2b	FCR 4G8	FITC	JM/Serotec
CD19	Ratte	IgG2a, $\kappa$	6D5	keine	AbD Serotec
CD19	Ratte	IgG2a, $\kappa$	ID3	RPE	Pharmingen
CD38	Ratte	IgG2a, $\kappa$	90	Alexa 700	eBioscience
CD62L	Ratte	IgG2a, $\kappa$	MEL-14	APC	BD Pharmingen
CD69	arm. Ham.*	IgG1, $\lambda$ 3	H1.2F3	PE-Cy7	BD Pharmingen
CD94	Ratte	IgG2b, $\lambda$	18d3	FITC	BioLegend

CD107a	Ratte	IgG2b, $\kappa$	1D4B	FITC	BioLegend
B220/CD45R	Ratte	IgG2a, $\kappa$	RA3-6B2	APC	BD Pharmingen
CCR5/CD195	arm. Ham.*	IgG	HM-CCR5	PE	Biolegend
CCR7/CD197	Ratte	IgG2a	4B12	Alexa 647	Serotec
CXCR3/CD183	arm. Ham.*	IgG	CXCR3-173	APC	BioLegend
CX3CR1/Fractal.	Kaninchen	IgG	polyklonal	keine	Lifespan Biosciences
Fas/CD95	arm. Ham.*	IgG2, $\lambda$ 2	Jo2	FITC	BD Pharmingen
FasLigand/CD178	arm. Ham.*	IgG	MFL3	PE	BioLegend
Granzym A	Maus	IgG2b	3G8.5	PE	Santa Cruz
Granzym B	Ratte	IgG2b, $\kappa$	16G6	FITC	eBioscience
Kaninchen IgG	Esel	IgG	Poly4064	DyLight 649	Biolegend
MHC I	Maus	IgG2a	20-8-4S	FITC	JM #202 (intern)
NK1.1/CD161c	Maus	IgG2a, $\kappa$	PK136	Pacific Blue	Biolegend
NKp46/CD335	Ziege	IgG	polyklonal	keine	R&D Systems
Perforin	Ratte	IgG2a, $\kappa$	eBioOMAK-D	APC	eBioscience
TGF- $\beta$ 1	Maus	IgG	9016	PE	R&D Systems
Ziege IgG	Ziege	IgG	polyklonal	keine	R&D Systems
Ziege IgG	Esel	IgG	polyklonal	APC	R&D Systems
CXCL9/MIG	Ziege	IgG	polyklonal	keine	R&D Systems
CXCL10/IP10	Ziege	IgG	polyklonal	keine	R&D Systems

\* arm. Ham. = armenischer Hamster

Als Negativkontrollen dienten entweder ungefärbte Zellen oder folgende Isotypen:

**Tab. 2: Verwendete Isotypkontrollen**

Spezies	Isotyp	Klon	Markierung	Firma
Maus	IgG2b, $\kappa$	MOPC195	PE	Invitrogen
Ratte	IgG2b, $\kappa$	A95-1	FITC	BD Pharmingen
Hamster	IgG2, $\kappa$	B81-3	PE	BD Pharmingen
arm. Ham.*	IgG	HTK888	APC	BioLegend
arm. Ham.*	IgG2 $\lambda$	Ha4/8	FITC	BD Pharmingen
Ratte	IgG2a	YTH71.3	Alexa 647	AbD
Maus	IgG1	DAK-GO1	RPE	DakoCytomation

\* arm. Ham. = armenischer Hamster

### 3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

AIM-V Medium	Invitrogen, Karlsruhe
BSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CFSE	Invitrogen, Karlsruhe
Counting Beads	Invitrogen, Karlsruhe
CXCL9	R&D Systems, Minneapolis (USA)
CXCL10	Serono Pharma, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Eindeckmedium:	
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Ethanol	Lager, Helmholtz-Zentrum München
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MEM Earle`s Medium	Biochrom AG, Berlin
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PMA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase	Fermentas, St. Leon-Rot
RPMI Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin-PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Tissue-Tek® O.C.T.	Sakura, Zoeterwoude (Niederlande)
Triton® X-100	MP Biomedicals, Illkrich (Frankreich)
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.4 Kits

Es wurden folgende Kits verwendet:

**Tab. 3: Verwendete Kits**

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>
APC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen, Heidelberg
Bio-Plex™ Mouse Cytokine Th1/Th2 Assay	Bio-Rad, München
DuoSet Mouse CCL19 und DuoSet Mouse CCL21	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Fixation & Permeabilization Kit	eBioscience, San Diego (USA)
Milliplex Mouse Chemokine Immunoassay und Milliplex Mouse Chemokine Panel II Kit	Millipore, Schwalbach
NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### 3.1.5 Puffer

ELISA-Waschpuffer	PBS TWEEN 0,05 %
ELISA-Blockpuffer	PBS BSA 1 %
ELISA-Substratlösung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Tetramethylbenzidin 1:1 (BD Biosciences)
ELISA-Stopplösung	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N
Erythrozyten-Lysepuffer 10x	NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid) 16,5 g KHCO <sub>3</sub> (Kaliumhydrogencarbonat) 2,0 g Na-EDTA 74 g ad 200 ml aqua dest. pH 7,4 (nach Becton & Dickinson, Heidelberg)

FACS-Puffer	PBS FKS 2 % Natriumazid 0,1 % Na-EDTA 2 mM
MACS-Puffer	PBS 500 ml Na-EDTA 0,5 M 2 ml $\Delta$ FKS 2,5 ml

### 3.1.6 Geräte und Hilfsmittel

Brutschrank, Hera cell 240	Heraeus, München
Bioplex-Gerät	Bio-Rad, München
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deckgläser (24x50 mm)	VWR International, Darmstadt
Durchflusszytometer, LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten (10/25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Eismaschine AF 200	Scotsman, Mailand (Italien)
ELISA-Lesegerät, Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA-Platten	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Mettler-Toledo, Giessen
Fettstift: Liquid Blocker	Daido Sangyo Co. Ltd. Tokyo (Japan)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefriertruhe (-80 °C)	Thermo Scientific, Braunschweig
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kulturplatten (96-Loch)	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten (24-Loch)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryotom, CM1900 UV	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen

Luminex-Bio-Plex™ System	Bio-Rad, München
MACS-Säulen, LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-System	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette, Transferpette®	Brand, Wertheim
Mikroskop: Axioskop 2 plus	Zeiss, Jena
Molds (Einbettbehälter)	Science Services, München
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim
Objekträger: Menzelgläser	
Superfrost® Plus 25x75x1mm	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Pasteur Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10/100/1000 µl)	Greiner, Frickenhausen
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand, Wertheim
Plattenzentrifuge Labofuge 400	Heraeus, München
Schüttler IKA® MTS 4	Fröbel Labortechnik, Lindau
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofer, Reutlingen
Spritzenfiltervorsätze (0,22 µm)	neoLab, Heidelberg
Sieb, Cell strainer (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	BDK Luft- und Raumfahrttechnik, Sonnenbühl- Genkingen
Transwell-Membraneinsätze	
Costar® (5,0 µm)	Vitaris AG, Baar
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, München

### 3.1.7 Software

BD FACSDiva™

Flow Jo 7.2.5. (Treestar Inc., Ashland, OR, USA)

GraphPad Prism 5 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA)

Microsoft Office Exel 2003 (Microsoft Redmond, CA, USA)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus murinen Organen**

Nach dem Einschläfern mittels CO<sub>2</sub> wurde der Maus auf der Ventralseite das Fell angeschnitten und stumpf abgezogen. Zunächst wurden die inguinalen, axillären und submandibulären Lymphknoten herauspräpariert. Anschließend wurde das Bauchfell geöffnet, um die mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz zu entnehmen. Die Organe wurden jeweils in ein Sieb mit der Porengröße von 40 µm gelegt und mit einem Spritzenstempel hindurch in eine mit MEM Medium gefüllte Petrischale passiert. Das Sieb wurde mehrmals mit einigen Millilitern MEM Medium durchgespült und die erhaltene Suspension mit der Spritze auf- und abgezogen, bevor sie in ein Falcon-Röhrchen auf Eis überführt wurde.

Die Lymphknoten eines Tieres wurden, wenn nicht anders beschrieben, in einem Sieb zusammen verarbeitet. Je nach Versuch wurde teilweise auch eine gemeinsame Einzelzellsuspension aus den gleichen Organen mehrerer Tiere hergestellt.

Die Präparation wurde dem folgenden Versuch entsprechend entweder unter sterilen oder unsterilen Bedingungen durchgeführt.

### **3.2.2 Aufbereitung der Einzelzellsuspension**

Vor jedem Versuch wurden die gewonnenen Einzelzellsuspensionen nach folgendem Protokoll aufbereitet:

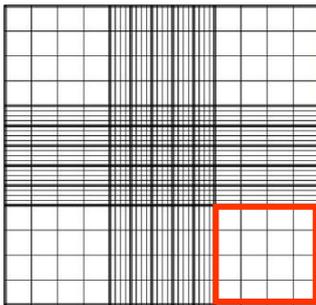
Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1200 Umdrehungen pro Min. (250xg) für fünf Minuten wurde das MEM Medium abgesaugt und pro Falcon-Röhrchen 2 ml 1xErythrozyten-Lysepuffer für zwei Minuten hinzugegeben und sorgfältig vermischt. Auf Grund der Hypoosmolarität des Puffers sind die Erythrozyten als empfindlichste Zellen zu Grunde gegangen, während die anderen Zelltypen nach zwei Minuten im Lysepuffer noch intakt blieben.

Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils etwa 30 ml PBS, bevor schließlich die Zellzahlen in der sogenannten Neubauer-Zählkammer bestimmt wurden.

### 3.2.3 Zellzahl-Bestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden 60  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit der Färbelösung Trypanblau im Verhältnis 1:1 gut durchmischt und wenige  $\mu\text{l}$  dieser Mischung in die Zählkammer eingebracht. Unter einem Mikroskop wurden nun vier große Quadrate innerhalb der Kammer ausgezählt (ein großes Quadrat entspricht 16 kleinen Quadraten, s. Abb. 1). Mittels der Trypanblau-Färbung ist es möglich, zwischen toten und lebenden Zellen zu differenzieren, weil der Farbstoff nur in abgestorbenen Zellen angereichert wird.

Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu erhalten, wurde der Mittelwert der Zellzahlen aus den vier großen Quadraten mit  $10^4$  multipliziert, weil jedes dieser Quadrate ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$  fasst. Außerdem wurde der Verdünnungsfaktor mit der Trypanblau-Lösung bei der Berechnung berücksichtigt.



**Abb. 1:** Neubauer-Zählkammer

Quelle: <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.html>, ©LO Laboroptik

### 3.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur quantitativen Untersuchung von oberflächlichen und intrazellulären Molekülen auf bzw. in Zellen ist die Durchflusszytometrie angewendet worden. Die auch als FACS (fluorescence-activated cell sorting) bezeichnete Methode beruht auf der Messung von Lichtemissionen.

An die zu untersuchenden Moleküle binden Fluorochrom-markierte Antikörper (AK), die nach Laserstimulation unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen. Außerdem ist es möglich, auf Grund des Vorwärtsstreulichts (FSC = forward scatter) und des

Seitwärtsstreulichts (SSC = sideward scatter) Rückschlüsse über die Größe sowie die Granularität der untersuchten Zellen zu ziehen.

Im folgenden Protokoll beinhaltet ein Waschvorgang das Auffüllen des FACS-Röhrchens mit 1 ml FACS-Puffer, Vortexen, Zentrifugation bei 1300 Umdrehungen pro Minute (entspricht 283xg) für drei Minuten und anschließendes Absaugen des Überstandes.

In dieser Arbeit wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l FACS-Puffer pro Ansatz in FACS-Röhrchen resuspendiert. Weitere 50  $\mu$ l der entsprechenden Antikörperlösung wurden hinzugefügt, und es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 8 °C im Dunkeln. Die optimale Antikörper-Konzentration ist entweder vom Hersteller übernommen oder durch Titration ermittelt worden. Bei Gebrauch von biotinylierten und nicht-markierten Antikörpern folgte ein weiterer Färbeschritt mit PE-markiertem Streptavidin bzw. mit einem Fluorochrom-markierten Sekundär-AK nach gleichem Protokoll. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml FACS-Puffer und Abzentrifugieren bei 1300 Umdrehungen pro Minute (entspricht 283xg) für drei Minuten wurden die Zellen in 300  $\mu$ l FACS-Puffer pro Ansatz aufgenommen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

Als Negativkontrollen dienten bei Vorhandensein Antikörper mit gleichem Isotyp, aber anderer Bindungsspezifität, ansonsten ungefärbte Proben. Bei biotinylierten Antikörpern wurde als Negativkontrolle nur mit PE-markiertem Streptavidin gefärbt.

### **3.2.5 Intrazelluläre FACS-Färbung**

Die Zielzellen wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro 50  $\mu$ l FACS-Puffer in FACS-Röhrchen eingestellt. Die Färbung der Oberflächenmarker wurde nach gewohntem Protokoll durchgeführt (s. Kapitel 3.2.4). Nach anschließendem Waschvorgang mit gekühltem FACS-Puffer wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen unter ständigem Vortexen in je 100  $\mu$ l Fixationslösung pro Röhrchen resuspendiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit auf einem Schüttler. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit 1xPermeabilisierungspuffer wurden die Zellen in je 100  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer pro Röhrchen resuspendiert. Die Antikörper für die intrazelluläre Färbung wurden in je 25  $\mu$ l 1xPermeabilisierungspuffer entsprechend

verdünnt und hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit auf einem Schüttler.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml Permeabilisierungspuffer pro Röhrchen gewaschen und schließlich in je 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen.

### **3.2.6 Propidiumjodid-Färbung**

Zunächst erfolgte die Färbung der Oberflächenmoleküle nach bekanntem Protokoll (s. Kapitel 3.2.4).

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,1 %igem  $\text{NaN}_3$ -PBS gewaschen und in je 500 µl PBS pro Ansatz resuspendiert. Es wurden anschließend unter Vortexen jeweils 500 µl 100 % Ethanol zur Fixierung der Zellen hinzugefügt. Nach 20-minütiger Inkubationszeit bei 8 °C im Dunkeln wurden die Proben bei 1300 Umdrehungen pro Minute (entspricht 283xg) für drei Minuten abzentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Die Zellen wurden pro Ansatz in 200 µl einer Propidiumjodid-Lösung bestehend aus PBS mit 0,05 mg/ml Propidiumjodid, 0,1 mg/ml RNase und 0,05 % Triton® X-100 resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von mindestens 20 Minuten bei 8 °C in Dunkelheit. Bei der Messung am Durchflusszytometer wurde für das Propidiumjodid eine lineare Darstellungsweise gewählt.

### **3.2.7 Stimulation von Zellen**

Die Stimulation von Zellen erfolgte mittels PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetat, 5 ng/ml) in Kombination mit Ionomycin (1 µg/ml, zuvor in DMSO gelöst). Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden im FACS-Röhrchen mit PMA und Ionomycin in 1 ml AIM-V Medium für drei bis vier Stunden bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.8 Magnetische NK-Zell-Isolierung (MACS)

Das Prinzip der NK-Zell-Isolierung beruht auf einer AK-vermittelten magnetischen Zellseparation (MACS = magnetic-activated cell separation). Hierfür werden Eisenoxid-haltige Magnetpartikel, sogenannte Micro-Beads, die an spezifische AK gebunden sind, benutzt. Diese AK binden an bestimmte Oberflächenmoleküle einer heterogenen Zellsuspension, die auf allen Zellen außer den zu isolierenden zu finden sind. Durchläuft diese Zellsuspension nun eine Säule innerhalb eines starken Magnetfeldes, so werden die markierten Zellen zurückgehalten, während man die nicht-markierten Zielzellen unter der Säule auffängt. Man spricht dabei von einer negativen Separation. In der vorliegenden Arbeit wurde zur NK-Zell-Isolierung das Protokoll der Firma Miltenyi Biotec angewendet. Die heterogene Zellsuspension aus der Milz wurde mit 40 µl MACS-Puffer und 10 µl einer AK-Mischung pro  $1 \times 10^7$  Zellen für zehn Minuten bei 8 °C im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Zugabe von je 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Micro-Bead-Lösung pro  $1 \times 10^7$  Zellen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten bei 8 °C im Dunkeln wurden die Proben mit je 1-2 ml MACS-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml MACS-Puffer pro Ansatz aufgenommen und durchliefen den MACS-Separator durch eine LS-Säule, die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer durchgespült worden war. Die Bead-markierten Zellen blieben somit im Magnetfeld zurück, die Suspension mit den nicht-markierten Zielzellen wurde unter der Säule in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurde jede Säule nochmals mit 3x3 ml MACS-Puffer durchgespült, um unspezifisch gebundene Zellen aus der Säule zu entfernen.

Die Reinheit der isolierten NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch kontrolliert und erreichte im besten Fall bis zu 90 %.

### 3.2.9 Zytotoxizitätsversuche

Zur Quantifizierung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität wurden Chromfreisetzungsversuche durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Freisetzung von zuvor aufgenommenem  $^{51}\text{Cr}$  (Cr) aus abgestorbenen Zellen. Es fungierten NK-Zellen als Effektor- und Zellen der Lymphom-Zelllinie YAC-1 als Zielzellen.

Für einen solchen Versuch wurden zunächst die Milzen aus WT- und c-myc-Tieren entnommen und NK-Zellen aus ihnen immunmagnetisch isoliert (s. Kapitel 3.2.8). Für bestimmte Fragestellungen wurden die NK-Zellen anschließend über vier Stunden mit Ionomycin und PMA in AIM-V Medium stimuliert (s. Kapitel 3.2.7). Sie wurden dann in einer Verdünnungsreihe von  $2,5 \times 10^5$ ,  $1,25 \times 10^5$ ,  $6,25 \times 10^4$ ,  $3,125 \times 10^4$ ,  $1,5625 \times 10^4$  und  $7,8125 \times 10^3$  Zellen pro Loch in einer 96-Loch-Platte verteilt. Es wurden jeweils drei Proben von einer Verdünnung angefertigt.

Die YAC-1-Zellen wurden zunächst in einer Konzentration von  $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  100 %igem FKS 90 Minuten lang bei  $37^\circ\text{C}$  mit radioaktivem  $^{51}\text{Cr}$  inkubiert, um das Isotop ins Zytoplasma aufzunehmen. Es folgten zwei Waschschrte mit RPMI Medium (10 % FKS), um ungebundenes Chrom zu entfernen. Nun wurden jeweils  $1 \times 10^6$  der Zielzellen in einem Volumen von  $50 \mu\text{l}$  zu den Effektorzellen in die 96-Loch-Platte gemischt.

Nach einer vierstündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und anschließender Zentrifugation wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  Kulturüberstand pro Loch vorsichtig entnommen und auf eine 96-Loch-Leseplatte übertragen. Zusätzlich zu den Überständen aus den Ko-Kulturen wurde auch der Überstand aus Medium entnommen, das nur die markierten Zielzellen enthielt, um die spontane Chromfreisetzung ermitteln zu können. Außerdem wurden auch markierte Zielzellen direkt auf die Leseplatte überführt, die die maximale Radioaktivität ausstrahlten.

Es folgte die Messung der freigesetzten Radioaktivität und anschließend die Berechnung der spezifischen Lyse in % nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{gemessene Radioaktivität} - \text{spontane Radioaktivität}}{\text{maximale Radioaktivität} - \text{spontane Radioaktivität}} \times 100$$

### 3.2.10 BrdU-Messung

Die Untersuchung der In-vivo-Proliferation von NK-Zellen erfolgte mit Hilfe von Bromdesoxyuridin (BrdU). Dieses Thymidinanalogon wird während der DNS-Synthese von der DNS-Polymerase in den neuen Strang inkorporiert und kann anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Im vorliegenden Versuch wurden den Mäusen jeweils 2 mg BrdU in einem Volumen von  $200 \mu\text{l}$  PBS intraperitoneal injiziert. Nach 72 Stunden wurden die Milzen und

Lymphknoten entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt (s. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2).

Die darauffolgende Färbung erfolgte nach dem Protokoll der Firma BD Pharmingen.

Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l FACS-Puffer pro Ansatz aufgenommen und nach gewohntem Protokoll eine Oberflächenfärbung mit Anti-NK1.1-Antikörper durchgeführt (s. Kapitel 3.2.4).

Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l BD Cytofix/Cytoperm Puffer resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml BD Perm/Wash Puffer wurden die Zellen in 100  $\mu$ l BD Cytoperm Plus Puffer für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Waschschrift wurden die Zellen in 100  $\mu$ l BD Cytofix/Cytoperm Puffer aufgenommen und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Erneut wurden die Zellen gewaschen und anschließend in 100  $\mu$ l DNase-Lösung (300  $\mu$ g DNase/ml PBS) resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen wieder mit BD Perm/Wash Puffer gewaschen. Zur anschließenden Färbung des BrdU wurden pro Ansatz 50  $\mu$ l der AK-Lösung (Verdünnung des AK mit BD Perm/Wash Puffer im Verhältnis 1:50) hinzugefügt und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 500  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer mit einer Geschwindigkeit von 400-600 Ereignissen pro Sekunde gemessen.

### 3.2.11 CFSE-Markierung

CFSE steht für Carboxyfluorescein-Succinimidylester und ist eine zunächst farblose Substanz. Nach Diffusion in das Zytoplasma wird sie von intrazellulären Esterasen in eine fluoreszierende Substanz umgewandelt. Diese Eigenschaft wurde zur Markierung von Zellen genutzt.

$1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml PBS mit 3 bis 6  $\mu$ M CFSE resuspendiert und für acht Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Optional wurden im Anschluss 200  $\mu$ l FKS pro ml PBS dazugegeben. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS.

### 3.2.12 Gewinnung von Überständen

Zur Gewinnung von Überständen wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen aus WT- oder c-myc-Lymphknoten in 200  $\mu\text{l}$  AIM-V Medium pro Loch auf einer 96-Loch-Platte mit Rundboden verteilt. Diese wurde für 48-56 Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 1300 Umdrehungen pro Minute (entspricht  $283 \times g$ ) für fünf Minuten abzentrifugiert. Vorsichtig wurden aus jedem Loch 100  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen und in Eppendorf-Röhrchen bei -20 °C gelagert.

### 3.2.13 Migrationsversuche

Das In-vitro-Migrationsverhalten von NK-Zellen wurde mittels eines Zweikammersystems untersucht. Als Medium wurde hier AIM-V Medium verwendet. Eine 24-Loch-Platte wurde zunächst mit je 400-500  $\mu\text{l}$  Medium mit oder ohne Zellen befüllt und anschließend mit Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 5,0  $\mu\text{m}$  bestückt. In die somit entstandene obere Kammer wurden je nach gewonnener Zellzahl  $0,2-0,5 \times 10^6$  magnetisch separierte und CFSE-markierte WT- oder c-myc-NK-Zellen (s. Kapitel 3.2.8 und 3.2.11) in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  Medium hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 45-90 Minuten bei 37 °C, wobei die letzten drei Minuten auf einem Schüttler erfolgten, um am Sieb haftende Zellen abzulösen. Anschließend wurden aus der unteren Kammer mittels reversen Pipettierens je 100  $\mu\text{l}$  in ein FACS-Röhrchen übertragen. Es wurden je 100  $\mu\text{l}$  CALTAG „Counting Beads“ mittels reversen Pipettierens hinzugefügt. „Counting Beads“ dienen der exakten quantitativen Bestimmung der migrierten Zellen. Sie enthalten eine vom Hersteller definierte Anzahl an Partikeln mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzen und Dichten (A-Beads und B-Beads). Die absolute Zahl der aus der oberen in die untere Kammer gewanderten Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Absolute Zellzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl der gewanderten Zellen}}{\text{A-Beads} + \text{B-Beads}} \times \text{Anzahl der Beads}/\mu\text{l}$$

Es war darauf zu achten, dass die „Counting Beads“ vor Zugabe für 45 Sekunden gründlich manuell durchmischt wurden. Das Mischverhältnis der beiden Bead-Populationen konnte bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung beurteilt werden.

Der genaue Versuchsaufbau variierte in Abhängigkeit von der Fragestellung:

#### Migrationsversuch zum Vergleich des Wanderungsverhaltens von WT- und c-myc-NK-Zellen zum Tumorlymphknoten

In der unteren Kammer befanden sich jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen aus WT- bzw. c-myc-Lymphknoten in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  Medium oder nur 500  $\mu\text{l}$  Medium ohne Zellen als Negativkontrolle. In der oberen Kammer befanden sich jeweils  $0,2-0,5 \times 10^6$  isolierte und CFSE-markierte NK-Zellen aus WT- oder c-myc-Milzen.

#### Migrationsversuch mit neutralisierenden Anti-CXCL9- und Anti-CXCL10-AK

In der unteren Kammer befanden sich entweder 400  $\mu\text{l}$  Medium als Negativkontrolle, 300  $\mu\text{l}$  Medium + 100  $\mu\text{l}$  Tumorüberstand oder 100  $\mu\text{l}$  Medium + 100  $\mu\text{l}$  Tumorüberstand + 200  $\mu\text{l}$  AK-Lösung mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Medium. In der oberen Kammer befanden sich  $0,2-0,5 \times 10^6$  isolierte WT- oder c-myc-NK-Zellen. Da nicht auszuschließen war, dass die Überstände nicht gänzlich zellfrei waren, wurden die isolierten Zellen auch hier mit CFSE markiert.

#### Migrationsversuch mit rekombinantem CXCL9 und CXCL10

In der unteren Kammer befanden sich jeweils 500  $\mu\text{l}$  Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an CXCL9 oder CXCL10. Meist wurden Titrationsreihen mit 1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng und 0 ng angefertigt. Bei einigen Ansätzen wurden auch beide Chemokine zusammen in einer Kammer eingesetzt. In der oberen Kammer befanden sich isolierte WT-NK-Zellen. Diese wurden nicht mit CFSE markiert, weil sie in zellfreies Medium gewandert sind.

### 3.2.14 Multiplex-Analyse

Beim Multiplex-System kann eine Vielzahl von Antigenen im Untersuchungsmedium in einem Messansatz nachgewiesen werden. Dies wird durch verschiedene Partikelpopulationen ermöglicht, die sich in ihrer Größe sowie dem Verhältnis zweier Eigenfluoreszenzen unterscheiden.

Zunächst bindet ein Antikörper spezifisch an das zu untersuchende Antigen. Dieser Antikörper ist kovalent an ein Partikel einer bestimmten Population gebunden. Über das Verhältnis der zwei Fluoreszenzen des Partikels kann beim Messen die Qualität des Analyten bestimmt werden. Die Quantität des Analyten wird mittels eines zweiten, sogenannten Detektions-Antikörpers ermittelt, der auch spezifisch an das Antigen bindet. Dieser Antikörper ist biotinyliert, weswegen die Bindung im nächsten Schritt mittels Streptavidin-Phycoerythrin quantifiziert werden muss. Zur genauen Quantifizierung der Analyten verwendet man Standardkurven, die mit Hilfe von Standardkonzentrationen des Antigens erstellt werden.

In dieser Arbeit wurden mehrere Chemokine sowie Zytokine auf diese Weise in Kulturüberständen bestimmt. Der genaue Versuchsablauf folgte den Herstellerprotokollen, die sich geringfügig unterschieden.

Als Negativkontrolle diente AIM-V Medium, in dem auch die Überstände kultiviert worden waren (s. Kapitel 3.2.12).

Folgende Chemokine und Zytokine wurden gemessen:

**Tab. 4: Analyten für Multiplex-Untersuchungen**

Analyten (Synonym)	Kit	Firma
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) CCL5 (Rantes) CXCL9 (MIG) CXCL10 (IP10)	Milliplex Mouse Chemokine Immunoassay	Millipore, Schwalbach
CX3CL1 (Fractalkine)	Milliplex Mouse Chemokine Panel II Kit	Millipore, Schwalbach
IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF	Bio-Plex Mouse Cytokine Th1/Th2 Assay	Bio-Rad, München

### 3.2.15 ELISA

Die quantitative Bestimmung einiger Chemokine und Zytokine wurde mit Hilfe der ELISA-Methode durchgeführt. ELISA steht für enzyme-linked immunosorbent assay und basiert auf Antigen-Antikörper-Bindungen mit anschließender Enzymreaktion. Eine Mikrotiterplatte wird zunächst mit einem sogenannten Fänger-AK beschichtet, der ein bestimmtes Antigen (AG) erkennt, das anschließend in einem Untersuchungsmedium hinzugegeben wird. Es bindet daraufhin ein zweiter spezifischer sogenannter Detektions-AK an das Antigen. Man spricht auch vom „Sandwich-System“, weil das zu untersuchende AG nun zwischen den beiden AK gebunden vorliegt. Schließlich kann auf Grund einer enzymatischen Farbumschlagsreaktion die AG-Konzentration im Photometer ermittelt werden. Zur Orientierung werden Standardkurven mit definierten AG-Konzentrationen erstellt.

Der Versuchsablauf erfolgte nach dem Protokoll der Firma R&D zur Messung von murinem CCL19, CCL21 und TGF- $\beta$ . Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Zum Waschen wurde der ELISA-Waschpuffer in einem Volumen von 400  $\mu$ l pro Loch verwendet, und zwischen jedem Waschschrift wurde die Platte kräftig auf Papiertüchern ausgeklopft. Alle Volumenangaben beziehen sich im folgenden Protokoll auf ein Loch.

Zu Beginn wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 100  $\mu$ l der Fänger-AK-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 300  $\mu$ l Blockpuffer eine Stunde lang inkubiert, und anschließend wurde erneut dreimal gewaschen. Es folgte die Zugabe der Standards und der zu untersuchenden Überstände in einem Volumen von 100  $\mu$ l. Nach zweistündiger Inkubationszeit auf dem Schüttler wurde dreimal gewaschen, der Detektions-AK in je 100  $\mu$ l Blockpuffer hinzugegeben und zwei Stunden lang geschüttelt inkubiert. Es wurde erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase) hinzugefügt und 20 Minuten lang inkubiert. Nach drei Waschschriften wurden 100  $\mu$ l Substratlösung hinzugegeben. Die nachfolgende Inkubationszeit wurde nach 20 Minuten mit 50  $\mu$ l Stopplösung beendet. Die Platte wurde vorsichtig geschüttelt, und schließlich erfolgte die Messung am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Als Negativkontrolle diente AIM-V Medium, in dem auch die Überstände kultiviert worden waren (Kapitel 3.2.12).

### 3.2.16 Immunhistologie

Zur histologischen Darstellung von Geweben wurden die benötigten Organe nach Präparation zunächst in kleinen Plastikbehältern (1x1x1 cm) in „Tissue Tek“ eingebettet und bei -20 °C eingefroren, bevor sie etwa 24 Stunden später bei -80 °C gelagert wurden.

Am Kryotom wurden Schnitte mit einer Dicke zwischen 5 und 8 µm angefertigt und auf Objektträgern 24 Stunden luftgetrocknet und dann ebenfalls bei -80 °C gelagert. Drei Stunden vor Beginn einer Färbung wurden die Schnitte luftgetrocknet.

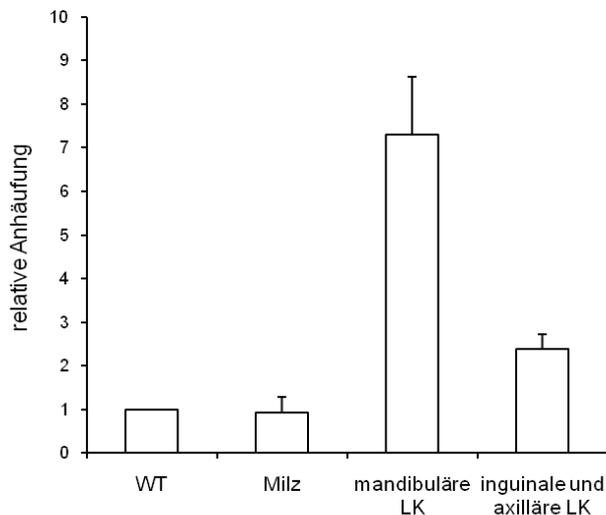
Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift lückenlos umrandet. Im Folgenden durfte der Fettrand nicht von Flüssigkeit überschritten werden. Alle folgenden Schritte wurden in einer Feuchtkammer durchgeführt, die Inkubationen erfolgten im Dunkeln bei Raumtemperatur ebenfalls in der Feuchtkammer. Die umrandeten Schnitte wurden zehn Minuten lang in Aceton fixiert und anschließend folgten drei Waschschriffe mit PBS innerhalb der Fettumrandung. Es wurde dann der in PBS verdünnte Primär-AK mit einem Volumen von ca. 100 µl pro Schnitt aufgetragen und 60 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der Sekundär-AK aufgetragen, der zuvor in PBS mit Eselserum (10:1) verdünnt worden war. Es folgte eine 45-minütige Inkubation. Nach drei Waschschriffen wurde je nach Bedarf in PBS verdünntes Streptavidin aufgetragen und 20 Minuten inkubiert. Nach drei weiteren Waschgängen mit PBS wurden die Schnitte eine Minute lang mit DAPI (1 µl in 30 ml PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und dann für eine Minute in einer Küvette mit destilliertem Wasser auf den Schüttler gestellt. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mittels Eindeckmedium vorsichtig mit einem Deckglas versehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 NK-Zellen akkumulieren in Tumorlymphknoten

Zu Beginn der Arbeit stand die Frage, wie sich die absolute Anzahl an NK-Zellen in den Tumorlymphknoten von c-myc-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtypen (WT) verhält. In einem Lymphknoten einer gesunden Maus beträgt der prozentuale Anteil an NK-Zellen durchschnittlich 1 %, was einer absoluten Zellzahl von etwa 2000 NK-Zellen pro Lymphknoten entspricht. Es wurden WT- sowie Tumorlymphknoten zunächst gewogen und dann die Zellzahlen der Einzelzellsuspensionen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. Kapitel 3.2.2 und 3.2.3). Anschließend wurde der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>+</sup>-Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Der relative Anteil an NK-Zellen in den Tumorlymphknoten war in den meisten Tieren erniedrigt. Auf Grund der massiven B-Zell-Infiltration in den tumorösen Organen waren diese Werte jedoch nicht aussagekräftig. Deswegen wurden aus den gewonnenen Daten die absoluten Zellzahlen an NK1.1<sup>+</sup>-Zellen pro Lymphknoten sowie pro Gramm Lymphknotengewebe berechnet.

Abbildung 2 zeigt, dass die absolute Anzahl NK1.1<sup>+</sup>-Zellen pro Gramm Lymphknotengewebe im Tumor verglichen mit WT-Lymphknoten erhöht ist. In den inguinalen und axillären Lymphknoten von c-myc-Mäusen waren durchschnittlich doppelt so viele NK-Zellen zu finden wie in WT-Lymphknoten. In den submandibulären Lymphknoten von c-myc-Mäusen, am primären Entstehungsort des Tumors, lag sogar eine durchschnittlich siebenfache Anhäufung vor. Wie zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, sieht man keine Akkumulation von NK-Zellen in den Milzen von c-myc-Mäusen (Brenner et al. 2010), auch wenn eine stark ausgeprägte Splenomegalie vorliegt.



**Abb. 2: Relative Anhäufung von NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in WT- und c-myc-Organen**

Die absolute Anzahl an NK1.1<sup>+</sup>-Zellen wurde pro Gramm Milz- bzw. Lymphknotengewebe berechnet. Die Mittelwerte der Absolutzahlen aus den c-myc-Organen wurden ins Verhältnis zu den WT-Organen gesetzt. Die Abbildung zeigt die Relativwerte (WT=1) mit Standardabweichungen.

*Modifiziert nach: Brenner et al. 2010*

Ausgehend von dieser Beobachtung, dass in den Lymphknoten, am Ort des Tumorgeschehens, eine deutliche Akkumulation von NK-Zellen stattfindet, ergaben sich hauptsächlich zwei Fragen:

1. Wodurch sind diese NK-Zellen charakterisiert?
2. Wodurch kommt es zur Akkumulation von NK-Zellen im Tumorgewebe?

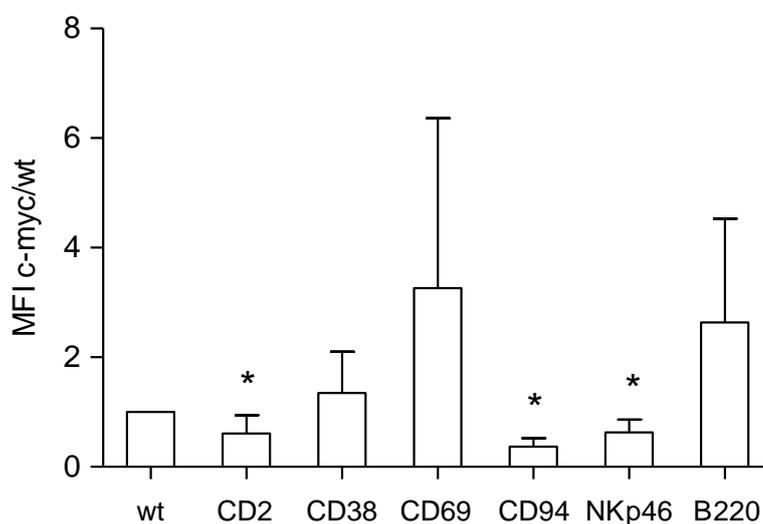
#### 4.2 NK-Zellen zeigen Aktivierungszeichen

Die Charakterisierung der NK-Zellen aus Tumormäusen umfasste zunächst die Phänotypisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Es wurden einige extra- sowie intrazelluläre Moleküle gemessen und deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) stets in Relation zu den Werten aus WT-Mäusen gesetzt.

Es wurden die Oberflächenmoleküle CD2, CD38, CD69, CD94, B220 (CD45R) und NKp46 auf NK-Zellen gemessen. CD2 ist der Rezeptor für CD48 und wird auf B-, T- und NK-Zellen sowie auf Thymozyten exprimiert. Die Hauptfunktion dieses Moleküls

ist die Adhäsion und T-Zell-Aktivierung. CD38 fungiert als Rezeptor für CD31 und ist unter anderem auf NK-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und aktivierten T-Zellen zu finden. Es handelt sich um eine ADP-Ribosylzyklase, die der Zellaktivierung dient. CD94 ist assoziiert mit NKG2A als inhibitorischer Komplex auf NK-Zellen und T-Zell-Subpopulationen zu finden. NKp46 ist neben NKp30 und NKp44 ein natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor. Das auch als CD335 bekannte Molekül ist NK-Zell-spezifisch und aktiviert NK-Zellen unabhängig von MHC-Molekülen. B220 (CD45R) und CD69 beeinflussen die Signaltransduktion und werden auf B-, T- und NK-Zellen exprimiert. Vor allem CD69 zeigt einen aktivierten Zustand der Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt an.

Aus Abbildung 3 geht die Kombination der Hoch- bzw. Herunterregulation der untersuchten Oberflächenmarker auf NK-Zellen aus Tumorlymphknoten hervor. Unter Berücksichtigung weiterer Moleküle (CD49b, NKG2D, Ly49D und Ly49I), die zuvor bereits auf NK-Zellen aus Lymphknoten sowie Milzen gemessen worden sind (Brenner et al. 2010), deutet dieses Expressionsmuster auf einen aktivierten Zustand der NK-Zellen hin.



**Abb. 3: FACS-Analyse: Mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) von Oberflächenmarkern auf NK1.1<sup>+</sup>-Zellen aus WT- und c-myc-Lymphknoten**

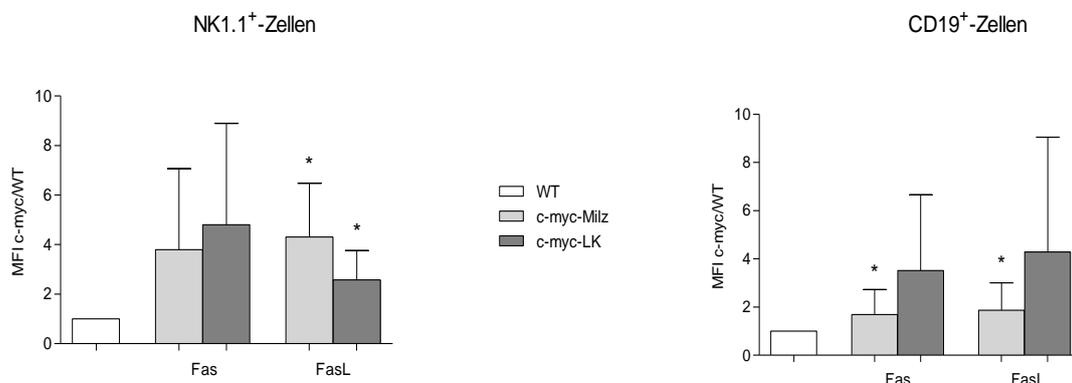
Die Abbildung zeigt die Relativwerte der mittleren Fluoreszenzintensitäten (WT=1) mit Standardabweichungen.

Signifikante Unterschiede der Oberflächenmarker auf c-myc-NK-Zellen gegenüber WT-NK-Zellen sind mit \* markiert (\*p<0,05)

### 4.3 NK-Zellen zeigen gestörte Effektorfunktionen

Wie unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte, verlieren NK-Zellen im Verlauf der Tumorgenese die Fähigkeit zur IFN- $\gamma$ -Produktion sowie ihre Lysekapazität (Brenner et al. 2010). Es sollten nun mögliche Gründe dieser Funktionseinschränkung, die trotz aktivierten Phänotyps vorliegt, untersucht werden.

NK-Zellen sind in der Lage, über verschiedene Wege virusinfizierte und entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Ein Weg führt über Interaktionen zwischen sogenannten „Todesrezeptoren“ auf der Zielzelle und ihren Liganden auf der Effektorzelle zum programmierten Zelltod der Zielzelle. Ein solcher „Todesrezeptor“ ist beispielsweise Fas (CD95). Dieser induziert nach Bindung von Fas-Ligand die Caspase-abhängige Apoptose der Zielzelle. Um mögliche Expressionsunterschiede von Fas und Fas-Ligand als Ursache der Zytotoxizitätsminderung von NK-Zellen in Tumormäusen zu untersuchen, folgte die durchflusszytometrische Messung dieser beiden Moleküle auf NK-Zellen sowie auf B-Zellen.



**Abb. 4: FACS-Analyse: Mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) von Fas und Fas-Ligand auf NK1.1<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Zellen**

Die Abbildung zeigt die Relativwerte der Fluoreszenzintensitäten (WT=1) mit Standardabweichungen.

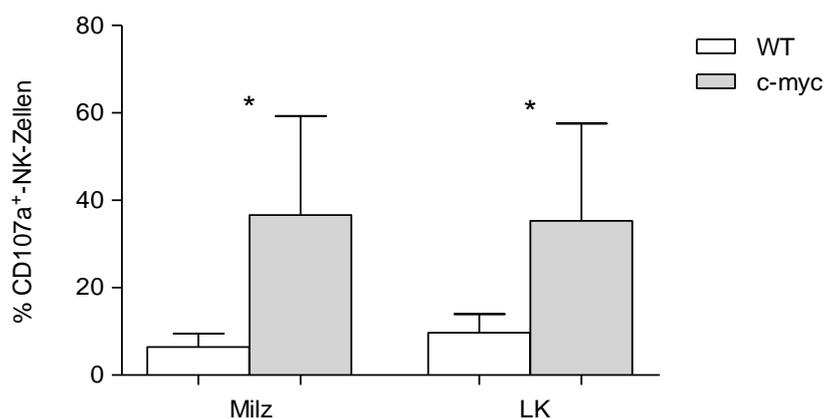
Signifikante Unterschiede der MFI aus c-myc-Organen gegenüber WT-Organen ist mit \* gekennzeichnet (\* $p < 0,05$ ).

Wie in Abbildung 4 zu sehen, ergaben die Messungen, dass sowohl Fas als auch Fas-Ligand auf NK-Zellen aus Tumormäusen stärker exprimiert wurden als auf WT-NK-Zellen. Auf den Tumorzellen waren ebenfalls beide Moleküle in höherem Maße auf der

Oberfläche messbar als auf B-Zellen aus WT-Mäusen. Dieses Ergebnis zeigt, dass fehlende Fas- und Fas-Ligand-Moleküle nicht ursächlich für den Zytotoxizitätsverlust von NK-Zellen sind.

Ein anderer Weg zur Elimination von Zielzellen durch NK-Zellen beruht auf der Degranulation von NK-Zellen. NK-Zellen besitzen intrazelluläre Kompartimente, die mit lytischen Enzymen gefüllt sind. Zu diesen Enzymen gehören unter anderem Perforin und verschiedene Granzyme, die als Serinproteasen fungieren und so Zielzellen zerstören können. Die zytolytischen Granula werden auf bestimmte Signale hin extrazellulär entleert und die darin enthaltenen Enzyme freigesetzt.

Zur Überprüfung einer bereits stattgefundenen Degranulation wurde im Durchflusszytometer das Molekül CD107a (LAMP-1, lysosomal-associated membrane proteins 1) auf der Zelloberfläche gemessen. CD107a befindet sich im Zellinneren an der Innenseite von Lysosomen und anderen Granula und wird an die Oberfläche der Zelle transportiert, sobald eine Degranulation und somit eine Verschmelzung der Lysosomen mit der Zellmembran stattgefunden hat. Es wurde der prozentuale Anteil an CD107a<sup>+</sup>-NK-Zellen in Milz und Lymphknoten bestimmt. In beiden Organen stieg der Anteil von weniger als 10 % auf fast 40 % an (s. Abb. 5).

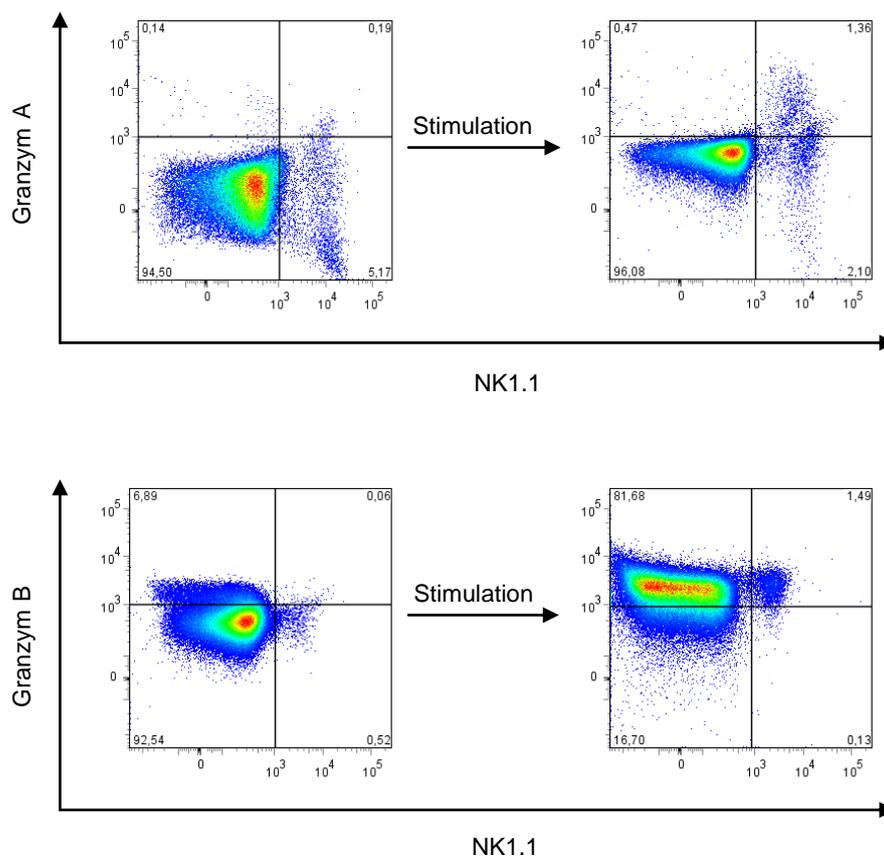


**Abb. 5: FACS-Analyse: Prozentualer Anteil der CD107a<sup>+</sup>-NK-Zellen in Milz und Lymphknoten (LK) von WT- und c-myc-Mäusen**

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT- und c-myc-Organen sind mit \* gekennzeichnet (\*p < 0,05).

Dies bedeutet, dass in den Tumormäusen ein erheblicher Teil der NK-Zellen bereits degranuliert ist. Zum Ausschluss eines Mangels an zytolytischen Enzymen als mögliche Ursache des Effektorfunktionsverlustes sollte nun der Füllungszustand der noch vorhandenen Granula überprüft werden.

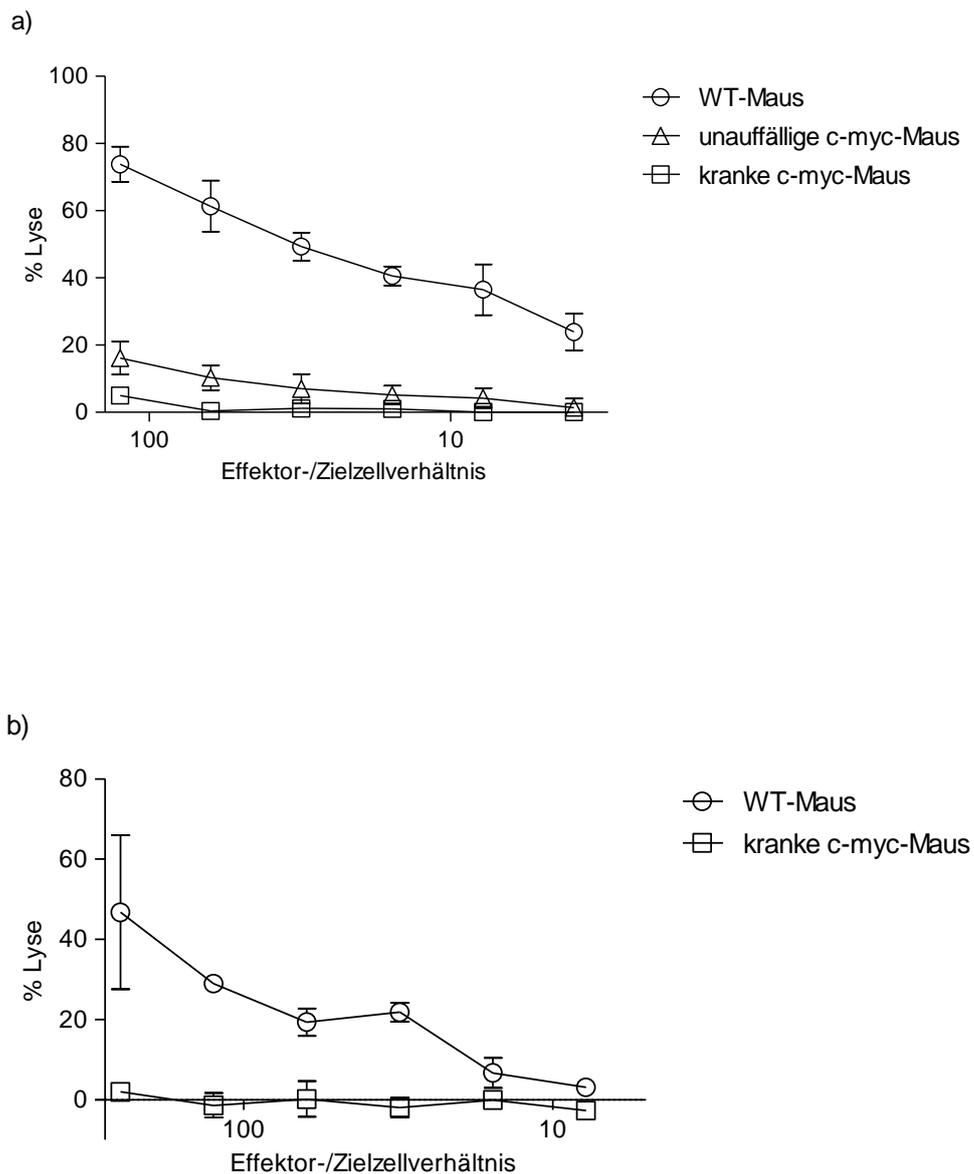
Es wurden Granzym A und Granzym B sowie Perforin mittels intrazellulärer FACS-Färbung untersucht (s. Kapitel 3.2.5). Da ex vivo nur geringe Mengen in den NK-Zellen aus WT- sowie c-myc-Mäusen detektierbar waren, wurde überprüft, wieweit sich die Granula durch Stimulation mit Ionomycin und PMA wieder auffüllen ließen. Nach der Stimulation konnten höhere MFI-Werte gemessen werden, in c-myc- und WT-NK-Zellen war der Stimulationseffekt vergleichbar. Die Werte ergaben keine relevanten Unterschiede zwischen NK-Zellen aus Milz und Lymphknoten. Abbildung 6 zeigt exemplarisch den Anstieg von Granzym A und Granzym B nach Stimulation in c-myc-NK-Zellen aus der Milz.



**Abb. 6: FACS-Analyse: Granzym A und Granzym B in c-myc-NK-Zellen aus der Milz mit und ohne Stimulation**

Die Stimulation erfolgte mit Ionomycin und PMA für vier Stunden bei 37 °C.

Dass die zytolytischen Granula sich nach Stimulation mit Perforin, Granzym A und Granzym B auffüllen ließen, führte zu der Vermutung, dass die c-myc-NK-Zellen in vivo erschöpft waren, aber durch starke Stimulation ihr Lysevermögen wiedererlangen könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Chromfreisetzungsversuch mit isolierten NK-Zellen nach Stimulation mit Ionomycin und PMA durchgeführt.



**Abb. 7: Chromfreisetzungsversuche**

Als Zielzellen dienten Zellen der Lymphom-Zelllinie YAC-1.

**a) ohne Stimulation von NK-Zellen** (modifiziert nach: Brenner et al. 2010)

**b) nach Stimulation von WT- und c-myc-NK-Zellen**

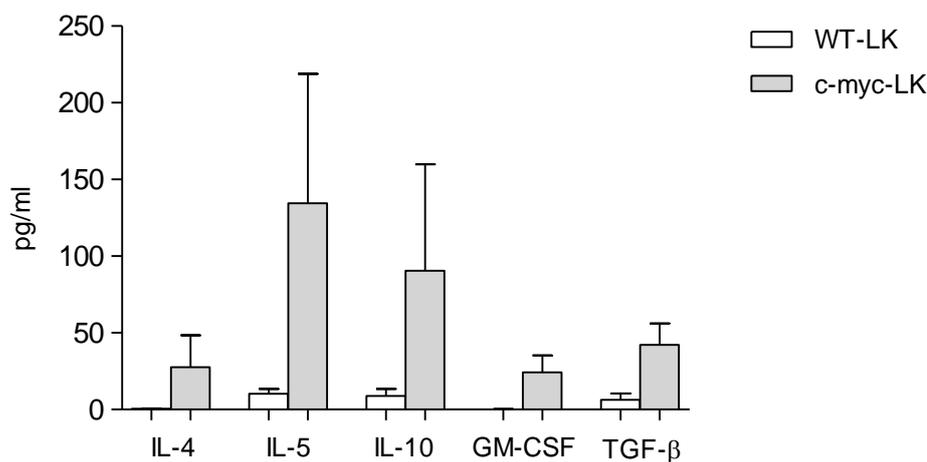
Die Stimulation erfolgte mit Ionomycin und PMA für vier Stunden bei 37 °C.

Vor Stimulation zeigten NK-Zellen aus Tumor-tragenden c-myc-Milzen keine effektive Zytotoxizität, während NK-Zellen aus klinisch noch unauffälligen transgenen Mäusen durchaus noch in der Lage waren, eine geringe Lyseaktivität aufzuweisen (s. Abb. 7a, Brenner et al. 2010).

Durch Stimulation von c-myc-NK-Zellen konnte die Zytotoxizität nicht wiederhergestellt werden (s. Abb. 7b).

#### 4.4 Zytokinprofil im Tumorgewebe

Zytokine stellen eine Gruppe von löslichen Faktoren dar, die als regulatorische Peptide der Kommunikation und Interaktion von Zellen dienen. Da einige Zytokine wie z. B. IL-4 auch zytotoxizitätsmindernd auf NK-Zellen wirken können (Brady et al. 2010), wurde eine Auswahl wichtiger Zytokine mit Hilfe der Multiplex-Analyse in den Überständen von WT- und Tumorlymphknoten untersucht (s. Kapitel 3.2.14). Zur Gewinnung der Überstände wurden Zellen aus WT- oder c-myc-Lymphknoten für 48-56 Stunden bei 37 °C kultiviert.



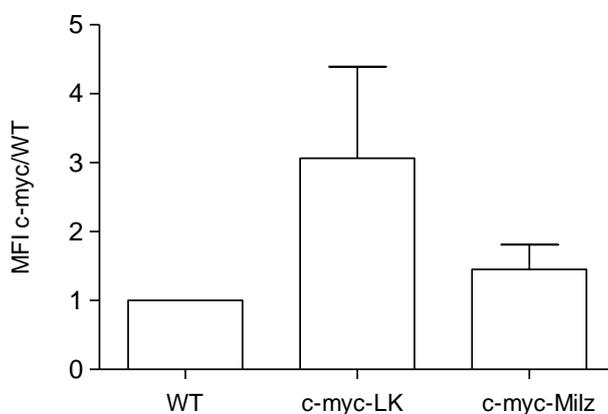
**Abb. 8: Multiplex-Analyse und ELISA: Zytokine in Überständen von WT- und c-myc-LK**  
Die Abbildung zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

In Abbildung 8 lässt sich ein Anstieg der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und GM-CSF in den Überständen aus Tumorlymphknoten im Vergleich zu WT-Lymphknoten erkennen. Dieses Zytokinprofil entspricht einem Th2-Milieu. Die Messung der typischen Th1-Zytokine IL-2, IL-12p70, TNF und IFN- $\gamma$  ergab sowohl in den Überständen aus c-myc- als auch aus WT-Lymphknoten sehr niedrige Konzentrationen unter 10 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

Eine zentrale Rolle bei der Immunantwort kommt dem Zytokin TGF- $\beta$  zu (Ikushima und Miyazono 2011). Als multifunktionales Signalpeptid induziert es unter anderem regulatorische T-Zellen und wirkt inhibitorisch auf Th1-Zellen. Die ELISA-Messung in Lymphknoten-Überständen zeigt einen deutlichen Anstieg von TGF- $\beta$  im Tumorgewebe verglichen mit WT-Lymphknoten.

#### 4.5 Zelluläre Herkunft des TGF- $\beta$

Als nächstes stellte sich die Frage nach der zellulären Herkunft des TGF- $\beta$ . Regulatorische T-Zellen als wahrscheinlichste Quelle dieses Zytokins sind in den untersuchten Tumoren zwar in sehr hoher Anzahl vorhanden, sie produzieren jedoch kein TGF- $\beta$  (Brenner et al. 2010). Intrazelluläre FACS-Messungen ergaben einen erhöhten Gehalt an TGF- $\beta$  in NK-Zellen (s. Abb. 9) sowie in dendritischen Zellen (M. Naujoks, persönliche Mitteilung) aus Tumorlymphknoten.



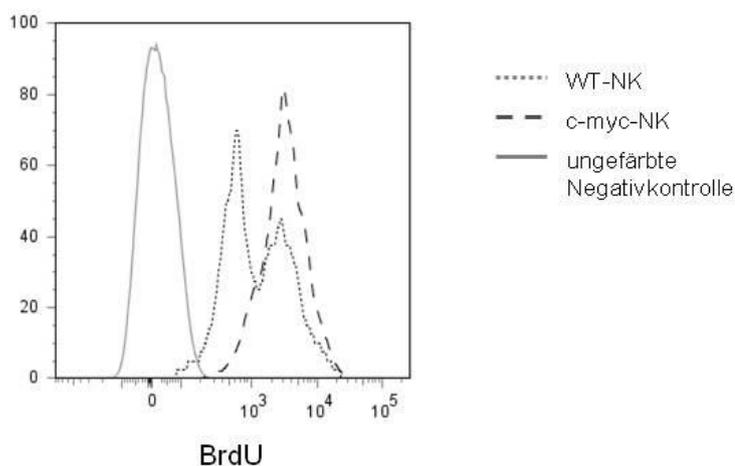
**Abb. 9: FACS-Analyse: TGF- $\beta$  in NK1.1<sup>+</sup>-Zellen aus WT- und c-myc-Mäusen**  
Die Abbildung zeigt die Relativwerte (WT=1) mit Standardabweichungen.

#### 4.6 NK-Zellen proliferieren in Tumorlymphknoten

Hinsichtlich der bereits erwähnten ausgeprägten Akkumulation von NK-Zellen in Tumorlymphknoten (s. Kapitel 4.1) gab es folgende mögliche Erklärungsansätze:

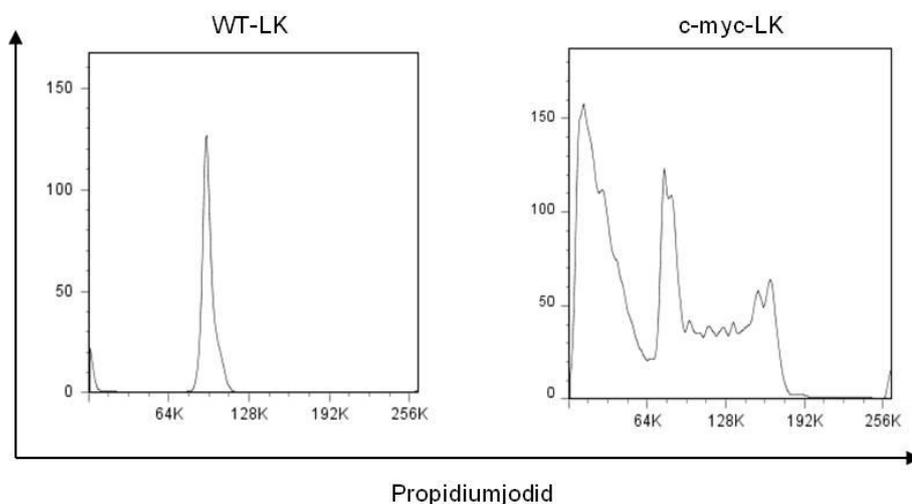
1. NK-Zellen proliferieren im Tumorgewebe verstärkt.
2. NK-Zellen wandern verstärkt in das Tumorgewebe ein.

Zunächst wurde die Proliferation von NK-Zellen, die aus Tumorlymphknoten isoliert wurden, *in vivo* mit Hilfe von Bromdesoxyuridin (BrdU) untersucht. Hierfür wurde WT-Mäusen und *c-myc*-Mäusen, die sich im Anfangsstadium ihrer Erkrankung befanden, das Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin intraperitoneal injiziert. BrdU wird während der Synthesephase in die DNS eingebaut und ist somit ein indirektes Maß für den DNS-Gehalt von Zellen. Nach 72 Stunden wurden den Tieren die Milzen und Lymphknoten entnommen und die Zellen mit Antikörpern gegen BrdU sowie NK1.1 gefärbt und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Abbildung 10 zeigt, dass die NK-Zellen aus Tumorlymphknoten mehr BrdU inkorporiert haben als NK-Zellen aus WT-Lymphknoten. Für NK-Zellen aus den Milzen wurde das gleiche Resultat erzielt (Daten nicht gezeigt). Die gesteigerte Inkorporation von BrdU deutet auf eine verstärkte Proliferation der NK-Zellen im Tumorlymphknoten hin.



**Abb. 10: FACS-Analyse: BrdU-Inkorporation in NK1.1<sup>+</sup>-Zellen aus WT- und *c-myc*-Lymphknoten**  
Die Organe wurden 72 Stunden nach i.p.-Injektion von 2 mg BrdU in 200  $\mu$ l PBS pro Tier entnommen.

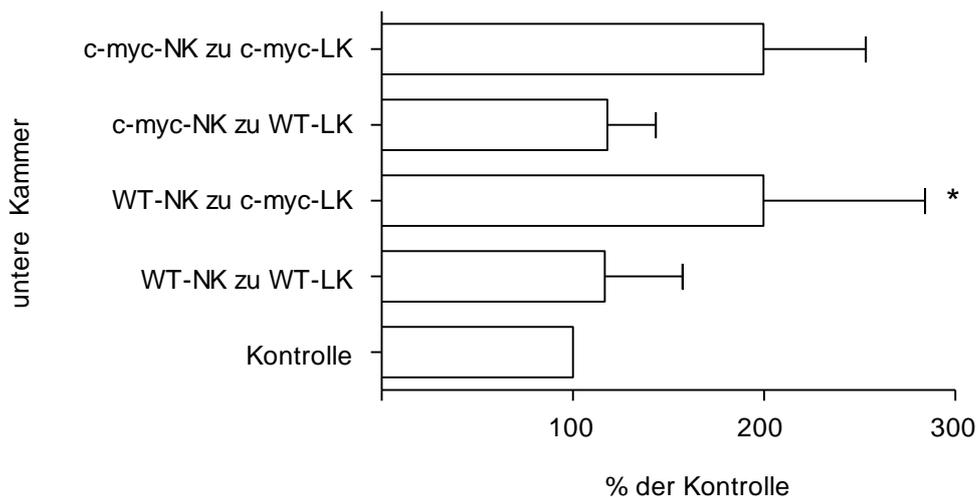
Die Beobachtung einer gesteigerten Proliferationsrate von c-myc-NK-Zellen *in vivo* sollte in einem Ex-vivo-Versuch bestätigt werden. Es wurde hierfür eine Propidiumjodid-Färbung von Lymphknotenzellen durchgeführt. Propidiumjodid lagert sich in die DNS ein und ist somit bei der durchflusszytometrischen Messung ebenfalls ein indirektes Maß für den DNS-Gehalt von Zellen. Die NK-Zellen wurden durch eine zusätzliche NK1.1-Färbung von den übrigen Lymphknotenzellen differenziert. In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass im WT-Lymphknoten nahezu alle NK-Zellen den gleichen DNS-Gehalt besitzen, das heißt sich in der gleichen Phase des Zellzyklus befinden. Im dargestellten Beispiel befinden sich 95 % der NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in der G1-Phase. Im c-myc-Lymphknoten hingegen ist deutlich zu sehen, dass die NK-Zellen sich in ihrem DNS-Gehalt um maximal fast den doppelten Wert unterscheiden. 37 % der NK1.1<sup>+</sup>-Zellen sind in der G1-Phase, 40 % in der S-Phase und 23 % in der G2-Phase. Auch *in vitro* war also eine gesteigerte Proliferationsrate von c-myc-NK-Zellen nachweisbar.



**Abb. 11: FACS-Analyse: Propidiumjodid-Aufnahme in NK1.1<sup>+</sup>-Zellen aus WT- und c-myc-LK**  
Der linke Kurvenverlauf bis etwa 64K in der rechten Abbildung stellt abgestorbene Zellen dar.

#### 4.7 NK-Zellen migrieren zum Tumorlymphknoten

Nachdem mit der Proliferation eine erste Ursache für die Akkumulation von NK-Zellen in Tumorlymphknoten gefunden worden war, sollte nun die Migration als zweite mögliche Ursache überprüft werden. Hierfür wurde ein Zweikammersystem entwickelt, in dem die untere Kammer eine heterogene Zellpopulation aus WT- oder c-myc-Lymphknoten und die obere Kammer isolierte, CFSE-markierte NK-Zellen aus WT- oder c-myc-Milzen enthielt. Als Negativkontrolle wurde die untere Kammer nur mit Medium gefüllt, die obere Kammer mit isolierten WT-NK-Zellen. Nach maximal 60 Minuten Inkubation wurde die Zahl der aus der oberen in die untere Kammer migrierten Zellen am Durchflusszytometer bestimmt (s. Kapitel 3.2.13).



**Abb. 12: Migration von WT- und c-myc-NK-Zellen zu WT- und c-myc-Lymphknoten**

Nach maximal 60 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die CFSE-markierten NK-Zellen in der unteren Kammer durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (WT-NK-Zellen zu reinem Medium als Kontrolle = 100 %) mit Standardabweichungen. Der Unterschied der Anzahl an gewanderten WT-NK-Zellen zu c-myc-LK verglichen mit der Kontrolle war mit \* $p < 0,05$  signifikant.

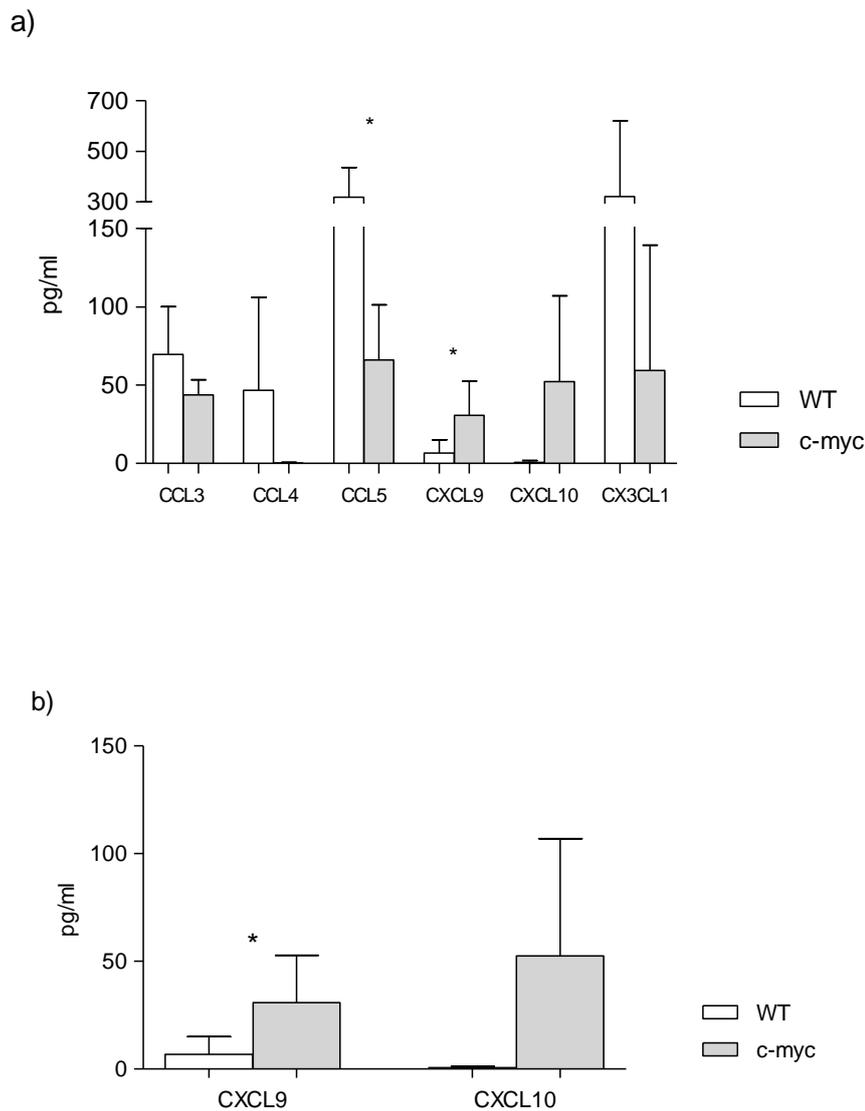
Abbildung 12 zeigt, dass sowohl WT- als auch c-myc-NK-Zellen vermehrt gewandert sind, wenn sich in der unteren Kammer Zellen aus einem Tumorlymphknoten befanden. Die Migrationsrate erreichte dabei fast den doppelten Wert verglichen mit der Negativkontrolle. Das Wanderungsverhalten zum WT-Lymphknoten unterschied sich hingegen

kaum vom Wanderungsverhalten zum Medium. Die Erkenntnis aus diesem Versuch war also, dass für die Migration nicht die Herkunft der NK-Zellen, sondern vielmehr das Milieu, in das sie einwandern, entscheidend ist.

#### **4.8 Chemokinprofil im Tumorgewebe**

Da dieses Milieu unter anderem durch Chemokine definiert wird, wurde nun das Chemokinprofil in den Überständen von WT- und c-myc-Lymphknoten genauer untersucht. Mit einer Multiplex-Analyse für CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, CX3CL1 und einer ELISA-Messung für CCL19 und CCL21 sollte die Zusammensetzung der Chemokine in den Überständen von WT- und c-myc-Lymphknoten überprüft werden. Zur Generierung von Überständen wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Lymphknotenzellen für 48-56 Stunden bei 37 °C inkubiert und nach dem Abzentrifugieren vorsichtig 100 µl Überstand abgenommen (s. Kapitel 3.2.12). Bei den Messungen sind große interindividuelle Konzentrationsunterschiede der Chemokine beobachtet worden. Nach Berechnung der Mittelwerte lässt sich jedoch sagen, dass CCL3, CCL4, CCL5 und CX3CL1 im Tumorüberstand erniedrigte Konzentrationen aufwiesen, während CXCL9 und CXCL10 vermehrt im Tumorüberstand zu messen waren (s. Abb. 13).

Die ELISA-Messung der Chemokine CCL19 und CCL21 ergab Werte unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13: Multiplex-Analyse: Chemokine**

**a) Chemokine in Überständen von WT- und Tumorknoten**

**b) Isolierte Betrachtung der Messung von CXCL9 und CXCL10**

Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Konzentrationsunterschiede in den Überständen von WT- und c-myc-Lymphknoten sind mit \* (\* $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.

## 4.9 Chemokinrezeptoren

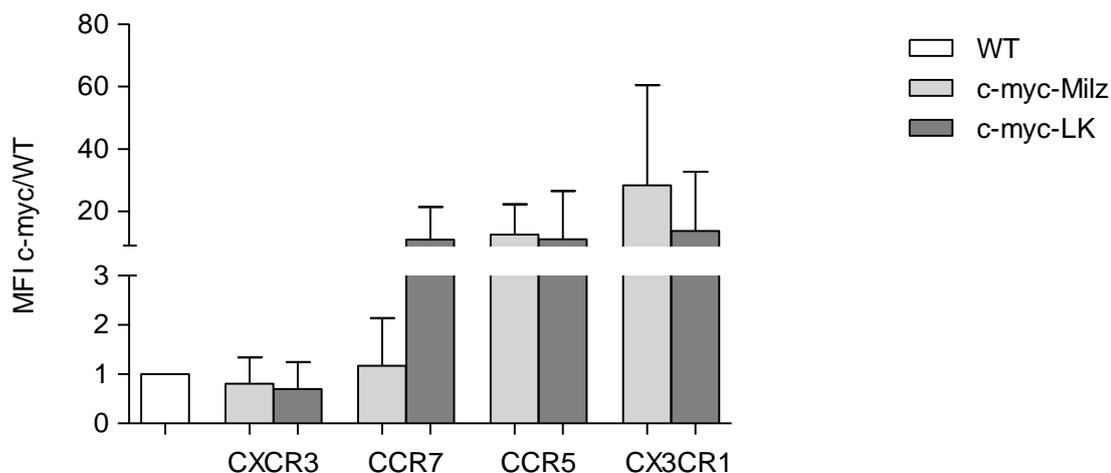
Bindet ein Chemokin an seinen Rezeptor, werden beide internalisiert und verschwinden zunächst von der Zelloberfläche, bevor der Rezeptor dort nach einiger Zeit wieder exprimiert wird. Um eine solche Modulation von Chemokinrezeptoren auf NK-Zellen zu untersuchen, wurden die Expressionsmuster von denjenigen Rezeptoren durchflusszytometrisch auf WT- und c-myc-NK-Zellen verglichen, deren Liganden zuvor bereits gemessen worden waren (s. Tab. 5).

**Tab. 5: Untersuchte Chemokinrezeptoren und die dazugehörigen Liganden**

Rezeptor	Ligand (Synonym)
CCR5	CCL3 (MIP1- $\alpha$ ) CCL4 (MIP1- $\beta$ ) CCL5 (Rantes)
CCR7	CCL19 (ELC) CCL21 (SLC)
CXCR3	CXCL9 (MIG) CXCL10 (IP10)
CX3CR1	CX3CL1 (Fractalkine)

Alle diese Rezeptoren werden auf WT-NK-Zellen exprimiert und spielen eine Rolle bei der Migration von NK-Zellen innerhalb des Organismus, vor allem bei der Migration zwischen den lymphatischen Geweben.

Aus Abbildung 14 geht hervor, dass das Expressionsmuster der untersuchten Chemokinrezeptoren deutliche Unterschiede zwischen WT- und c-myc-NK-Zellen aufweist. CCR7, CCR5 und CX3CR1 wurden auf c-myc-NK-Zellen sowohl aus der Milz als auch aus den Lymphknoten um ein Vielfaches stärker exprimiert als auf WT-NK-Zellen. Bei der Messung von CCR7 fällt auf, dass der Rezeptor zwar sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten von c-myc-Mäusen stärker exprimiert wurde als in WT-Mäusen, jedoch eine große Diskrepanz hinsichtlich des Faktors der MFI in Milz und Lymphknoten bestand. Nur der Rezeptor CXCR3 zeigte auf NK-Zellen aus Tumormäusen eine um den Faktor 0,8 in der Milz und 0,7 im Lymphknoten niedrigere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als auf NK-Zellen aus WT-Mäusen.



**Abb. 14: FACS-Analyse: Mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) wichtiger Chemokinrezeptoren auf NK1.1<sup>+</sup>-Zellen**

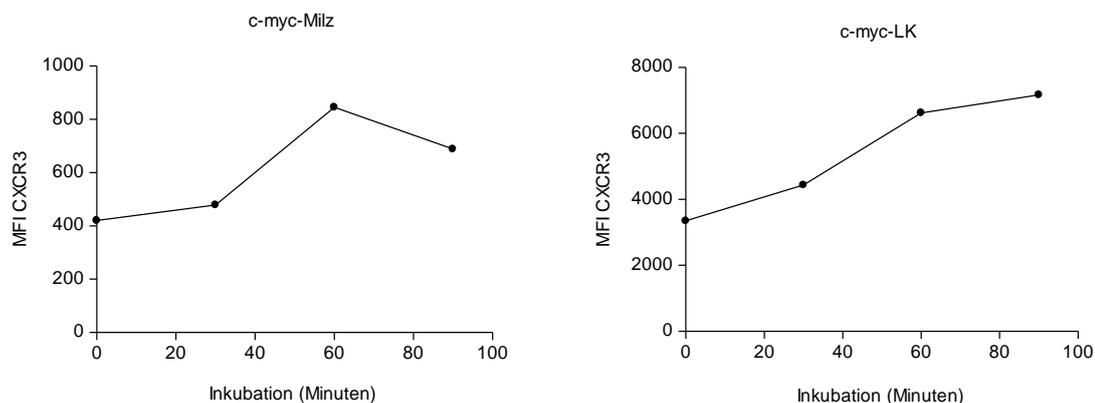
Die Abbildung zeigt die Relativwerte (WT=1) mit Standardabweichungen.

Vor diesem Hintergrund schien der Chemokinrezeptor CXCR3 bei der Migration von NK-Zellen zum Tumorgewebe eine wichtige Rolle zu spielen. Denn während der Rezeptor auf c-myc-NK-Zellen im Vergleich zu WT-NK-Zellen herunterreguliert war, sind erhöhte Konzentrationen von seinen Liganden CXCL9 und CXCL10 in den Tumorüberständen gemessen worden (s. Kapitel 4.8).

Um zu überprüfen, ob die Herunterregulation des Rezeptors von seinen Liganden abhängig war, wurden Zellen aus c-myc-Lymphknoten bei 37 °C maximal 90 Minuten inkubiert. Um sicher ausschließen zu können, dass geringe Chemokinkonzentrationen im Medium vorhanden waren, erfolgte die Inkubation in serumfreiem Medium. Wenn die Herunterregulation des Rezeptors im Zusammenhang mit der Ligandenbindung stand, war eine Hochregulation in Abwesenheit der Liganden zu erwarten. In 30-minütigen Zeitintervallen wurde CXCR3 auf NK1.1<sup>+</sup>-Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass die mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR3 mit der Dauer der Inkubation in serumfreiem Medium zunahm. Nach 60 Minuten Inkubation waren die MFI-Werte von CXCR3 auf den c-myc-NK-Zellen aus Milz und

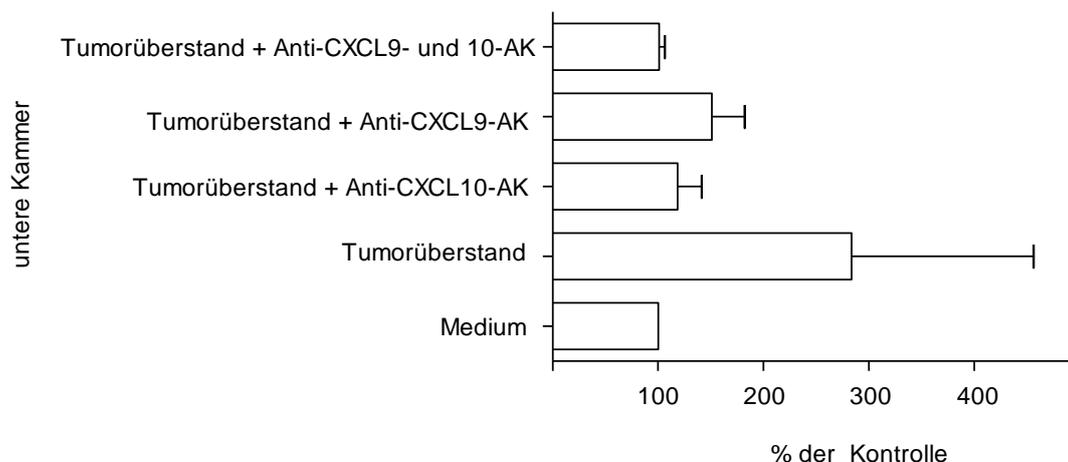
Lymphknoten etwa verdoppelt. Der Rezeptor wurde also in Abwesenheit seiner Liganden zeitabhängig wieder stärker an der Zelloberfläche exprimiert.



**Abb. 15: FACS-Analyse: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CXCR3 auf NK1.1<sup>+</sup>-Zellen**  
Die Zellen wurden vor den Messungen unterschiedlich lange bei 37 °C in serumfreiem AIM-V Medium inkubiert.

#### 4.10 In-vitro-Migration nach Neutralisierung von CXCL9 und CXCL10

Die vorangegangenen Versuche deuteten auf eine entscheidende Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden CXCL9 und CXCL10 im Wanderungsverhalten von NK-Zellen hin. Es stellte sich nun die Frage, in welchem Maß die Interaktion zwischen CXCR3 und den beiden Liganden wirklich notwendig für die Migration von NK-Zellen ist. Dies lässt sich am einfachsten untersuchen, indem die Wirkung der Chemokine aufgehoben wird. Es wurde hierfür wieder das Zweikammersystem verwendet (s. Kapitel 3.2.13). In der oberen Kammer waren isolierte WT- oder c-myc-NK-Zellen aus der Milz, in der unteren Kammer befand sich Tumorüberstand mit oder ohne neutralisierende Antikörper gegen CXCL9 und CXCL10. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit WT-NK-Zellen in der oberen Kammer und reinem AIM-V Medium in der unteren Kammer.



**Abb. 16: Migration von WT-NK-Zellen zum Tumorüberstand mit und ohne neutralisierende Antikörper gegen CXCL9 und CXCL10**

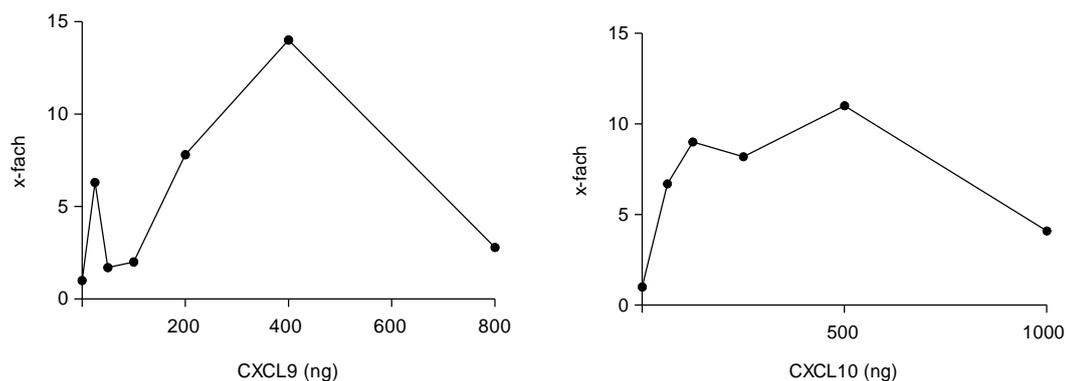
Nach 45 bis 60 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die CFSE-markierten NK-Zellen in der unteren Kammer durchflusszytometrisch quantifiziert. Es gab keine Unterschiede im Wanderungsverhalten zwischen WT- und c-myc-NK-Zellen (Daten nicht gezeigt). Der Mittelwert der gewanderten NK-Zellen zu reinem Medium wurde als Negativkontrolle gleich 100 % gesetzt. Es wurden pro Ansatz jeweils 4 µg der neutralisierenden Antikörper verwendet.

Es ist deutlich die Notwendigkeit von CXCL9 und CXCL10 für die Migration von NK-Zellen erkennbar (s. Abb. 16). Waren in der unteren Kammer des Zweikammersystems neutralisierende AK gegen die beiden Chemokine vorhanden, sank die Migrationsrate fast auf die Werte der Negativkontrolle ab. Nach Blockieren von CXCL9 lag der Wert bei durchschnittlich 151 % der Kontrolle, nach Blockieren von CXCL10 sank der Wert auf nur noch 118 % der Kontrolle. Bei Vorhandensein beider AK betrug die Migrationsrate 101 % der Kontrolle.

#### 4.11 In-vitro-Migration unter Zugabe von CXCL9 und CXCL10

CXCL9 und CXCL10 waren also für die Migration von WT- sowie c-myc-NK-Zellen notwendig. Bis zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch nicht geklärt, ob die beiden Chemokine allein auch ausreichend für die Migration von NK-Zellen sind. Denn es bestand die Möglichkeit, dass sie zwar im Tumormilieu notwendig waren, aber nur im Zusammenwirken mit anderen vorhandenen Faktoren das Wanderungsverhalten

tatsächlich beeinflussten. Die Versuche zu dieser Fragestellung wurden erneut im Zweikammersystem durchgeführt. In der oberen Kammer wurden isolierte WT-NK-Zellen eingesetzt, in der unteren Kammer befand sich AIM-V Medium mit verschiedenen Konzentrationen von CXCL9 oder CXCL10. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Chemokine in der unteren Kammer.



**Abb. 17: Migration von WT-NK-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an CXCL9 und CXCL10**

Die Inkubation erfolgte jeweils bei 37 °C für 60 Minuten.

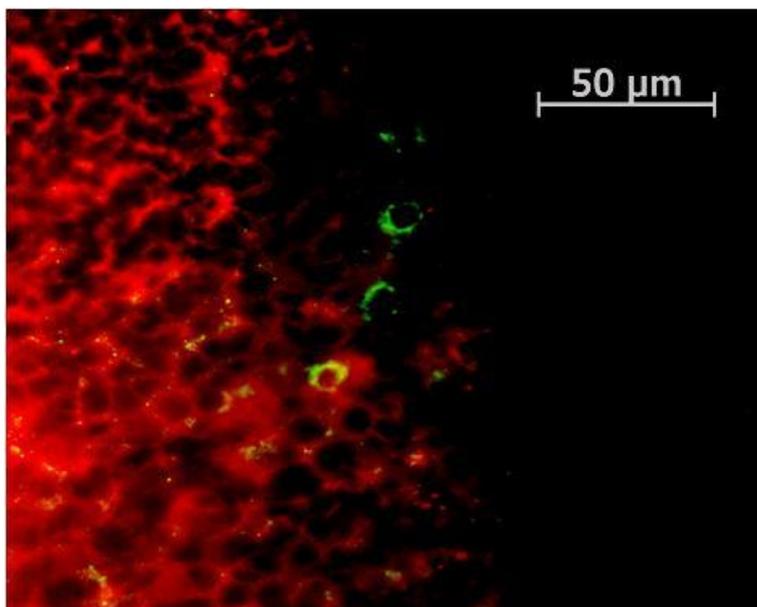
Aus Abbildung 17 geht hervor, dass die Wanderungsrate der NK-Zellen mit der Konzentration an CXCL9 und CXCL10 korrelierte. Beide Chemokine alleine reichten aus, um die Migration von NK-Zellen anzuregen. Die maximale Migrationsrate lag für beide Chemokine bei etwa 400-500 ng in 500  $\mu$ l AIM-V Medium. Wurde die Konzentration noch weiter gesteigert, sank die Migrationsrate wieder fast auf den Ausgangswert ab.

#### 4.12 Immunhistologische Darstellung von NK-Zellen

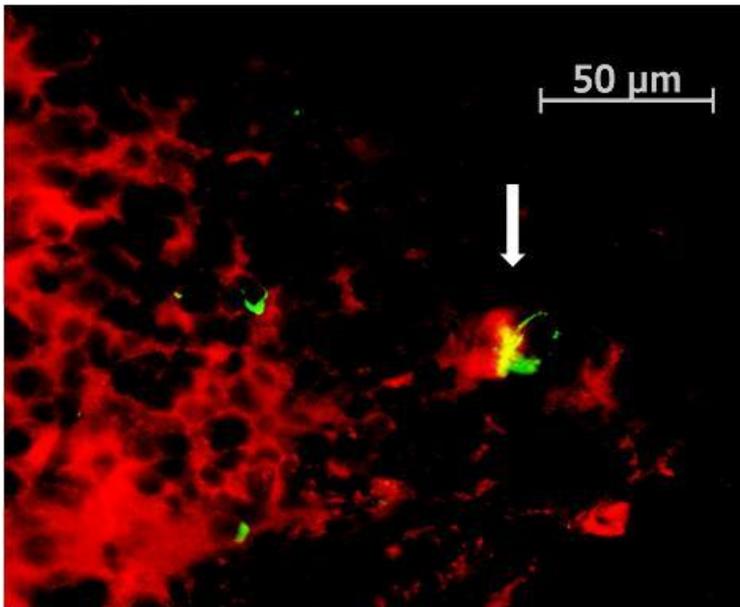
Nachdem feststand, dass NK-Zellen aus Tumorlymphknoten phänotypisch deutliche Aktivierungszeichen ausweisen, gleichzeitig jedoch eine Anergisierung der Zellen vorliegt (s. Kap. 4.2 und 4.3), wurden immunhistologische Färbungen der Lymphome durchgeführt. Die zentrale Frage war dabei, ob NK-Zellen direkten Kontakt mit Tumorzellen aufnehmen. Denn eine direkte Kontaktaufnahme könnte der Aktivierung und anschließenden Anergisierung der NK-Zellen zu Grunde liegen.

Zunächst wurde deutlich, dass die ursprüngliche Architektur der WT-Lymphknoten, bestehend aus B- und T-Zell-Regionen, in den Tumorlymphknoten nicht mehr vorhanden ist. Die NK-Zellen in den WT-Lymphknoten sind vorwiegend in den parafollikulären Zonen, vereinzelt auch in B-Zell-Follikeln, zu finden. Sie weisen eine gleichmäßige, runde Form auf (s. Abb. 18a). In den Tumorlymphknoten hingegen können die NK-Zellen auf Grund der massiven B-Zell-Infiltration keiner räumlichen Struktur mehr zugeordnet werden. Es ist desweiteren beobachtet worden, dass die NK-Zellen direkten Kontakt mit B-Zellen aufnehmen. Dabei entsteht eine Polarisierung des Oberflächenmarkers NKp46, das heißt eine Verschiebung von NKp46 zur Kontaktstelle mit der Tumorzelle hin (s. Abb. 18b).

a)



b)



**Abb. 18: Immunhistologische Darstellung von WT- und Tumorlymphknoten (Maßstab: 40-fach)**

B-Zell-Färbung: Anti-CD19-AK Ratte 1:50 + Anti-Ratte-AK Maus RRX 1:100 (rot dargestellt)

NK-Zell-Färbung: Anti-NKp46-AK Ziege 1:50 + Anti-Ziege-AK Maus biotinyliert 1:100 + SA Cy2 1:100 (grün dargestellt)

a) Detailaufnahme aus einem WT-Lymphknoten, Grenzgebiet zwischen einem B-Zell-Follikel und der perifollikulären Zone: NK-Zellen mit regelmäßiger, runder Form

b) Detailaufnahme aus einem Tumorlymphknoten: NK-Zelle in direktem Kontakt mit einer B-Zelle, dabei Polarisierung von NKp46 (s. Pfeil)

## 5. Diskussion

### 5.1 NK-Zellen im Tumorgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von NK-Zellen in einem spontanen B-Zell-Lymphommodell der Maus untersucht. Der primäre Entstehungsort von NK-Zellen ist das Knochenmark, von wo aus sie in lymphatische sowie nicht-lymphatische Gewebe einwandern. Den höchsten prozentualen Anteil an den Lymphozyten machen NK-Zellen im murinen Organismus mit etwa 9 % in der Lunge aus, während die maximale Absolutzahl von 2-3 Millionen NK-Zellen in der Milz zu finden ist (Grégoire et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es während der Tumorentstehung zu einer Akkumulation von NK-Zellen in den entarteten Lymphknoten kommt. Der höchste Anstieg der Absolutzahl wurde in den submandibulären Lymphknoten kranker Mäuse beobachtet, dem primären Entstehungsort des Lymphoms (s. Abb. 2). Eine Expansion von NK-Zellen während einer Infektion sowie nach Transplantation von Tumorzellen ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Vivier et al. 2008, Wege et al. 2011).

Die angehäuften NK-Zellen im vorliegenden Modell wurden phänotypisch charakterisiert, und die Konstellation der Oberflächenmarker CD2, CD38, CD69, CD94, B220 (CD45R) und NKp46 deutete auf einen aktivierten Phänotyp der NK-Zellen aus Tumor-tragenden Mäusen hin (s. Abb. 3). In anderen Tumormodellen bestehen deutliche Hinweise darauf, dass ein Anstieg der Anzahl von aktivierten NK-Zellen im Tumorgewebe mit einer effektiveren Tumorabstoßung einhergeht (Gillgrass und Ashkar 2011). Im vorliegenden Modell hingegen zeigten die aktivierten NK-Zellen Einschränkungen in ihrer Funktionalität.

## 5.2 Funktionalität von NK-Zellen

Ausgehend von bereits vorhandenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, dass NK-Zellen im Verlauf der Tumorgenese ihre Funktionalität in Form der IFN- $\gamma$ -Produktion sowie der Zytotoxizität verlieren (Brenner et al. 2010), wurden zwei mögliche Ursachen dafür untersucht. Zum Einen wurde die Expression der Moleküle Fas und Fas-Ligand sowohl auf NK-Zellen als auch auf Tumorzellen gemessen. Die Interaktion zwischen dem „Todesrezeptor“ Fas auf der Zielzelle und Fas-Ligand auf der Effektorzelle führt zur Apoptose der Zielzelle. Eine verminderte Expression von Fas-Ligand auf NK-Zellen oder von Fas auf Tumorzellen könnte ursächlich für die Zytotoxizitätsminderung von NK-Zellen sein. Es ist beschrieben, dass NK-Zellen über die Fas-/Fas-Ligand-Interaktion eine entscheidende Rolle für das Ausmaß einer akuten Hepatitis spielen (Zou et al. 2010). Die Analyse ergab jedoch eine Hochregulation beider Moleküle auf beiden Zelltypen (s. Abb. 4), sodass eine Modulation der Expression von Fas und Fas-Ligand nicht die Ursache für den Funktionsverlust von NK-Zellen zu sein scheint.

Es wurde desweiteren die Degranulation von NK-Zellen untersucht. Anhand des Moleküls CD107a wurde eine verstärkte Degranulation von NK-Zellen in Tumormäusen festgestellt (s. Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, dass die Granula ex vivo nur einen sehr geringen Gehalt an den zytolytischen Enzymen Perforin, Granzym A und Granzym B enthielten, jedoch eine Wiederauffüllung der Granula nach Stimulation mit Ionomycin und PMA in NK-Zellen aus WT- sowie aus Tumormäusen möglich war (s. Abb. 6). Es ist bekannt, dass die Zytotoxizität von NK-Zellen auf der Ebene der Transkription von lytischen Enzymen reguliert wird. So enthalten ruhende NK-Zellen reichlich mRNA für Perforin, Granzym A und Granzym B. Auf Proteinebene jedoch findet sich im ruhenden Zustand der Zellen fast ausschließlich Granzym A. Nach Stimulation mit beispielsweise IL-15 steigt die Transkription von Granzym B und Perforin und mit ihr die Zytotoxizität der NK-Zellen (Fehniger et al. 2007). Trotz der nach Stimulation wieder vorhandenen lytischen Enzyme konnte das Lysevermögen der c-myc-NK-Zellen nicht wiedererlangt werden (s. Abb. 7). Eine solche Konstellation aus aktiviertem Phänotyp und gleichzeitigem Funktionsverlust ist unter anderem auch schon bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie beschrieben worden (Costello et al. 2002). Es ist wahrscheinlich, dass die permanente Aktivierung im Tumormilieu NK-Zellen im Laufe der Zeit anerg werden lässt. Denn zu Beginn der

Tumorentstehung ist eine Reaktivierung in dem hier verwendeten Spontan-Tumormodell z. B. durch CpG-Oligonukleotide noch möglich (Brenner et al. 2010). Bei einem akuten Geschehen, wie einer akuten Leberzellinfektion korreliert der phänotypische Aktivierungszustand von hepatischen NK-Zellen mit gesteigerter Zytotoxizität (Zou et al. 2010), während das langsamere Tumorwachstum wie im hier untersuchten Modell durch permanente Aktivierungssignale in einem Erschöpfungszustand der NK-Zellen resultieren könnte.

Granzymen werden neben ihrer proteolytischen Aktivität auch proinflammatorische Eigenschaften und damit die Fähigkeit zur Immunmodulation und -intensivierung zugesprochen (Cullen et al. 2010). Ein Mangel oder Defekt dieser Enzyme könnte dementsprechend zu einer verminderten Immunantwort führen.

### 5.3 Zytokine im Tumorgewebe

Da auch lösliche Faktoren, die das Milieu eines Gewebes definieren, eine Funktionseinschränkung der NK-Zellen verursachen können (Brady et al. 2010), wurde das Zytokinprofil in den Tumorlymphknoten mittels Multiplex-Analyse untersucht. Es wurden im Vergleich zu WT-Lymphknoten erhöhte Konzentrationen an IL-4, IL-5, IL-10 sowie GM-CSF und somit eine Tendenz zur Th2-Immunantwort gefunden (s. Abb. 8). Obwohl IL-4 ein typisches Zytokin der Th2-Immunantwort darstellt und in der Regel gegensätzliche Wirkungen zu IFN- $\gamma$  aufweist, ist es dennoch in der Lage, die IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen zu induzieren. Der beschriebene Effekt lässt bei permanenter IL-4-Präsenz jedoch wieder nach (Morris et al. 2006). Auch bezüglich IL-10 sind bislang verschiedene Wirkungen auf NK-Zellen beobachtet worden. IL-10 ist in der Lage, die IFN- $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen zu verstärken, wenn es in Kombination mit IL-12 und IL-18 wirkt (Shibata et al. 1998, Cai et al. 1999). Viele Autoren hingegen beschreiben eine inhibierende Wirkung von IL-10 auf die IFN- $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen im murinen sowie im humanen System (D'Andrea et al. 1993, Moore et al. 2001, Couper et al. 2008, Brady et al. 2010). Diese Beeinträchtigung der IFN- $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen entsteht indirekt durch Inhibition von IL-12 produzierenden Zellen (Moore et al. 2001, Schroder et al. 2003). IL-12 wird von Antigen-präsentierenden Zellen wie beispielsweise von dendritischen Zellen sezerniert und ist ein entscheidender Stimulus für NK-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion. Dieser Erklärungsansatz steht im

Einklang mit den im vorliegenden Tumormodell generierten Ergebnissen, nämlich einer erhöhten IL-10- und einer niedrigen IFN- $\gamma$ -Konzentration im Tumorgewebe sowie einer eingeschränkten IFN- $\gamma$ -Produktion von NK-Zellen (Brenner et al. 2010). Weitere mögliche Wirkungen von IL-10 sind die Regulation von Proliferation und Differenzierung von NK-Zellen ebenso wie von B-Zellen (Ho und Moore 1994, Cai et al. 1999, Brady et al. 2010).

Es wurde außerdem ein deutlicher Anstieg von TGF- $\beta$  in den Tumorüberständen gemessen (s. Abb. 8). Diese Beobachtung stimmt mit anderen Berichten überein (Tada et al. 1991, Hilbig und Oettle 2011). TGF- $\beta$  nimmt als multifunktionales Signalpeptid eine besondere Stellung im Rahmen von Immunantworten ein (Ikushima und Miyazono 2011). So vermittelt es eine immunsuppressive Wirkung, indem es beispielsweise regulatorische T-Zellen induziert (Fantini et al. 2004). Regulatorische T-Zellen selbst stellen auch eine Hauptquelle für TGF- $\beta$  dar und sind in der Lage, über dieses Zytokin NK-Zellen zu inhibieren (Zhou et al. 2010). In unserem Tumormodell konnten jedoch regulatorische T-Zellen als TGF- $\beta$ -Quelle ausgeschlossen werden (Brenner et al. 2010). Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass im Tumorgewebe eine Subpopulation von NK-Zellen zu finden ist, die intrazellulär hohe Konzentrationen an TGF- $\beta$  besitzt (s. Abb. 9). Somit könnte das stark TGF- $\beta$ -positive Tumormilieu erklärt werden, andere mögliche Produzenten sollten jedoch noch zusätzlich untersucht werden. So ist beispielsweise beschrieben, dass auch Tumorzellen die TGF- $\beta$ -Produktion und die daraus resultierende immunsuppressive Wirkung als Immunevasionsmechanismus nutzen (Tada et al. 1991). Bei Patienten mit Pankreaskarzinom korrelieren hohe Konzentrationen an TGF- $\beta$  mit einer schlechten Prognose (Hilbig und Oettle 2011). TGF- $\beta$  wirkt, anders als IL-10, nicht indirekt über Antigenpräsentierende Zellen inhibierend auf NK-Zellen, sondern es interagiert direkt mit NK-Zellen und reduziert so deren IFN- $\gamma$ -Produktion (Schroder et al. 2003).

#### **5.4 Proliferation**

Für die beobachtete Akkumulation von NK-Zellen in den Tumorlymphknoten stehen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zur Verfügung: eine vermehrte Proliferation, eine gesteigerte Migration sowie beide Möglichkeiten in Kombination.

Untersuchungen der Proliferation von NK-Zellen aus Tumorlymphknoten ergaben eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate verglichen mit WT-NK-Zellen (s. Abb. 10 und 11). Eine genauere Untersuchung einzelner proliferationsstimulierender löslicher sowie gebundener Faktoren und deren Quellen wurde nicht durchgeführt, könnte aber Hinweise für die zu Grunde liegenden Mechanismen liefern. So scheint der aktivierende NK-Zell-Rezeptor Ly49H entscheidend für die Expansion von NK-Zellen während einer viralen Infektion zu sein (Lee et al. 2009). Das Zytokin IL-10, das vermehrt im Tumorüberstand gefunden wurde (s. Abb. 8), kann ebenfalls die Proliferation von NK-Zellen beeinflussen (Moore et al. 2001, Brady et al. 2010) bzw. in Kombination mit IL-18 verstärken (Cai et al. 1999). Eine wichtige Rolle bei der Proliferation wird außerdem dem Molekül CD27 auf NK-Zellen zugesprochen, das durch Interaktion mit CD70 auf B-Zellen zu einer gesteigerten Proliferationsrate von NK-Zellen führt. Jedoch resultiert eine permanente Stimulation von CD27 in einer Reduktion der Proliferation (De Colvenaer et al. 2010). Im hier untersuchten Tumormodell wurde eine leichte Reduktion der CD27-Expression auf NK-Zellen aus Tumorlymphknoten im Vergleich zu WT-Lymphknoten beobachtet (Brenner et al. 2010). Dies könnte ein Hinweis auf eine stattgefundenene Interaktion mit anschließender Internalisierung des Moleküls CD27 im Tumorgewebe sein. Andere Autoren hingegen führen den NK-Zell-Anstieg im Lymphknoten während einer Immunantwort allein auf Migration zurück (Martin-Fontecha et al. 2004).

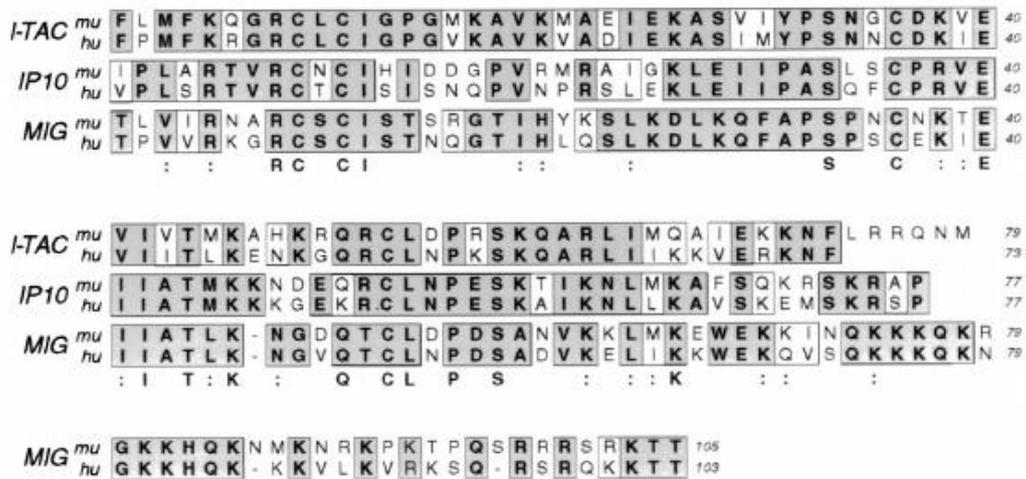
## 5.5 Migration

Als zweite mögliche Ursache für die Akkumulation von NK-Zellen in Tumorlymphknoten wurde das Migrationsverhalten von WT- und c-myc-NK-Zellen untersucht. Es zeigte sich ein gesteigertes Wanderungsverhalten beider NK-Zellen zum Tumorgewebe hin (s. Abb. 12). Somit scheint nicht die Herkunft der NK-Zellen, sondern hauptsächlich das Tumormilieu entscheidend zu sein.

Dieses Milieu wird unter anderem durch Chemokine definiert. Es handelt sich dabei um eine Gruppe von Peptiden, die als chemotaktische Zytokine fungieren. Es wird über Bindung an den entsprechenden Rezeptor die Wanderung verschiedener Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort mit der höchsten Chemokinkonzentration hin ausgelöst. Ohne Chemokine wäre ein organisiertes Zusammenspiel von angeborener

und adaptiver Immunität nicht möglich. Ein Chemokinrezeptor hat meist mehrere verschiedene Liganden, und ein Ligand kann in der Regel an mehr als nur einen Rezeptor binden (Rot und von Andrian 2004).

Eine Multiplex-Analyse von Tumorüberständen ergab erhöhte Konzentrationen der Chemokine CXCL9 und CXCL10 (s. Abb. 13). Der entsprechende Rezeptor CXCR3 hingegen war auf der Oberfläche von NK-Zellen aus Tumormäusen in geringerem Maße messbar als auf WT-NK-Zellen (s. Abb. 14). Es konnte der kausale Zusammenhang dieser negativen Korrelation zwischen erhöhten Ligandenkonzentrationen und verminderter Rezeptorexpression gezeigt werden, denn in Abwesenheit der Liganden stieg die Expressionsrate von CXCR3 wieder an (s. Abb. 15). Die umgekehrte Situation wurde beim Chemokinrezeptor CCR7 und seinen Liganden beobachtet. Während der Rezeptor auf NK-Zellen im Tumor sehr stark exprimiert wurde (s. Abb. 14), waren die Liganden CCL19 und CCL21 in den Tumorüberständen kaum nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Da somit keine Interaktion zwischen Rezeptor und Chemokinen stattfinden konnte, folgte auch keine Internalisierung des Rezeptors. Es ist bekannt, dass CXCR3 eine entscheidende Rolle bei der Migration von NK-Zellen zu Entzündungsherden und Tumoren spielt (Martin-Fontecha et al. 2004, Wendel et al. 2008, Groom und Luster 2011). Diese Rolle konnte in der vorliegenden Arbeit genauer definiert werden. Die Notwendigkeit von CXCL9 und CXCL10 konnte mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern gegen diese beiden Chemokine verdeutlicht werden. CXCL9 und CXCL10 weisen einen hohen Anteil an Sequenzhomologien auf (Widney et al. 2000). Da beide Liganden an einen gemeinsamen Rezeptor binden, ist anzunehmen, dass die homologe Sequenz auch die bindende Sequenz darstellt (s. Abb. 19). Vor diesem Hintergrund kann erklärt werden, dass die verwendeten Antikörper gegen CXCL9 und CXCL10 kreuzreagieren und jeweils beide Chemokine neutralisieren. Eine mögliche Kreuzreaktivität mit CXCL11 (I-TAC), dem dritten Liganden für CXCR3, musste nicht berücksichtigt werden, da Tiere vom Stamm C57BL/6 natürliche Mutanten für diesen Liganden sind und aus diesem Grund CXCL11 nicht besitzen (Sierro et al. 2007).



Widney et al. 2000

**Abb. 19: Vergleich der Peptid-Sequenzen von murinem und humanem I-TAC (CXCL11), IP10 (CXCL10) und MIG (CXCL9):**

Identische Aminosäure-Reste zwischen humaner und muriner Sequenz sind fett gedruckt und grau hinterlegt, ähnliche Aminosäure-Reste sind umrandet und weiß hinterlegt. Identische und ähnliche Aminosäure-Reste in mindestens fünf der sechs dargestellten Sequenzen sind in der unteren Reihe fett gedruckt bzw. als (:) zusammengefasst dargestellt.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass CXCL9 und CXCL10 jeweils ausreichend für die Migration von NK-Zellen sind. Mit steigender Ligandenkonzentration stieg auch die Migrationsrate an. Die maximale Wanderungsrate wurde mit einer Konzentration von 400-500 ng des jeweiligen Chemokins in 500 µl serumfreiem Medium erzielt (s. Abb. 17). Diese Konzentrationen liegen jedoch weit über den im Tumorüberstand gemessenen Werten. Seit langem ist eine positive Korrelation zwischen einer hohen Zahl an NK-Zellen im Tumorgewebe und einer verlängerten Überlebenszeit bei Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen bekannt, so zum Beispiel beim Kolorektalen Karzinom sowie beim Magenkarzinom (Coca et al. 1997, Ishigami et al. 2000, Gillgrass und Ashkar 2011).

Als mögliche Quelle von CXCL9 und CXCL10 kann eine Vielzahl von verschiedenen Zellen berücksichtigt werden, so z. B. dendritische Zellen oder Stromazellen (Martin-Fontecha et al. 2004, Guarda et al. 2007, Gustafsson et al. 2008, Ohtani et al. 2009). Es ist außerdem mehrfach beschrieben, dass auch Tumorzellen bzw. Tumorzelllinien in der Lage sind, Chemokine zu produzieren (Moriai et al. 2009, Tan et al. 2009). Es wäre

auch denkbar, dass die Tumorzellen die Chemokine nicht selber produzieren, sie jedoch über Zytokine wie beispielsweise IFN- $\gamma$  induzieren. Aus den Synonymen für CXCL9 und CXCL10, nämlich MIG (monokine induced by gamma-interferone) und IP10 (interferone-inducible proteine 10) geht bereits hervor, dass sie hauptsächlich nach IFN- $\gamma$ -Induktion produziert werden (Groom und Luster 2011). Im hier untersuchten Tumormodell war allerdings weder im Tumorüberstand (Daten nicht gezeigt) noch in den NK-Zellen kranker Mäuse (Brenner et al. 2010) eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration verglichen mit WT-Kontrollen vorhanden. Trotz der beschriebenen essenziellen Rolle von IFN- $\gamma$  für die CXCR3-abhängige Akkumulation von NK-Zellen im Tumor (Wendel et al. 2008) scheinen hier andere Mechanismen vorherrschend zu sein. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass im Anfangsstadium der Tumorgenese eine IFN- $\gamma$ -Erhöhung stattgefunden hatte, die zum Zeitpunkt der Messungen nicht mehr vorhanden war. Die deutlich erhöhten Konzentrationen von CXCL9 und CXCL10 sprechen jedoch für eine andauernde Induktion.

Die Untersuchung des Zytokinprofils in Tumorüberständen ergab erhöhte Konzentrationen an IL-4, IL-5, IL-10 und GM-CSF und somit eine Tendenz zum Th2-Milieu (s. Abb. 8). Die Anreicherung der Chemokine CXCL9 und CXCL10 im Tumorgewebe hingegen korreliert üblicherweise mit einer Th1-Antwort des Immunsystems (Martin-Fontecha et al. 2004, Wuest und Carr 2008, Ohtani et al. 2009), was im Widerspruch zu den vorliegenden Daten steht. Es ist jedoch auch beschrieben, dass Th2-typische Zytokine wie beispielsweise IL-10 ebenfalls von Th1-Zellen produziert werden können (Trinchieri 2007).

Mit immunhistochemischen Färbungen ist es gelungen, NK-Zellen in Tumorumlymphknoten darzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass die ursprüngliche Architektur der Lymphknoten durch die ausgeprägte B-Zell-Infiltration zerstört wird und dass die NK-Zellen direkten Kontakt zu B-Zellen im Tumorgewebe aufnehmen. Dabei ist vermehrt eine Polarisierung des Oberflächenmarkers NKp46 zu der Kontaktstelle zwischen c-myc-NK-Zellen und Tumorzellen hin beobachtet worden.

Zusammenfassend liefern die hier vorgestellten Daten wichtige Hinweise für eine zentrale Rolle von NK-Zellen bei der Immunantwort. Die Untersuchung und Kenntnis ihrer funktionalen Eigenschaften in einem Spontan-Tumormodell stellen die Voraussetzung zur Entwicklung neuer Immuntherapien bei malignen Erkrankungen dar.

## 5.6. Ausblick

Neben den in der vorliegenden Arbeit bereits untersuchten möglichen Ursachen für den Zytotoxizitätsverlust der phänotypisch aktivierten NK-Zellen (s. Kapitel 4.2 und 4.3) sollten noch weitere Mechanismen untersucht werden. So könnte beispielsweise ein Defekt im Apoptose-Mechanismus von TRAIL, einem unter anderem von NK-Zellen exprimierten Protein der TNF-Superfamilie, die Tumorzellelimination behindern. Desweiteren wäre es sinnvoll, die Interaktion von NK-Zellen mit dendritischen Zellen im Spontan-Tumormodell genauer zu analysieren.

Für die beobachtete Akkumulation von NK-Zellen in Tumorlymphknoten konnten sowohl eine verstärkte Migration als auch Proliferation verantwortlich gemacht werden. Der Einfluss der Chemokine CXCL9 und CXCL10 konnte genauer definiert werden, wobei noch die Herkunft dieser Chemokine zu klären bleibt. Ein wichtiger weiterer Schritt wäre außerdem, einzelne Proliferations-stimulierende Faktoren und deren Quelle im Tumormilieu ausfindig zu machen.

Immunhistologische Darstellungen haben erste Hinweise darauf gegeben, dass NK-Zellen im Tumorlymphknoten in direkten Kontakt zu den B-Zellen treten. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die dabei beobachtete Polarisierung von NKp46 auf NK-Zellen zu quantifizieren.

## 6. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in einem Spontan-Tumormodell. Bereits durchgeführte Untersuchungen in transplantierbaren Tumormodellen der Maus zeigten starke induzierbare Immunantworten, beispielsweise eine ausgeprägte IFN- $\gamma$ -Produktion, und eine NK-Zell-abhängige Tumorabstoßung. Im Spontan-Tumormodell hingegen fiel die Immunreaktion schwächer aus, so war kaum IFN- $\gamma$  nachweisbar, und es erfolgte keine Tumorabstoßung. Um mögliche Ursachen für diese Unterschiede zu finden, sollten im Rahmen dieser Arbeit die natürlichen Killerzellen, zum angeborenen Immunsystem gehörige Lymphozyten, sowohl phänotypisch als auch funktionell genauer charakterisiert werden.

Es wurden hierfür transgene Mäuse verwendet, die das humane Protoonkogen *c-myc* unter der Kontrolle eines B-Zell-spezifischen Immunglobulin- $\lambda$ -Enhancers exprimieren und im Alter von etwa 16 Wochen Tumoren entwickeln, die mit dem humanen Burkitt-Lymphom vergleichbar sind. Das Burkitt-Lymphom ist ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe. Non-Hodgkin-Lymphome stellen trotz großer Fortschritte in der Krebsforschung noch immer potenziell tödliche Erkrankungen dar. Immuntherapien sind eine vielversprechende Option für die betroffenen Patienten, setzen jedoch ein genaues Verständnis der Grundlagen und Interaktionen des Immunsystems voraus. Verglichen mit bislang untersuchten transplantierbaren Tumormodellen, bietet das hier verwendete Spontan-Tumormodell den entscheidenden Vorteil, dass es die klinische Situation realistischer widerspiegelt und Untersuchungen im Verlauf der Tumorgenese erlaubt.

Es konnte anhand der Expression einiger wichtiger Oberflächenmoleküle gezeigt werden, dass NK-Zellen in Tumormäusen einen aktivierten Phänotyp aufweisen. Gleichzeitig jedoch zeigen sie Defizite in ihrer Zytotoxizität. Untersuchungen der Fas- und Fas-Ligand-Expression ergaben keinen Hinweis auf einen Defekt in dieser Interaktion. Es wurde beobachtet, dass *c-myc*-NK-Zellen verstärkt degranulieren, die Granula enthielten dabei kaum Perforin, Granzym A und Granzym B. Nach Stimulation *in vitro* konnten diese wieder aufgefüllt werden, die Lyseaktivität der NK-Zellen war dadurch allerdings nicht wieder herstellbar. Es scheint somit wahrscheinlich, dass die NK-Zellen in *c-myc*-Mäusen durch andauernde Stimulation erschöpft und somit anerg

sind. Auf Grund einer beobachteten Akkumulation von NK-Zellen in Tumorlymphknoten wurde das Migrationsverhalten von NK-Zellen untersucht. Es wurde für diese Fragestellung ein In-vitro-System, bestehend aus zwei durch eine Membran getrennte Kammern, etabliert. Sowohl NK-Zellen aus WT- als auch aus c-myc-Mäusen zeigten eine verstärkte Wanderungstendenz zum Tumorgewebe. Vor diesem Hintergrund folgte eine Multiplex-Analyse des Tumormilieus, die erhöhte Konzentrationen von Th2-Zytokinen sowie der Chemokine CXCL9 und CXCL10 ergab. CXCR3, der entsprechende Rezeptor für diese beiden Chemokine, war auf c-myc-NK-Zellen hingegen herunterreguliert. Das deutet darauf hin, dass bereits eine Interaktion zwischen dem Chemokinrezeptor und seinen Liganden stattgefunden hat, die eine Internalisierung des Rezeptors zur Folge hatte. In Chemokin-freiem Medium war dieser Zustand reversibel, das heißt die Expression von CXCR3 stieg nach kurzer Zeit erneut an. Es folgten einige modifizierte Versuche der In-vitro-Migration, in denen die Rolle von CXCL9 und CXCL10 genauer definiert werden konnte. Es wurde gezeigt, dass das Wanderungsverhalten der NK-Zellen nach Neutralisierung der beiden Chemokine durch entsprechende Antikörper stark eingeschränkt ist und CXCL9 oder CXCL10 somit notwendig für die Migration von NK-Zellen sind. Unter Zugabe von jeweils einem der beiden Chemokine zu serumfreiem Medium konnte das Wanderungsverhalten ausgelöst werden. Dies spricht dafür, dass CXCL9 und CXCL10 nicht nur notwendig, sondern jeweils auch ausreichend für die Migration von NK-Zellen sind.

Desweiteren wurde die Proliferation von NK-Zellen in c-myc-Mäusen überprüft. In-vivo-Untersuchungen mit Hilfe des Thymidinanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU) sowie Ex-vivo-Versuche mit Propidiumjodid zeigten als eine weitere Ursache für diese Anhäufung eine deutlich vermehrte Proliferation von NK-Zellen in den Tumoren von c-myc-Mäusen.

Zusammenfassend liefern die vorliegenden Ergebnisse wichtige Informationen zur Immunreaktion während der Tumorgenese und können Bausteine für die Entwicklung innovativer Immuntherapien in der Onkologie darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

Adam C., Mysliwicz J. und Mocikat R. (2007): "Specific targeting of whole lymphoma cells to dendritic cells ex vivo provides a potent antitumor vaccine" *J Transl Med* 5: 16

Adam C., King S., Allgeier T., Braumüller H., Lüking C., Mysliwicz J., Kriegeskorte A., Busch D. H., Rocken M. und Mocikat R. (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. und Takeda K. (2004): "Toll-like receptor signalling" *Nat Rev Immunol* 4 (7): 499-511

Anderson D. R., Grillo-Lopez A., Varns C., Chambers K. S. und Hanna N. (1997): "Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma" *Biochem Soc Trans* 25 (2): 705-708

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

Brady J., Carotta S., Thong R. P., Chan C. J., Hayakawa Y., Smyth M. J. und Nutt S. L. (2010): "The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation" *J Immunol* 185 (11): 6679-6688

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

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

Cai G., Kastelein R. A. und Hunter C. A. (1999): "IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18" *Eur J Immunol* 29 (9): 2658-2665

Coca S., Perez-Piqueras J., Martinez D., Colmenarejo A., Saez M. A., Vallejo C., Martos J. A. und Moreno M. (1997): "The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma" *Cancer* 79 (12): 2320-2328

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

Couper K. N., Blount D. G. und Riley E. M. (2008): "IL-10: the master regulator of immunity to infection" *J Immunol* 180 (9): 5771-5777

- Cullen S. P., Brunet M. und Martin S. J. (2010): "Granzymes in cancer and immunity" *Cell Death Differ* 17 (4): 616-623
- D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N. M., Ma X., Kubin M. und Trinchieri G. (1993): "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells" *J Exp Med* 178 (3): 1041-1048
- Dawood S., Broglio K., Buzdar A. U., Hortobagyi G. N. und Giordano S. H. (2010): "Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review" *J Clin Oncol* 28 (1): 92-98
- De Colvenaer V., Taveirne S., Hamann J., de Bruin A. M., De Smedt M., Taghon T., Vandekerckhove B., Plum J., van Lier R. und Leclercq G. (2010): "Continuous CD27 triggering in vivo strongly reduces NK cell numbers" *Eur J Immunol* 40 (4): 1107-1117
- Fantini M. C., Becker C., Monteleone G., Pallone F., Galle P. R. und Neurath M. F. (2004): "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7" *J Immunol* 172 (9): 5149-5153
- Fehniger T. A., Cai S. F., Cao X., Bredemeyer A. J., Presti R. M., French A. R. und Ley T. J. (2007): "Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs" *Immunity* 26 (6): 798-811
- Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F., Kirilovsky A., Mlecnik B., Lagorce-Pages C., Tosolini M., Camus M., Berger A., Wind P., Zinzindohoue F., Bruneval P., Cugnenc P. H., Trajanoski Z., Fridman W. H. und Pages F. (2006): "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome" *Science* 313 (5795): 1960-1964
- Gillgrass A. und Ashkar A. (2011): "Stimulating natural killer cells to protect against cancer: recent developments" *Expert Rev Clin Immunol* 7 (3): 367-382
- Grégoire C., Chasson L., Luci C., Tomasello E., Geissmann F., Vivier E. und Walzer T. (2007): "The trafficking of natural killer cells" *Immunol Rev*
- Groom J. R. und Luster A. D. (2011): "CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions" *Immunol Cell Biol* 89 (2): 207-215
- Guarda G., Hons M., Soriano S. F., Huang A. Y., Polley R., Martin-Fontecha A., Stein J. V., Germain R. N., Lanzavecchia A. und Sallusto F. (2007): "L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells" *Nat Immunol* 8 (7): 743-752
- Gustafsson K., Ingelsten M., Bergqvist L., Nystrom J., Andersson B. und Karlsson-Parra A. (2008): "Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine" *Cancer Res* 68 (14): 5965-5971

- Herberman R. B., Nunn M. E., Holden H. T. und Lavrin D. H. (1975): "Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells" *Int J Cancer* 16 (2): 230-239
- Herold G. (2007): "Innere Medizin", Köln
- Hiddemann W., Longo D. L., Coiffier B., Fisher R. I., Cabanillas F., Cavalli F., Nadler L. M., De Vita V. T., Lister T. A. und Armitage J. O. (1996): "Lymphoma classification--the gap between biology and clinical management is closing" *Blood* 88 (11): 4085-4089
- Hilbig A. und Oettle H. (2011): "Transforming Growth Factor Beta in Pancreatic Cancer" *Curr Pharm Biotechnol*
- Ho A. S. und Moore K. W. (1994): "Interleukin-10 and its receptor" *Ther Immunol* 1 (3): 173-185
- Howard J. C. und Wilson D. B. (1974): "Specific positive selection of lymphocytes reactive to strong histocompatibility antigens" *J Exp Med* 140 (3): 660-672
- Ikushima H. und Miyazono K. (2011): "Biology of Transforming Growth Factor-beta Signaling" *Curr Pharm Biotechnol*
- Ishigami S., Natsugoe S., Tokuda K., Nakajo A., Che X., Iwashige H., Aridome K., Hokita S. und Aikou T. (2000): "Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma" *Cancer* 88 (3): 577-583
- Jarahian M., Watzl C., Fournier P., Arnold A., Djandji D., Zahedi S., Cerwenka A., Paschen A., Schirmacher V. und Momburg F. (2009): "Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase" *J Virol* 83 (16): 8108-8121
- Kayagaki N., Yamaguchi N., Nakayama M., Takeda K., Akiba H., Tsutsui H., Okamura H., Nakanishi K., Okumura K. und Yagita H. (1999): "Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells" *J Immunol* 163 (4): 1906-1913
- Kiessling R., Klein E. und Wigzell H. (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 S., Davis M., Sinn E., Patten P. und Hood L. (1981): "Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged VH genes" *Cell* 27 (3 Pt 2): 573-581
- Kovalchuk A. L., Qi C. F., Torrey T. A., Taddesse-Heath L., Feigenbaum L., Park S. S., Gerbitz A., Klobeck G., Hoertnagel K., Polack A., Bornkamm G. W., Janz S. und Morse H. C., 3rd (2000): "Burkitt lymphoma in the mouse" *J Exp Med* 192 (8): 1183-1190
- Lee S. H., Kim K. S., Fodil-Cornu N., Vidal S. M. und Biron C. A. (2009): "Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection" *J Exp Med* 206 (10): 2235-2251

- Lieberman J. (2003): "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal" *Nat Rev Immunol* 3 (5): 361-370
- Ljunggren H. G. und Kärre K. (1990): "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition" *Immunol Today* 11 (7): 237-244
- Loose D. und Van de Wiele C. (2009): "The immune system and cancer" *Cancer Biother Radiopharm* 24 (3): 369-376
- Lucas M., Vonarbourg C., Aichele P. und Diefenbach A. (2010): "Studying NK cell/dendritic cell interactions" *Methods Mol Biol* 612: 97-126
- Martin-Fontecha A., Thomsen L. L., Brett S., Gerard C., Lipp M., Lanzavecchia A. und Sallusto F. (2004): "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming" *Nat Immunol* 5 (12): 1260-1265
- Mocikat R., Braumüller H., Gummy A., Egeter O., Ziegler H., Reusch U., Bubeck A., Louis J., Mailhammer R., Riethmüller G., Koszinowski U. und Röcken M. (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
- Moore K. W., de Waal Malefyt R., Coffman R. L. und O'Garra A. (2001): "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor" *Annu Rev Immunol* 19 683-765
- Moriai S., Takahara M., Ogino T., Nagato T., Kishibe K., Ishii H., Katayama A., Shimizu N. und Harabuchi Y. (2009): "Production of interferon-gamma-inducible protein-10 and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer/t-cell lymphoma cells" *Clin Cancer Res*
- Morris S. C., Orekhova T., Meadows M. J., Heidorn S. M., Yang J. und Finkelman F. D. (2006): "IL-4 induces in vivo production of IFN-gamma by NK and NKT cells" *J Immunol* 176 (9): 5299-5305
- Muntau A. C. (2009): "Intensivkurs Pädiatrie" Urban & Fischer Verlag, München
- Murphy K., Travers P. und M. Walport (2008): "Janeway's Immunobiology" Garland Science, New York
- Ohtani H., Jin Z., Takegawa S., Nakayama T. und Yoshie O. (2009): "Abundant expression of CXCL9 (MIG) by stromal cells that include dendritic cells and accumulation of CXCR3+ T cells in lymphocyte-rich gastric carcinoma" *J Pathol* 217 (1): 21-31
- Ojo E. und Wigzell H. (1978): "Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells" *Scand J Immunol* 7 (4): 297-306
- Quintas-Cardama A., Wierda W. und O'Brien S. (2010): "Investigational immunotherapeutics for B-cell malignancies" *J Clin Oncol* 28 (5): 884-892

Rock F. L., Hardiman G., Timans J. C., Kastelein R. A. und Bazan J. F. (1998): "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll" *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2): 588-593

Rot A. und von Andrian U. H. (2004): "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells" *Annu Rev Immunol* 22 891-928

Schroder M., Meisel C., Buhl K., Profanter N., Sievert N., Volk H. D. und Grutz G. (2003): "Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization" *J Immunol* 170 (10): 5260-5267

Shibata Y., Foster L. A., Kurimoto M., Okamura H., Nakamura R. M., Kawajiri K., Justice J. P., Van Scott M. R., Myrvik Q. N. und Metzger W. J. (1998): "Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma" *J Immunol* 161 (8): 4283-4288

Sierro F., Biben C., Martinez-Munoz L., Mellado M., Ransohoff R. M., Li M., Woehl B., Leung H., Groom J., Batten M., Harvey R. P., Martinez A. C., Mackay C. R. und Mackay F. (2007): "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7" *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (37): 14759-14764

Sun J. C., Beilke J. N. und Lanier L. L. (2009): "Adaptive immune features of natural killer cells" *Nature* 457 (7229): 557-561

Tada T., Ohzeki S., Utsumi K., Takiuchi H., Muramatsu M., Li X. F., Shimizu J., Fujiwara H. und Hamaoka T. (1991): "Transforming growth factor-beta-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

Takeda K., Smyth M. J., Cretney E., Hayakawa Y., Yamaguchi N., Yagita H. und Okumura K. (2001): "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth" *Cell Immunol* 214 (2): 194-200

Tan M. C., Goedegebuure P. S., Belt B. A., Flaherty B., Sankpal N., Gillanders W. E., Eberlein T. J., Hsieh C. S. und Linehan D. C. (2009): "Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer" *J Immunol* 182 (3): 1746-1755

Trinchieri G. (2007): "Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control" *J Exp Med* 204 (2): 239-243

Vita M. und Henriksson M. (2006): "The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer" *Semin Cancer Biol* 16 (4): 318-330

Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T. und Ugolini S. (2008): "Functions of natural killer cells" *Nat Immunol* 9 (5): 503-510

Wege A. K., Ernst W., Eckl J., Frankenberger B., Vollmann-Zwerenz A., Mannel D. N., Ortmann O., Kroemer A. und Brockhoff G. (2011): "Humanized tumor mice - a new model to study and manipulate the immune response in advanced cancer therapy" *Int J Cancer*

Weidmann E. und Jäger E. (2008): "Tumor-Escape-Mechanismen" in: *Krebstherapien - Standards und Innovationen*, C. Huber, Deutscher Ärzteverlag, Köln

Wendel M., Galani I. E., Suri-Payer E. und Cerwenka A. (2008): "Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands" *Cancer Res* 68 (20): 8437-8445

Widney D. P., Xia Y. R., Lulis A. J. und Smith J. B. (2000): "The murine chemokine CXCL11 (IFN-inducible T cell alpha chemoattractant) is an IFN-gamma- and lipopolysaccharide-inducible glucocorticoid-attenuated response gene expressed in lung and other tissues during endotoxemia" *J Immunol* 164 (12): 6322-6331

Wuest T. R. und Carr D. J. (2008): "Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the antiviral response to herpes simplex virus 1 infection" *J Immunol* 181 (11): 7985-7993

Zhou H., Chen L., You Y., Zou L. und Zou P. (2010): "Foxp3-transduced polyclonal regulatory T cells suppress NK cell functions in a TGF-beta dependent manner" *Autoimmunity*

Zou Y., Chen T., Han M., Wang H., Yan W., Song G., Wu Z., Wang X., Zhu C., Luo X. und Ning Q. (2010): "Increased killing of liver NK cells by Fas/Fas ligand and NKG2D/NKG2D ligand contributes to hepatocyte necrosis in virus-induced liver failure" *J Immunol* 184 (1): 466-475