

Mechanismen funktioneller Inaktivierung Tumor-infiltrierender Lymphozyten am Beispiel des Nierenzellkarzinoms

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

aus dem Institut für Molekulare Immunologie
der GSF- Forschung für Umwelt und Gesundheit
unter der Leitung von
Frau Prof. Dr. D. J. Schendel

Betreuerin Dr. H. Pohla
Labor für Tumorimmunologie,
Urologische Abteilung des Klinikums Großhadern,
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Julia Sophie Schleypen
am 18.12.2003

Tag der mündlichen Prüfung:

21. April 2004

Gutachter: Prof. Dr. T. Cremer
Prof. Dr. E. H. Weiß

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	Das Nierenzellkarzinom.....	1
1.2	Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) und tumor-escape-Mechanismen	3
1.3	NK-Zellen.....	7
1.4	Regulatorische Zellen.....	12
1.5	Aufgabenstellung	15
2.	<u>MATERIAL</u>	<u>16</u>
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	16
2.2	Chemikalien	19
2.3	Reagenzien für die Immunhistologie.....	20
2.4	Zellkultur	21
2.4.1	Verbrauchsmedien, Zusätze und andere Reagenzien	21
2.4.2	Puffer	22
2.4.3	Medien	23
2.5	Gewebeproben.....	24
2.6	Blutproben	25
2.7	Zelllinien.....	26
2.8	Antikörper	27
2.8.1	Primärantikörper.....	27
2.8.2	Sekundärantikörper	28
2.8.3	Reagenziensysteme für das Bio-Plex™-Gerät	28
2.9	Molekularbiologie	29
2.9.1	Primer	29
2.9.2	Enzyme.....	29
2.9.3	Reagenziensysteme.....	30
2.9.4	Sonstige Reagenzien	30
2.10	Personen- und Herstellerverzeichnis	31

3. 	<u>METHODEN.....</u>	<u>33</u>
3.1	Immunhistochemie	33
3.1.1	Allgemeines.....	33
3.1.2	Schnitte	33
3.1.3	Antikörper.....	34
3.1.4	Indirekte Färbung mit Peroxidase	35
3.1.5	Färbung über die APAAP-Methode	35
3.2	Allgemeine Methoden der Zellkultur	37
3.2.1	Allgemeine Bemerkung	37
3.2.2	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	37
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	37
3.2.4	Einfrieren von Zellen	38
3.2.5	Auftauen von Zellen	38
3.2.6	Kultivierung von adhärenenten Zelllinien	38
3.2.7	Kultivierung von Leukämiezelllinien	39
3.2.8	Kultivierung von TIL.....	39
3.2.9	Simultane Messung mehrerer Zytokine im Zellkulturüberstand.....	39
3.2.10	Zellseparation über ferromagnetische Antikörper	41
3.3	Gewinnung der Gewebeproben	42
3.4	Isolierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)	42
3.4.1	Isolierung von TIL durch Kultivierung des Gewebes	42
3.4.2	Direkte Isolierung von TIL durch Homogenisierung des Gewebes.....	42
3.5	Gewinnung von Nierenzellkarzinomzellen.....	43
3.6	Chromfreisetzungstest.....	43
3.6.1	Markierung der Zielzellen	43
3.6.2	Direkte zellvermittelte Lyse (CML).....	43
3.6.3	Redirigierte Lyse	44
3.6.4	Messung und Auswertung	44
3.7	Durchflusszytometrie	45
3.7.1	Allgemeines.....	45
3.7.2	Direkte Färbung der Zelloberfläche	45
3.7.3	Indirekte Färbung der MHC-Klasse-I-Expression.....	46
3.7.4	Intrazelluläre Färbung	46

3.8 Methoden der Molekularbiologie	47
3.8.1 RNS-Isolierung aus Zellen.....	47
3.8.2 Reverse Transkription und Aufreinigung der cDNS	47
3.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
3.8.4 Quantitative <i>real-time</i> PCR mithilfe des LightCycler™-Gerätes	49
3.8.5 Gelelektrophorese	52
<u>4. ERGEBNISSE</u>	<u>53</u>
4.1 Lymphozyteninfiltrat <i>in situ</i>: Immunhistochemie.....	53
4.1.1 Tumorspezifische Färbungen durch den G250-Antikörper.....	54
4.1.2 Infiltrierende Leukozytenpopulationen	56
4.1.2.1 T-Zellen	56
4.1.2.2 NK-Zellen	57
4.1.2.3 Monozyten bzw. Makrophagen	60
4.1.2.4 Granulozyten.....	61
4.1.3 Expression von Adapter- und Effektormolekülen	62
4.1.4 Expression von E-Cadherin und CD103	64
4.2 Lymphozyteninfiltrat <i>ex vivo</i>.....	66
4.2.1 Isolierung und zytotoxische Aktivität von TIL	66
4.2.1.1 Isolierung durch Kultur der Gewebestückchen	66
4.2.1.2 Direkte Isolierung von TIL <i>ex vivo</i>	69
4.2.2 Charakterisierung der NK-TIL.....	79
4.2.2.1 Expression und Funktionalität inhibitorischer Rezeptoren.....	79
4.2.2.2 Expression und Funktionalität aktivierender Rezeptoren	87
4.2.2.3 Expression verschiedener Adaptermoleküle und Perforin.....	93
4.2.2.4 Zytokinexpression der NK-TIL	97
4.2.3 Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen.....	101
4.2.3.1 Phänotyp infiltrierender T-Zellpopulationen	101
4.2.3.2 Zytokinexpression	103
4.2.3.3 Regulatorische T-Zellen	105

5.	<u>DISKUSSION</u>	<u>110</u>
5.1	Gewebeproben	110
5.2	Lymphozyteninfiltrat <i>in situ</i>	110
5.3	Lymphozyteninfiltrat <i>ex vivo</i>	115
5.3.1	Isolierung der TIL	115
5.3.2	Charakterisierung der verschiedenen TIL-Populationen	116
5.3.3	Charakterisierung der infiltrierenden NK-Zellen	118
5.3.4	Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen	124
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>127</u>
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>130</u>
8.	<u>VERWENDETE ABKÜRZUNGEN</u>	<u>154</u>
9.	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>156</u>
10.	<u>ANHANG</u>	<u>158</u>

1. Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) ist ein epithelialer Tumor des Nierenparenchyms und nach dem Prostatakarzinom und dem Harnblasenkarzinom die dritthäufigste maligne Tumorerkrankung des urogenitalen Traktes. Es stellt die häufigste neoplastische Erkrankung der Niere dar und macht in Deutschland einen Anteil von 1-2 % aller soliden Malignome aus, an der pro Jahr etwa 11 000 Menschen erkranken. Es ist die siebthäufigste Krebserkrankung beim Mann. Im Jahr 2000 sind in Deutschland mehr als 5000 Menschen an den Folgen eines RCC verstorben. Die Inzidenz lag im Jahr 2001 in der Bundesrepublik bei etwa 13 erkrankten Männern und fünf Frauen je 10⁵ Einwohnern. Die Erkrankung wurde meist im sechsten Lebensjahrzehnt diagnostiziert [1-3].

In der im deutschsprachigen Raum verbreiteten Mainz-Klassifikation nach Thoenes werden die Nierenzellkarzinome nach zytomorphologischen Kriterien und Tumorwachstum in klarzellige (hypernephroide), chromophile, chromophobe, polymorphzellige und Duct-Bellini-Typen unterschieden [4]. Die weltweit verbreitete Klassifikation der *Union Internationale Contre Le Cancer* (UICC) unterscheidet die verschiedenen Typen auch nach ihren genetischen Veränderungen. Das klarzellige Nierenzellkarzinom entspricht hier weitgehend dem Typus des konventionellen RCC, das durch eine Deletion auf Chromosom 3p charakterisiert ist, und macht einen Anteil von 70-80 % aller Nierenzellkarzinome aus [5].

Als Risikofaktoren werden unter anderem die Exposition mit Cadmium, Blei oder Teer, eine Adipositas und Nikotinabusus beschrieben, nur selten treten familiär gehäufte Fälle auf. Die Prognose hängt entscheidend vom Ausmaß der Erkrankung bei Therapiebeginn ab. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im Gesamtkollektiv der Patienten im Mittel weniger als 20 %. Bei Diagnosestellung sind bereits etwa 13 % der Karzinome metastasiert; in diesem fortgeschrittenen Stadium beträgt die 1-Jahres-Überlebensrate ohne weitere Behandlung nur etwa 15 %. Hierbei spielt die Zahl der befallenen Organe eine entscheidende Rolle; Metastasen treten in absteigenden Häufigkeiten primär in Lunge, Lymphknoten, Skelett, Leber und Nebennieren auf, wobei Skelett- und Lebermetastasen die ungünstigste Prognose anzeigen [1].

Das RCC zeigt keine Strahlensensibilität und ist gegenüber gängigen Chemotherapeutika refraktär. Primär wird eine radikale Tumornephrektomie oder unter gewissen Umständen wie beispielsweise dem Vorkommen einer Einzelniere eine organerhaltende Tumorexstirpation oder eine Teilnephrektomie durchgeführt. Selbst durch diese radikale operative Behandlung steigt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei auf die Nierenkapsel beschränkten Tumoren nur auf etwa 70 %. Die Diagnose in solch frühen Tumorstadien ist allerdings selten, da das lokal begrenzte Nierenzellkarzinom in der Regel asymptomatisch ist.

Die Streuung von Tumorzellen wird oftmals zum Zeitpunkt der ersten Diagnose nicht evident, so dass Metastasen auch nach Entfernung des Primärtumors diagnostiziert werden. Die Entfernung vorhandener Metastasen wird in den urologischen Leitlinien nur dann empfohlen, wenn sämtliche Metastasen chirurgisch resektabel sind, da ansonsten keine Steigerung des Langzeit-Überlebens zu erwarten ist [1]. Das metastasierte Karzinom ist in der Regel nicht heilbar. Die stark eingeschränkte Therapiemöglichkeit dieser häufigen und hochmalignen Erkrankung erforderte die Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten. Die Suche nach einer wirksamen Immuntherapie stützt sich dabei auf die Annahme, dass das Nierenzellkarzinom, wie auch das Melanom, zu der sehr kleinen Gruppe der immunogenen Tumoren gezählt werden kann. Diese Einschätzung beruht auf der Beobachtung, dass bei 0,2-0,5 % der Nierenzellkarzinome spontane Remissionen von Primärtumoren oder Metastasen auftraten [6], die auf eine Antwort des Immunsystems gegen den Tumor zurückgeführt wurden. Dies wiederum wurde aus der Beobachtung geschlossen, dass das RCC zumeist eine große Anzahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) beinhaltet, was als Reaktion des Immunsystems auf den Tumor gewertet wird.

Bereits 1985 erzielten Rosenberg und Mitarbeiter erste klinische Erfolge in der Behandlung fortgeschrittener metastasierter Tumoren durch die systemische Gabe von hochdosiertem Interleukin (IL)-2 [7], die sich allerdings wegen der erheblichen therapiebedingten Toxizität nicht durchsetzen konnte. Die in Deutschland mittlerweile standardisierte und am häufigsten angewendete Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms nach der operativen Entfernung des Primärtumors stellt die kombinierte Immun-Chemotherapie mit einer systemischen Gabe von Interferon (IFN)- α , IL-2 und 5-Fluoruracil (5-FU) nach Atzpodien und Kirchner dar, bei der im allgemeinen vertretbare Nebenwirkungen auftreten [8]. Hierbei wurden Ansprechraten von 20-30 % beschrieben, die etwa bei der Hälfte aller Fälle zu kompletten oder partiellen Remissionen des Tumors führten [9-11]. Dies bestätigte, dass in einigen Fällen eine effektive Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst werden kann.

Weitere Studien zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen für das Nierenzellkarzinom beinhalten den adoptiven Transfer von *in vitro* aktivierten autologen oder allogenen Zellen sowie die Verabreichung weiterer Zytokine, Tumor-spezifischer Antikörper oder Peptide, die jeweils eine Stimulation des Immunsystems gegen den Tumor bewirken sollten [12-18]. Diese haben bisher jedoch keine besseren Erfolge erzielt als die Standard-Immun-Chemotherapie.

Vor der Suche nach weiteren Möglichkeiten für wirkungsvollere Immuntherapien steht jedoch auch künftig die Frage, inwieweit und in welchem Ausmaß der Tumor selbst das Immunsystem beeinflusst und welche Mechanismen die Tumoren entwickelt haben, um dem Angriff durch das Immunsystem zu entkommen (*tumor-escape*-Mechanismen). So ist immer noch unbeantwortet, warum die Lymphozyten den Tumor zwar so zahlreich infiltrieren und damit eine Veränderung des Normalzustandes zu erkennen scheinen, dort aber keine effiziente Zerstörung der Tumorzellen bewirken.

1.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) und *tumor-escape*-Mechanismen

Das Nierenzellkarzinom weist in der Regel ein sehr ausgeprägtes Lymphozyteninfiltrat auf. Verschiedene Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass sowohl T-Zellen, als auch einige natürliche Killer (NK)-Zellen und wenige B-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren [19-21]. Neben einer großen Zahl an Lymphozyten sind aber auch Monozyten im Tumor vorhanden, die zahlenmäßig das Aufkommen der T-Zellen sogar übersteigen können [22]. Zudem ist eine verhältnismäßig große Zahl dendritischer Zellen (DC), die eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Antigenen für T- und B-Zellen spielen, im RCC beschrieben worden [23,24]. Die wichtigen Effektorzellen der angeborenen und erworbenen Immunität können somit im Gewebe des Nierenzellkarzinoms gefunden werden. Unter ihnen sind die infiltrierenden T-Zellen bisher am ausführlichsten charakterisiert worden. Meist ist von einer überwiegenden Anzahl CD8⁺ (zytotoxischer) T-Zellen gegenüber CD4⁺ T-Zellen berichtet worden [20,25,26]. Funktionelle Untersuchungen mehrerer Forschungsgruppen konnten zeigen, dass einige infiltrierende CD8⁺ T-Zellen tumor-spezifische Antigene *in vitro* erkennen und Tumorzellen, die diese Antigene exprimieren, lysieren können. Die Antigene des autologen Tumors wurden auf der Zelloberfläche über Klasse-I-Moleküle präsentiert, die von Genen innerhalb des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) kodiert und von Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptorkomplexen erkannt werden.

Diese sogenannte MHC-restringierte Erkennung führte zu einer spezifischen Lyse der Tumorzellen durch die T-Zellen, während unverändertes Nierenparenchym nicht erkannt wurde [27-29]. Die spezifischen T-Zellen waren *in situ* weit verbreitet [30,31], persistierten im peripheren Blut eines Patienten über einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren [30] und bewirkten sogar eine spezifische Lyse verschiedener allogener Tumorzellen [27]. Es muss also einige Tumor-assoziierte Antigene geben, die auf verschiedenen RCC verbreitet sind. Neben CD8⁺ T-Zellen sind auch CD4⁺ T-Helfer (T_H)-Zellen beschrieben worden, die *in vitro* eine spezifische Erkennung von Tumorzellen zeigen [32]. *In vivo* konnte die Effektivität von infiltrierenden Lymphozyten bereits vor einiger Zeit von Rosenberg *et al.* anhand eines Mausmodells gezeigt werden, in dem ein adoptiver Transfer von TIL die Eliminierung des etablierten Tumors bewirken konnte [33].

Die ineffiziente Bekämpfung des Tumors *in situ* ist somit weder auf die fehlende Expression Tumor-assoziiertes Antigens oder auf eine fehlende RCC-spezifische Immunantwort zurückzuführen, noch darauf, dass die spezifischen Zellen nicht bis in das Tumorgewebe vordringen können. Vielmehr scheint es, als wäre das Tumormilieu selbst für die Inaktivierung der Zellen vor Ort verantwortlich, weil isolierte Lymphozyten wieder deutliche Effektorfunktionen zeigen können.

Es ist allerdings auch möglich, dass die Lymphozyten im Tumor sehr wohl aktiv sind und *in vivo* einen Teil der Tumorzellen lysieren, die Eliminierung der Zellen aufgrund des schnellen Tumorstwachstums aber nicht effizient genug ist. Die Immuntherapie über die systemische Gabe von IL-2 und IFN- α zeigt, dass eine Stimulierung des Immunsystems der Patienten zumindest nach Entfernung des Primärtumors wirkungsvoll sein kann. Über die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der infiltrierenden T-Zellen sind in der Vergangenheit zum Teil kontroverse Berichte veröffentlicht worden. So wurde geschildert, dass die T-Zellen im Tumor sowohl eine verminderte Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors CD25 und der CD3 ζ -Kette, eines Signalmoleküls innerhalb des T-Zell-Rezeptorkomplexes, als auch einen fehlerhaften Zellzyklus aufweisen und deshalb im Tumor in einem inaktivierten Zustand vorliegen [34,35]. Auf der anderen Seite sind auch TIL beschrieben worden, die eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern zeigen [31,36].

In einem Modell konnte gezeigt werden, dass Mäuse sehr viel anfälliger für die Entwicklung einiger Tumoren sind, wenn sie das Effektormolekül Perforin nicht produzieren können [37]. Perforin wird von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen produziert. Es wird zusammen mit Granzymen ausgeschüttet, die unter anderem die Degradierung der DNS in den Zielzellen vermitteln [38]. Die Rolle der Perforin-Moleküle bei der Übermittlung der Zytotoxizität ist bisher nicht vollständig geklärt.

Die Annahme, dass mehrere Perforin-Moleküle in der Membran der Zielzellen Poren bilden (Perforin= *pore forming*), erwies sich als falsch. Vielmehr scheinen sie den Granzymen dabei zu helfen über eine Endozytose in die Zielzellen zu gelangen [37]. In Mausmodellen erwies sich die Expression von Perforin als essentiell für die Kontrolle des Tumorwachstums und der Dissemination von Tumorzellen [39,40]. Beim Menschen bewirkt die fehlerhafte Expression dieses Moleküls eine massive Proliferation und Infiltration von Lymphozyten [37]. Untersuchungen humaner TIL legen zudem die Vermutung nahe, dass eine geringe Anzahl Perforin-positiver Zellen im Tumor mit einem aggressiven Wachstum der Karzinome korreliert [41-43]. Die Expression von Perforin in TIL des RCC ist allerdings bisher wenig untersucht worden.

Infiltrierende zytotoxische T-Zellen können weiterhin funktionelle inhibitorische Rezeptoren (IR) tragen, deren Liganden auf Tumorzellen exprimiert werden und für eine Inhibierung der T-Zellen verantwortlich sind [44-46]. Für eine Inaktivität der T-Zellen im Tumor spricht außerdem, dass im Tumorgewebe vorwiegend Typ-2-Zytokine, wie Interleukin (IL-) 4 und IL-10 vorhanden sind, anstelle von Typ-1-Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ , die auf eine spezifische inflammatorische Antwort von CD8⁺ T-Zellen gegen den Tumor hinweisen würden [47-49]. In anderen Publikationen wurde dagegen berichtet, dass die T-Zellen vermehrt Typ-1-Zytokine produzieren [31,50]. Ihre zytotoxische Aktivität kann allerdings von Zytokinen wie IL-6 herabreguliert werden, das von Tumorzellen sezerniert wird [31]. In einigen RCC scheinen demnach sowohl aktivierte T-Zellen vorzukommen als auch pro- und anti-inflammatorische Zytokine produziert zu werden [20,21,51], wobei die Produktion der pro-inflammatorischen Typ-1-Zytokine meist auf die Sekretion CD8⁺ T-Zellen zurückgeführt wurde [51], während Typ-2-Zytokine von CD4⁺ T_H-Zellen sezerniert werden [20]. Im allgemeinen scheint das Zytokinmilieu, zu dem sowohl TIL als auch Tumorzellen beitragen, zwischen Tumoren verschiedener RCC-Patienten sehr heterogen zu sein [52].

Die funktionelle Untersuchung direkt aus dem Tumor isolierter TIL konnte zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen *in vivo* eine verminderte zytotoxische Aktivität aufweisen, so dass die Lymphozyten im Tumor durchaus spezifisch inaktiviert zu sein scheinen [20]. Die Inaktivierung der TIL kann durch bestimmte Eigenschaften der Tumorzellen verursacht sein. So ist ein weit verbreiteter Mechanismus, der von Tumorzellen benützt wird, um dem Immunsystem zu entkommen, die Regulation der MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen. Tumoren (sowie auch einige Viren) sind in der Lage die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle zu reduzieren um einem spezifischen Angriff der MHC-restringierten T-Zellen zu entkommen [53-57]; dementsprechend konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen mit einem aggressiveren Wachstum des RCC assoziiert ist [58]. Andererseits ist die Anwesenheit

bestimmter MHC-Moleküle entscheidend um einem Angriff von NK-Zellen zu entkommen, die Zellen mit verminderter MHC-Klasse-I-Expression lysieren [53,59]. Ein kompletter Verlust der MHC-Klasse-I-Moleküle auf Nierenzellkarzinomen ist dementsprechend nie gefunden worden. Einige Tumoren zeigen eher eine *de novo*-Expression bestimmter humaner Leukozyten-Antigene (HLA), die als spezifische Liganden für IR fungieren und NK- sowie T-Zellen inhibieren [60,61]. Zusätzlich tragen auch vom Tumor sezernierte Proteine zu einer Inhibierung der Immunantwort bei. So konnte gezeigt werden, dass Extrakte von RCC-Zellen die Proliferation von T-Zellen unterdrücken können [62,63]. Zu diesen sezernierten Faktoren zählen Zytokine wie der transformierende Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) [64,65], der beispielsweise die Proliferation von T-Zellen inhibiert, oder das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 [52,66], das ebenfalls eine Suppression der zellulären Immunität bewirkt.

Die Tumoren haben somit konkrete Mechanismen entwickelt, um der Antwort der infiltrierenden Lymphozyten zu entkommen. Trotz dieser Mechanismen korreliert eine höhere Anzahl von TIL bei verschiedenen Tumoren mit einer besseren Prognose für die Patienten [67-72]. Beim RCC ist unerfreulicherweise das Gegenteil der Fall. Eine höhere Zahl infiltrierender Lymphozyten korreliert mit einer ungünstigeren Prognose [26,73,74]. Dies wurde allerdings darauf zurückgeführt, dass die Tumoren mit zunehmender Differenzierung und Ausbreitung zunehmend Mutationen aufweisen, was zu einer besseren Erkennung durch das Immunsystem beiträgt [26]. Bei sehr vielen Tumoren korreliert die Aktivität der NK-Zellen [75-77] oder auch die Anzahl der NK-Zellen im Tumorgewebe [78-80] mit einer besseren klinischen Prognose oder einem besseren Ansprechen der Patienten auf eine Immuntherapie [81]. Für das RCC ist bisher allerdings keine solche Studie veröffentlicht worden. NK-Zellen können in der Maus das Wachstum von Tumoren kontrollieren und die Dissemination von Tumorzellen verhindern [82]. Ebenfalls anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass ein adoptiver Transfer von IL-2-aktivierten NK-Zellen eine Eliminierung von Lungen-Metastasen bewirkte [83]. Zudem scheinen NK-Zellen die erste Population zu sein, die den Tumor infiltriert [84]. Weil sie vor allem auch transformierte körpereigene Zellen erkennen, sollten die NK-Zellen die erste Kontrollinstanz gegen neoplastisches Wachstum körpereigener Zellen darstellen [85]. Sie können durch die Erkennung von Zellen mit reduzierter MHC-Klasse-I-Expression die Aktivierung von DC bewirken, die wiederum zytotoxische T-Zellen aktivieren, und stellen somit eine Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem her [86]. Da die infiltrierenden NK-Zellen des RCC bisher wenig charakterisiert worden sind und vor allem, weil viele Charakteristika dieser Zellen erst vor kurzem beschrieben wurden, stellte die Untersuchung der infiltrierenden NK-Zellen einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

1.3 NK-Zellen

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie sind große granuläre und zytotoxische Lymphozyten, die aus einer gemeinsamen lymphoiden und myeloiden Stammzelle im Thymus entstehen (Übersichtsartikel von Colucci *et al.* [87]). Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen tragen sie keinen T-Zell-Rezeptor und erkennen Zielzellen nicht Antigen-spezifisch und MHC-restringiert, sondern lysieren Zellen, die eine anormale Expression von MHC-Molekülen zeigen, unabhängig davon, ob es sich um körpereigene oder um fremde Zellen handelt. Sie tragen dementsprechend nicht zu dem Pool immunologischer Gedächtniszellen bei, die durch ihre Antigen-Spezifität ausgezeichnet sind. NK-Zellen können unter anderem durch die Zytokine IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- α und IFN- β aktiviert werden und sekretieren eine Vielfalt von Zytokinen und Chemokinen wie IFN- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF).

Karlhofer *et al.* haben 1992 erstmals zeigen können, dass auf NK-Zellen exprimierte MHC-spezifische Rezeptoren für die Inhibierung der NK-Zellen verantwortlich sind [88]. Eine MHC-Klasse-I-negative Zelle kann NK-Zellen somit nicht inhibieren und wird von ihr lysiert. Diese als „missing self“ bezeichnete Theorie wurde bereits 1990 von Ljunggren und Karre beschrieben [89].

Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen ist durch eine Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen charakterisiert (Abb. 1.1, Übersichtsartikel von Moretta *et al.* [90], Lanier [91], Long [92] und Ravtech und Lanier [93]).

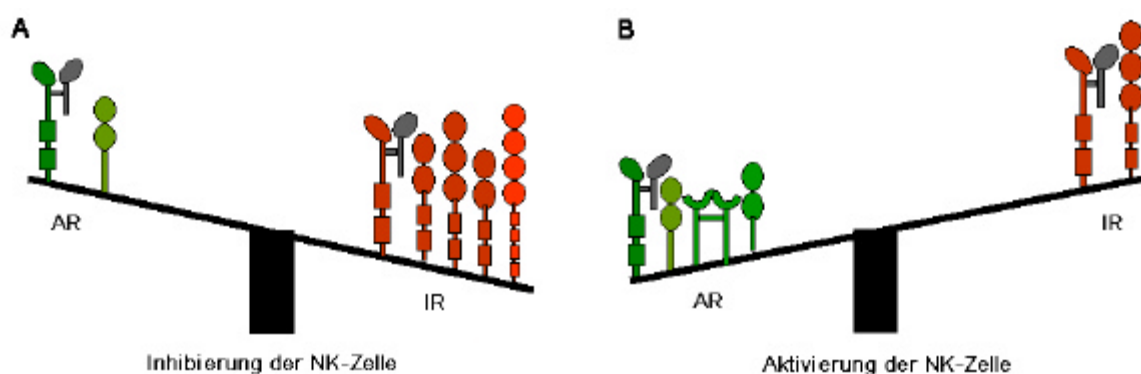


Abbildung 1.1 Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen ist durch eine Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren reguliert. Die NK-Zelle wird inaktiviert, wenn vorwiegend Liganden für inhibitorische Rezeptoren (IR) auf den Zielzellen vorhanden sind (a), während ein stärkeres Signal über aktivierende Rezeptoren (AR) zu einer Aktivierung der NK-Zelle und zu einer Lyse der Zielzelle führt (b).

Die Zytotoxizität der NK-Zellen kann durch verschiedene aktivierende Rezeptoren (AR) ausgelöst werden. Eine Gruppe von AR stellen die Mitglieder der natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR) dar, die erst vor kurzem identifiziert wurden und zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie gezählt werden (Übersichtsartikel von Moretta *et al.* [94]). Unter ihnen befinden sich auch die bislang einzigen bekannten Oberflächenmoleküle, die spezifisch von NK-Zellen exprimiert werden. NKp46 und NKp30 sind auf allen NK-Zellen zu finden [95,96], während NKp44 nur von aktivierten NK-Zellen exprimiert wird [85]. Die Dichte der NCR auf der Zelloberfläche korreliert mit der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen [97]. Eine Blockierung von NKp46 durch spezifische Antikörper führt zu einer Reduzierung der NK-Zell-vermittelten Lyse, die durch die weitere Blockierung der beiden anderen Rezeptoren zusätzlich verstärkt werden kann [96,98]. Die funktionelle Expression dieser Rezeptoren ist für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen also entscheidend. Ihre Liganden sind bisher nicht bekannt. Die Weiterleitung der NCR-Signale erfolgt über intrazelluläre Adaptermoleküle, die mit den Rezeptoren einen Komplex bilden und Tyrosin-enthaltende aktivierende Motive (*immunoreceptor tyrosin-based activating motifs*, ITAM) besitzen, die nach Aktivierung über den Rezeptor von Tyrosinkinasen phosphoryliert werden. Diese wiederum rekrutieren Tyrosinkinasen der ZAP70/Syk-Familie, die das aktivierende Signal weiterleiten. Die AR NKp46 und NKp30 signalisieren auf diese Weise über die CD3 ζ -Kette (CD247), während NKp44 mit dem Adaptermolekül DAP12 gekoppelt ist.

Weitere AR sind in der Familie der sogenannten C-Typ-V-Lektin-Rezeptor-Superfamilie zu finden, wie z. B. NKG2C und NKG2D. Es wird jedoch spekuliert, dass diese Rezeptoren nur dann für die Zytotoxizität der NK-Zellen essentiell sind, wenn die Aktivierung über die NCR eingeschränkt ist [97]. Der NKG2C-Rezeptor erscheint als Komplex mit CD94 auf der Zelloberfläche [99] und erkennt HLA-E-Moleküle [100-102], während NKG2D als Homodimer exprimiert wird und die MHC-Klasse-I homologen Moleküle MICA, MICB und ULBP1-3 erkennt [53]. NKG2D wird auf allen NK-Zellen und allen CD8⁺ T-Zell-Rezeptor $\alpha\beta^+$ T-Zellen exprimiert (Übersichtsartikel von Raulet [103]). Während NKG2D als aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen fungieren kann [104,105] ist er bei T-Zellen nur als kostimulierend wirkender Rezeptor beschrieben, über den alleine keine zytotoxische Aktivität ausgelöst werden kann. NKG2C ist immer mit dem Adaptermolekül DAP12 verbunden, NKG2D ist bei NK-Zellen des Menschen mit dem Adaptermolekül DAP10 gekoppelt, das nicht über den ITAM-ZAP70/Syk-Weg, sondern über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) signalisiert [105].

Ein weiterer Rezeptor auf NK-Zellen ist unter anderem der niedrigaffine Fc γ -Rezeptor III (CD16) [106], sowie weitere Korezeptoren wie 2B4, DNAM-1 oder ICOS, die auch von anderen Leukozyten exprimiert werden können.

Neben den AR werden von jeder NK-Zelle auch verschiedene IR exprimiert, die zum Teil in denselben Familien wie AR gefunden werden können. So ist zum Beispiel der AR NKG2B eine *splice*-Variante des IR NKG2A. NKG2A erscheint ebenfalls gekoppelt mit CD94 auf der Zelloberfläche und wird neben NK-Zellen auch von einigen T-Zellen exprimiert. (Die Expression von IR auf T-Zellen wurde kürzlich von Mingari *et al.* in einem Übersichtsartikel ausführlich beschrieben [107]). Der IR NKG2A besitzt einen längeren intrazellulären Anteil und ist durch die Expression intrazytoplasmatischer inhibitorischer ITIM-Motive (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs*) gekennzeichnet, welche SHP1- und 2-Phosphatasen rekrutieren und eine Abschaltung der NK-Zellen verursachen [92,108]. IR erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle auf Zielzellen. So bindet beispielsweise der CD94/NKG2A-Rezeptorkomplex auf NK-Zellen an das MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E [100,101,109], das auf Zielzellen exprimiert wird und die lytische Aktivität der NK-Zellen inhibiert. Für die Aktivität der NK-Zellen ist immer entscheidend, ob die Stärke des aktivierenden oder des inhibierenden Signals überwiegt (*Abb. 1.1*). Der IR NKG2A hat hierbei einen Vorteil, da er mit höherer Affinität an HLA-E bindet als der AR NKG2C [110]. Zudem bewirkt die Bindung des IR NKG2A eine Dephosphorylierung und damit eine Abschaltung aller Mitglieder der aktivierenden NCR [111]. Die Inhibierung einer NK-Zelle ist somit einfacher als ihre Aktivierung. Dies ist wichtig, da die NK-Zellen über viele verschiedene Liganden für AR aktiviert werden können und nicht wie T-Zellen Antigen-spezifisch und gegenüber körpereigenen Zellen tolerant sind. Dieser Inhibierungsmechanismus demonstriert demnach eine Sicherung des Immunsystems vor autoimmunen Angriffen. Die Erkennung von HLA-E-Molekülen auf der Zelloberfläche stellt einen wichtigen Kontrollmechanismus des Immunsystems dar. Die Expression von HLA-E auf der Oberfläche von Zellen muss durch die Signalpeptide anderer HLA-Klasse-I-Allotypen stabilisiert werden. Eine Reduzierung der Expression einzelner MHC-Moleküle bewirkt somit über eine Reduzierung der verfügbaren Signalmoleküle auch eine Reduzierung von HLA-E auf der Oberfläche der Zelle [100,112]. Die Anzahl der HLA-E-Moleküle ist demnach eng an die Expression von HLA-A, -B, und -C gekoppelt. NK-Zellen können so über die Expression eines IR wie NKG2A eine insgesamt reduzierte MHC-Expression auf Zielzellen erkennen.

Eine weitere wichtige Rezeptorfamilie stellt die *killer cell immunoglobulin receptor superfamily* (KIR) dar, die zur Ig-Superfamilie zählt und sowohl IR als auch AR beinhaltet, die ausnahmslos auf Chromosom 19 gruppiert sind. Eine neuere Bezeichnung der einzelnen Mitglieder orientiert sich am Aufbau der einzelnen Rezeptoren

und beschreibt die Anzahl extrazellulärer Domänen (D) und die Länge des intrazytoplasmatischen Anteils, wobei ein längerer intrazytoplasmatischer Anteil (L) charakteristisch für IR ist, während ein kürzerer Anteil (S) von AR exprimiert wird. Dieser ist bei AR durch positiv geladene Aminosäuren gekennzeichnet, die eine Bindung an Adaptermoleküle ermöglichen. Die Adaptermoleküle sind in der Membran verankert und leiten mithilfe langer intrazytoplasmatischer Anteile die positiven Signale in das Zellinnere weiter. (Die Nomenklatur der KIR-Familie ist bei André *et al.* [113] beschrieben.) Innerhalb der KIR2D-Rezeptoren können zwei Gruppen an IR unterschieden werden, die sich durch ihre Liganden unterscheiden: KIR2DL2 (p58.2, CD158b₁) und KIR2DL3 (p58.3, CD158b₂) erkennen die HLA-C-Allele Cw1,3,7,8 und 12, während KIR2DL1 (p58.1, CD158a) die HLA-C-Allele Cw2,4,5 und 6 erkennt. Beide Allelgruppen unterscheiden sich durch den Austausch von nur zwei Aminosäuren an den Positionen 77 und 80 der α 1-Domäne [114-116]. Das Immunsystem ist somit in der Lage nicht nur die MHC-Klasse-I-Moleküle voneinander zu unterscheiden, sondern auch die spezifischen HLA-Allotypen, so dass die spezifische Reduzierung einzelner HLA-Allele auf Zielzellen erkannt werden kann. Ein weiterer Vertreter der Ig-Superfamilie ist der IR p70 (KIR3DL1, CD158e₁), der spezifisch den HLA-Bw4-Allotyp erkennt [117]. Mitglieder der Familie der Ig-ähnlichen Transkripte (*Ig-like transcripts*, ILT, CD85-Familie) erkennen verschiedene MHC-Klasse-Ia und -Ib-Liganden [118,119], wie zum Beispiel ILT2 (LIR-1, CD85j), der unter anderem das Klasse-Ib-Molekül HLA-G zu erkennen scheint [109,120] und neben NK-Zellen auch auf einigen T-Zellen, DC und Monozyten zu finden ist. HLA-G wird nur auf Thymusgewebe und der Plazenta exprimiert; dies stellt einen Mechanismus dar, der den semi-allogenen Fötus vor einem Angriff des mütterlichen Immunsystems schützen soll [121]. Allerdings wurde kürzlich beschrieben, dass die Expression von HLA-G auf einigen Tumoren wie dem RCC [60], dem Melanom [122] oder dem Mammakarzinom [123] induziert ist. Die Expression von HLA-G auf Tumoren könnte demnach einen Mechanismus darstellen, über den die Tumorzellen dem Angriff von NK-Zellen entgehen. Jede NK-Zelle trägt ein individuelles Muster an IR, so dass die Erkennung mehrerer verschiedener HLA-Allele möglich ist; dies ist eine wichtige Errungenschaft des Immunsystems, da viele Viren oder Tumoren die Expression der HLA-Allele auf der Zelloberfläche modulieren können, um dem Angriff spezifischer T-Zellen zu entgehen [53,54]. So werden sie jedoch anfällig für den Angriff durch NK-Zellen. In *Abbildung 1.2* sind einige für diese Arbeit wichtige Vertreter von AR und IR mit ihren zugehörigen Liganden und Adaptermolekülen gezeigt.

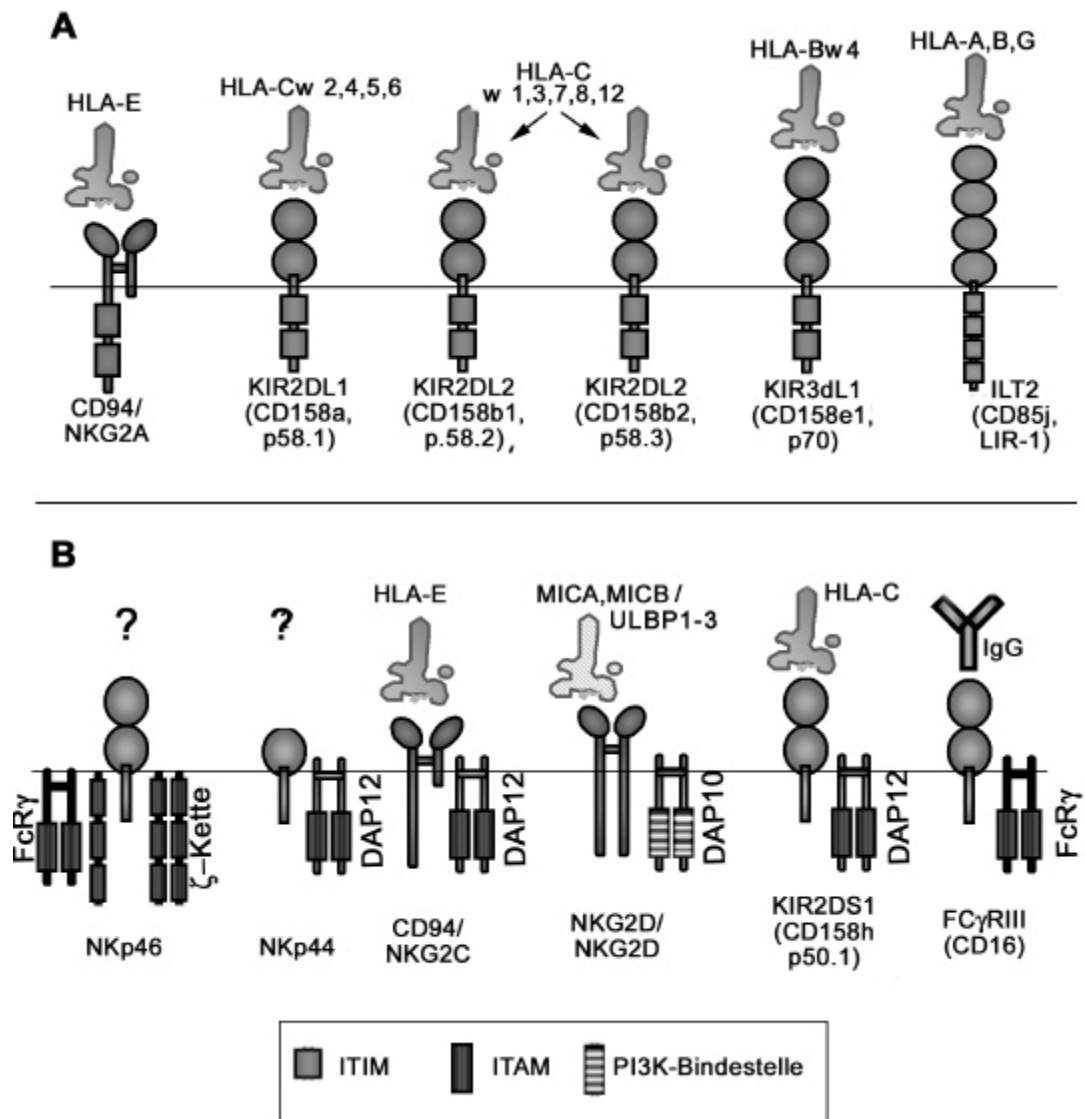


Abbildung 1.2 Inhibitorische (a) und aktivierende (b) Rezeptoren verschiedener Rezeptorfamilien mit ihren Liganden und den jeweiligen intrazellulären Adaptermolekülen. Die Liganden für NKp46 sowie für NKp44 sind bisher nicht identifiziert worden.

1.4 Regulatorische Zellen

Als regulatorisch wirkend werden meist Zellen beschrieben, die verschiedene aktivierende Vorgänge des Immunsystems unterdrücken. Sie werden deshalb auch oftmals als Suppressor-Zellen bezeichnet und spielen eine erhebliche Rolle bei der peripheren Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen. In den letzten Jahren sind eine Reihe regulatorischer Lymphozyten beschrieben worden. So wurden beispielsweise sowohl CD4⁺ T-Zellen, als auch CD8⁺ T-Zellen entdeckt, die eine Antigen-induzierte Aktivierung anderer Zellen unterdrücken können. Jonuleit und Mitarbeiter haben berichtet, dass durch die wiederholte Stimulation mit allogenen unreifen DC eine Population regulatorischer CD4⁺ T-Zellen entsteht, die sich durch die Produktion von IL-10 auszeichnet [124]. Eine weitere Gruppe regulatorischer CD4⁺ T-Zellen stellen die sogenannten Typ-1 regulatorischen T (Tr1)-Zellen dar, die durch eine niedrige Proliferationskapazität sowie eine starke Expression von IL-10 und TGF- β charakterisiert sind und durch Stimulation mit einer hohen IL-10-Dosis aus T-Zellen entstehen (Übersichtsartikel von Groux *et al.* [125]). Regulatorisch wirkende CD8⁺ T-Zellen wurden unter anderem als Suppressor-T-Zellen bezeichnet und sind durch die Erkennung fremder Antigene gekennzeichnet. Sie lösen eine Toleranz Antigen-präsentierender Zellen aus, die wiederum eine Inhibierung von CD4⁺ T-Zellen bewirken [126].

Es ist außerdem geschildert worden, dass regulatorische T-Zellen die Zytotoxizität von NK-Zellen unterdrücken können [127]. Dies wurde allerdings bisher nicht durch weitere Publikationen bestätigt. Cooper *et al.* haben kürzlich veröffentlicht, dass selbst NK-Populationen, die durch die Produktion bestimmter Zytokine wie TNF- α und IL-10 charakterisiert sind, immunregulatorische Funktionen zu haben scheinen [128].

Die am ausführlichsten untersuchte Gruppe regulatorischer Zellen sind jedoch CD4⁺ T-Zellen, die durch eine hohe Expression des IL-2-Rezeptors CD25 charakterisiert sind und die Proliferation anderer CD4⁺ T-Zellen Zell-Zell-Kontakt-abhängig unterdrücken. Diese Zellen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als T_{reg}-Zellen bezeichnet. Sakaguchi und Mitarbeiter haben 1995 erstmals beschrieben, dass die Depletion dieser Zellen in Mäusen verschiedene autoimmune Reaktionen hervorruft, und schrieben ihnen deshalb eine Rolle bei der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen zu [129]. Die Entwicklung der T_{reg}-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Zum Teil entstehen sie sicherlich im Thymus, da eine Thymektomie bei drei Tage alten Mäusen die Anzahl der T_{reg}-Zellen erheblich reduziert und verschiedene autoimmune Krankheiten verursacht [130]. Die Rolle positiver und negativer Selektion über im Thymus präsentierte Selbst-Antigene ist dabei noch nicht geklärt [131-133].

Allerdings scheint es auch eine sogenannte infektiöse Toleranz (*infectious tolerance*) zu geben, die beschreibt, dass T_{reg}-Zellen bestimmte regulatorische Eigenschaften bzw. die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen auf andere T-Zellen übertragen können [134-136]. Es scheint auch möglich zu sein, dass T_{reg}-Zellen in der Peripherie durch die wiederholte Stimulation mit bestimmten Antigenen entstehen [137].

Phänotypisch sind die T_{reg}-Zellen durch die Expression von CD45RO, TGF-β1, und des Glukocorticoid-induzierten-TNF-Rezeptor-ähnlichen Gens (GITR) auf der Zelloberfläche und großer Mengen des zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens (CTLA)-4 im Zellinneren charakterisiert [138-141]. CTLA-4 wird von aktivierten Lymphozyten exprimiert und dient zur Herabregulierung der Immunantwort, indem es inhibitorische Signale an die Zelle vermittelt (Übersichtsartikel von Chambers *et al.* [142]). T_{reg}-Zellen haben zudem ein uneingeschränktes T-Zell-Rezeptor-Repertoire [143], regulieren Antigen-unspezifisch und nicht-MHC-restringiert, allerdings muss der eigene T-Zellrezeptor zuvor durch das spezifische Antigen aktiviert worden sein [138,140,144]. Meist sind dies Selbst-Antigene, es gibt allerdings auch T_{reg}-Zellen, die fremde Antigene erkennen [131]. T_{reg}-Zellen sekretieren vermehrt IL-10 und TGF-β, wenig IL-2, IL-4 und IFN-γ und proliferieren *in vitro* nur durch Inkubation mit kombinierten Antikörpern gegen CD3 und CD28 [138,140,145]. In Zielzellen inhibieren sie die IL-2-Synthese und induzieren einen Zellzyklusarrest [138,144]. *In vitro* kann diese Suppression durch IL-2 aufgehoben werden [138]. Der Mechanismus der Suppression wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Übersichtsartikel von Shevach [146]). Es scheint sicher zu sein, dass die Sekretion von IL-10 und TGF-β für die Wirkung der T_{reg}-Zellen nicht ausreichend und nicht entscheidend ist [140,145]. Dagegen wurde berichtet, dass die Expression von aktivem TGF-β1 auf der Zelloberfläche einerseits essentiell, andererseits unnötig für die regulatorische Wirkung der Zellen ist [139,147]. Gleiches gilt für die Expression von CTLA-4 [138,144,148]. Diese Diskrepanzen können in der Tatsache begründet sein, dass verschiedene regulatorisch wirkende Zellpopulationen existieren, die bisher nicht durch spezifische Marker unterschieden werden können, aber durch eine unterschiedliche Entwicklung und Wirkungsweise charakterisiert sind. Das einzige kürzlich beschriebene Protein, das entscheidend für die Entstehung regulatorischer Zellen zu sein scheint, ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead/winged helix transcription factor* bzw. Scurfin). Hori *et al.* und Fontenot *et al.* haben beschrieben, dass die Expression dieses transkriptionellen Repressors für die Aktivität der T_{reg}-Zellen essentiell ist und seine Expression in ruhenden T-Zellen ausreicht, um die Zellen in regulatorische Zellen zu konvertieren [149,150] (Übersichtsartikel von Ramsdell *et al.* [151]).

Das Protein ist seit längerem im Zusammenhang mit Toleranz und Autoimmunität bekannt, da seine Mutation die Entstehung des autoimmunen Syndroms IPEX (Immundysfunktion-, Polyendokrinopathie- und Enteropathie-verursachendes X-gekoppeltes Syndrom) auslöst [152-154].

Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden regulatorische Zellen bald in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen gebracht, da die körpereigenen Tumorzellen auf die Toleranz des Immunsystems angewiesen sind. So wurde berichtet, dass die Zahl der T_{reg}-Zellen im peripheren Blut und Tumorgewebe verschiedener Patienten erhöht ist [127,155-157]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CD4⁺CD25⁺ Zellen die Antwort des Immunsystems gegen den Tumor verbessert [158-162]. Aufgrund des allgemein großen Interesses an dieser Zellpopulation wurde auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht, ob regulatorische Zellen im Gewebe des Nierenzellkarzinoms gefunden werden können.

1.5 Aufgabenstellung

Die Rolle des Immunsystems bei Toleranz und Abstoßung des Nierenzellkarzinoms ist trotz zahlreicher Untersuchungen weitgehend ungeklärt. Sowohl für die Entwicklung neuer wirkungsvoller Immuntherapien als auch für die Untersuchung und Einschätzung immunologischer Vorgänge bei bereits angewandten Therapien ist die Charakterisierung des Immunsystems von RCC-Patienten jedoch von entscheidender Bedeutung. So ist beispielsweise nicht vollends aufgeklärt, warum zahlreiche Lymphozyten das Tumorgewebe zwar infiltrieren und somit eine Veränderung des Normalzustands erkennen, die Ausbreitung des Tumors allerdings nicht verhindern können. Aufgrund dieser Beobachtung wird oftmals eine funktionelle Inaktivität der infiltrierenden Lymphozyten angenommen, allerdings wurde bisher nicht gezeigt, dass die Lymphozyten vor Ort tatsächlich zytotoxisch inaktiv sind. Ebenso sind bislang nur wenige Mechanismen aufgedeckt worden, die eine funktionelle Inaktivierung der Lymphozyten verursachen könnten. Das Interesse an TIL galt meist der Identifizierung Tumor-spezifischer T-Zellen, die durch Langzeitkultivierung und Klonierung der infiltrierenden Zellen gewonnen wurden und bei der Identifizierung Tumor-spezifischer Antigene behilflich sein sollten. Die Kultivierung der TIL ließ jedoch keine Rückschlüsse mehr auf die im Gewebe vorhandenen Eigenschaften der Zellen zu. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb phänotypische und vor allem funktionelle Eigenschaften der infiltrierenden Lymphozyten im Tumorgewebe charakterisiert werden. Immunhistochemische Färbungen sollten dabei zunächst die Gegebenheiten *in situ* charakterisieren. Weiterhin sollte die Isolierung der infiltrierenden Lymphozyten zusätzliche Untersuchungen ermöglichen. Das Wissen um Ursachen für eine Inaktivierung der Lymphozyten *in situ* könnte in Zukunft dazu beitragen durch gezielte Stimulationen bestimmter Zellpopulationen eine wirkungsvolle Abwehr des Tumors zu erreichen.

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Beschreibung der infiltrierenden NK-Zellen darstellen, die durch ihre Wirkungsmechanismen eine entscheidende Rolle bei der Abstoßung von Tumoren spielen könnten. Deren Phänotyp und zytotoxische Aktivität ist im RCC bisher allerdings wenig untersucht worden, da viele Eigenschaften der NK-Zellen erst in den letzten Jahren charakterisiert worden sind. Weiterhin sollte ein besonderes Augenmerk auf die Analyse regulatorisch wirkender Zellpopulationen im isolierten Lymphozyteninfiltrat gelegt werden, da diese bei der Toleranz gegenüber Tumoren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben.

2. Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
Automatischer Zellsortierer <i>autoMACS™</i>	Miltenyi Biotech
Bestrahlungsanlage <i>Gammacell 40</i>	Atomic Energy
Didestilliergerät <i>Easypure RF</i>	Barnstead
Durchflusszytometer <i>Bio-Plex™</i>	Bio-Rad
Durchflusszytometer, <i>FACSCalibur™</i>	Becton Dickinson
Einfrierbox	Nalgene
Elektrophoresekammern, horizontal	Invitrogen
Gefrierschrank, -20 °C <i>Premium</i>	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C <i>HFU86</i>	Heraeus
Geldokumentationssystem, <i>Multi Imager™</i>	Bio-Rad
Heizblock <i>Thermostat 5320</i>	Eppendorf
Inkubationsschrank	Heraeus
Kryotom <i>CM300</i>	Leica
Kühlschränke, 4 °C	Liebherr
Mehrkanalpipetten 25-200 µl	Dunn Labortechnik
Mikropipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Mikroskope	
<i>DMLS</i>	Leica
invers, <i>Axiovert 25</i>	Zeiss
Mikrowelle <i>Micromat</i>	AEG
Multipipetten, <i>Multipette plus</i>	Eppendorf
Neubauerzählkammer	Brand
pH-Meter, <i>Microprocessor</i>	WTW
Pipettierhilfe <i>Pipetus-Akku</i>	Hirschmann
Spannungsgerät <i>ST606T</i>	Invitrogen
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Klimatechnik
Stickstofftank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer Griesheim

MATERIAL

Szintillationsmessgerät <i>TopCount</i>	Canberra Packard
Temperaturzyklusautomaten	
<i>LightCycler™</i>	Roche
<i>PTC200</i>	MJ Research
Vortexer <i>VF2</i>	IKA Labortechnik
Waagen	
Präzisionswaage <i>BP2100</i>	Sartorius
Analysenwaage <i>MCI</i>	Sartorius
Wasserbad <i>SUB</i>	Julabo
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf
Kühlzentrifuge <i>Multifuge3 S-R</i>	Heraeus
Zentrifugenadapter (Kühlblock)	Roche
für den <i>LightCycler™</i>	

MATERIAL

Verbrauchsmaterial	Hersteller
<i>Bio-Plex MCV-Plate (96-well)</i>	Bio-Rad
Einfrierröhrchen	Nunc
Einweg-Pasteurpipetten, steril	Peske OHG
Einwegpipetten, steril (2,5,10,25 ml)	Falcon
FACS-Röhrchen	
1,2 ml	Peske OHG
5 ml	Falcon
Handschuhe <i>Sempermed Nitril</i>	Semperit
Kapillaren für den LightCycler™	Roche
Multipipettenspitzen <i>Combitips Plus</i>	Eppendorf
Objektträger <i>Superfrost® Plus</i>	Menzel-Gläser
Papierfilter	Schleicher und Schuell
Petrischalen, steril	Falcon
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000 µl)	Biozym
Reaktionsgefäße (0,2 ml) <i>Softstrips</i>	Biozym
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Starlab
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml) <i>Safelock</i>	Eppendorf
Szintillationsmessplatten <i>Luma-Plate 96</i>	Canberra Packard
Skalpelle Nr. 20	Feather
Spritzen <i>Perfusion 50</i>	Godan
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm, 0,8 µm)	Schleicher und Schuell
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Falcon
Zellkulturplatten (6-well, 24-well)	Falcon
Zellkulturplatten (96 well, Rundboden)	TPP
Zellsieb <i>Cellstrainer</i>	Falcon
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon

2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
AB-Serum	Biotest
Aceton	Merck
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
⁵¹ Cr-Natriumchromat (5 mCi/ml)	NEN
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 1 %	Bio-Rad
Ethylen-diamino-tetra-acetat (EDTA)	Invitrogen
Gelatine	Merck
Glycerin	Merck
Hämalaun	Merck
Isopropanol	Merck
Levamisol	Sigma
Methanol	Merck
Naphthol	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumnitrit	Merck
Neufuchsin	Sigma
PBS (Phosphat-gepufferte Saline) 10 x	Universitätsapotheke
Propidiumjodid 2 % (w/v)	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Invitrogen
Salzsäure, 37 %	Merck
Saponin	Sigma
TRIS	Merck
Trypanblau 0,4 %	Sigma
Wasserstoffperoxid, 3 %	Universitätsapotheke

2.3 Reagenzien für die Immunhistologie

1 x PBS

10 x PBS

in A. dest.

Acetatpuffer 0,1 M

210 ml 0,1 N Essigsäure

790 ml 0,1 M Natriumacetat

pH 5,2

AEC-Substratlösung

4 mg AEC in 1ml DMF lösen

14 ml 0,1 M Acetatpuffer hinzufügen

0,15 ml 3 % H₂O₂ hinzufügen

filtrieren

Neufuchsinlösung

5 g Neufuchsin in 100 ml 2N HCl

Neufuchsin-Substratlösung

30 mg Levamisol in 20,5 ml 0,2 M TRIS und 62,5 ml A. dest. lösen

16 mg Natriumnitrit in 0,415 ml A. dest. lösen und 0,166 ml Neufuchsinlösung zugeben

42 mg Naphthol in 0,5 ml DMF lösen

alle Lösungen mischen und filtern

2.4 Zellkultur

2.4.1 Verbrauchsmedien, Zusätze und andere Reagenzien

Produkt	Hersteller
<i>Bio-Plex Sheath Fluid</i>	Bio-Rad
<i>CellFix</i> in PBS (10 x)	Becton Dickinson
<i>FACS-Flow</i>	Becton Dickinson
<i>FACS-Rinse</i>	Becton Dickinson
<i>FACS-Safe</i>	Becton Dickinson
Ficoll	Biochrom
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Geneticin (G418-Sulfat)	Pan Biotech GmbH
Heparin 25000 IE	Essex Pharma
Humanserum (Gemisch aus 30 Spendern)	H. Pohla, eigene Herstellung
Hygromycin B	Roche
IL-2, rekombinant, human (<i>Proleukin</i>)	Cetus
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen
MEM (100 x), nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen
Natriumpyruvat 100 mM	Invitrogen
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	Cell Concepts
Penicillin/Streptomycin (100 x) (10000 U/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin)	Invitrogen
Phytohämagglutinin (PHA)	Difco
RPMI 1640	Invitrogen
Trypsin-EDTA in PBS (10 x)	Invitrogen

2.4.2 Puffer

FACS-Puffer

1 % FCS

in PBS

MACS-Puffer

2 mM EDTA

0,2 % BSA

in PBS

autoMACS™-Waschlösung

1000 ml PBS

2 mM EDTA

autoMACS™-Laufpuffer

1000 ml PBS

2 mM EDTA

0,5 % BSA

autoMACS™-Reinigungslösung

70 % Ethanol

in A. dest.

2.4.3 Medien

RPMI III

RPMI 1640

2 mM L-Glutamin

1 x Penicillin/Streptomycin

1 mM Natriumpyruvat

1 x MEM

Komplettmedium

10 % FCS in RPMI III

TIL-Medium

10 % Humanserum in RPMI III

Selektionsmedium A (für K562-E)

0,5 mg/ml Hygromycin B in Komplettmedium

*Selektionsmedium B (für K562-Cw*0304/K562-G)*

0,4 mg/ml G418 in Komplettmedium

Selektionsmedium C (für RCC-26endog1)

0,7 mg/ml G418 in Komplettmedium

NKL-Medium

100 U/ml IL-2 in Komplettmedium

CML-Medium

15 % FCS in RPMI III

Einfriermedium

20 % DMSO in RPMI III

2.5 Gewebeproben

Die in *Tabelle 2.1* aufgeführten Gewebeproben wurden von der urologischen Abteilung des Klinikums Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Alfons Hofstetter), Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt. Mitarbeiter des Pathologischen Institutes am Klinikum diagnostizierten für alle Tumorgewebeproben das Vorliegen eines Nierenzellkarzinoms vom klarzelligen Typ. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Namen der Patienten durch laufende Nummern ersetzt. Von jedem Patienten wurde zusätzlich Normalparenchym der tumortragenden Niere für immunhistologische Untersuchungen asserviert.

Tabelle 2.1 Verwendete Gewebeproben.

Patient Nr. ¹	Alter ²	Geschlecht ³	TNM-Klassifikation ⁴	Grading ⁵
174	71	W	T3a N0 M0 Stadium III	G3
2805	68	W	T2 N0 M0 Stadium II	G2
2807	61	W	T2 N0 M0 Stadium II	G2
2818	65	M	T3b N1 M0 Stadium III	G3
2836	40	M	T1 N0 M0 Stadium I	G2
2840	77	W	T3b N0 M1 Stadium IV	G2
2904	84	M	T3 N0 M1 Stadium IV	G2
2907	68	M	T1 N0 M0 Stadium I	G2
2924	51	M	T1 N0 M0 Stadium I	G2
2926	52	M	T1 N0 M0 Stadium I	G2-3
2928	57	M	T2 N0 M0 Stadium II	G3
2936	61	M	T3b N0 M0 Stadium III	G3
2939	72	M	T2 N0 M0 Stadium II	G2
2951	77	M	T3 N0 M0 Stadium III	G2
2952	59	W	T3b N2 M0 Stadium IV	G3
2986	74	W	T3b N0 M0 Stadium III	G2
2988	61	M	T3b N2 M1 Stadium IV	G3

¹ Patientennummern wurden der Tumordatenbank des Labors für Tumourimmunologie entnommen.

² Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme.

³ Geschlecht der Patienten. M= männlich, W= weiblich.

⁴ Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren nach den Richtlinien der *Union International Contre le Cancre (UICC)* und des *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* [163,164].

⁵ Histologisch beurteilter Grad der Tumordifferenzierung (Grading) nach *UICC* und *AJCC* [163,164].

2.6 Blutproben

Die in *Tabelle 2.2* aufgeführten heparinisierten Blutproben wurden von freiwilligen Spendern zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.2 Verwendete Blutproben.

Spender ¹	Alter ²	Geschlecht ³	Typ ⁴
RCC-Patienten			
174	71	W	TP
2926	52	M	TP
2928	57	M	TP
2936	61	M	TP
2986	74	W	TP
2989	69	W	TP
Normalspender			
CA	25	M	NS
HP	44	W	NS
JS	26	W	NS
PH	30	M	NS
FK	21	M	NS

¹ Nummer der Tumorpatienten bzw. aus der Spenderdatenbank des Labors für Tumormunologie übernommene Kürzel für Normaspender. Mit Einwilligung der Normaspender wurden keine Identifikationsnummern vergeben.

² Alter der Spender zum Zeitpunkt der Gewebentnahme.

³ Geschlecht der Blutspender. W= weiblich, M= männlich.

⁴ Spendertyp; TP= Tumorpatient, NS= Normalspender.

2.7 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien, deren Kultivierung, für diese Arbeit wichtige Charakteristika und Herkunft sind in *Tabelle 2.3* aufgeführt.

Tabelle 2.3 Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Wachstum ¹	Charakteristika	Medium ²	Literatur	Quelle
K562	Suspension (F)	Erythroleukämiezelllinie, MHC-Klasse-I-negativ	KM	[165]	ATCC
K562-Cw*0304	Suspension (F)	K562, transfiziert mit HLA-Cw*0304	SM B	[166]	E. Weiß
K562-E (B8-β2m)	Suspension (F)	K562, transfiziert mit HLA-E ^{B5} und dem Signalpeptidkonstrukt HLA-B8-β ₂ m	SM A	[166]	E. Weiß
K562-G	Suspension (F)	K562, transfiziert mit HLA-G	SM B	[166]	E. Weiß
RCC-26	Adhärent (F)	Nierenzellkarzinomlinie	KM	[167]	D.J. Schendel
RCC-26endoy1	Adhärent (F)	IFNγ-Transfektante von RCC-26	SM C	[168,169]	D.J. Schendel
NKL	Suspension (F)	NK-Leukämiezelllinie	NKL	[170]	M. Lopez- Botet
P815	Adhärent (F)	Murine Mastozytomzelllinie	KM	[171]	ATCC

¹ Wachstum und Kultivierung der Zelllinie. F= Zellkulturflaschen, P= 24-*well*-Platten.

² Verwendete Medien sind unter 2.4.3 beschrieben. SM= Selektionsmedium, KM= Kompletmedium, NKL= NKL-Medium.

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in *Tabelle 2.4* aufgeführt.

Tabelle 2.4 Verwendete Primärantikörper.

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugation	Firma/Herkunft	Verwendung ¹
Isotypkontrolle	g1+g1	IgG1+IgG1	FITC+PE	BD	FACS
Isotypkontrolle	MOPC21	IgG1	APC	BD	FACS
Isotypkontrolle	MOPC21	IgG1	keine	Sigma	IHC
Isotypkontrolle	KB	IgG2b	keine	E. Kremmer	IHC
Isotypkontrolle	27-35	IgG2b	PE	BD	FACS
Isotypkontrolle	27-35	IgG2b	FITC	BD	FACS
Isotypkontrolle	X39	IgG2a	FITC	BD	FACS
Isotypkontrolle	UPC10	IgG2a	keine	Sigma	FACS
CD3e	UCHT1	IgG1	keine	DAKO	IHC
CD3e	UCHT1	IgG1	APC	BD	FACS
CD3e	UCHT1	IgG1	FITC	BD	FACS
CD3 ζ =CD247	G3	IgG2a	FITC	Serotec	FACS
CD3 ζ =CD247	8D3	IgG1	keine	BD	IHC
CD4	MT310	IgG1	keine	DAKO	IHC
CD4	13B8.2	IgG1	PE	Beckmann	FACS
CD4	RPA-T4	IgG1	APC	BD	FACS
CD8	KB	IgG2b	keine	E. Kremmer	IHC
CD8	RPA-T8	IgG1	APC	BD	FACS
CD8	B9.11	IgG1	PE	Beckmann	FACS
CD14	TÜK4	IgG2a	keine	DAKO	IHC
CD16	3G8	IgG1	FITC	BD	FACS
CD25	M-A251	IgG1	FITC	BD	FACS
CD56	ERIC1	IgG1	keine	Novocastra	IHC
CD56	NKH1-RD1	IgG1	APC	Beckmann	FACS
CD56	NKH1-RD1	IgG1	PE	Beckmann	FACS
CD56	AF12-7H6.6.11	IgG1	<i>bead</i> ²	Miltenyi	Separation
CD66b	KB	IgG1	keine	R. Kammerer	IHC
CD69	FN50	IgG1	PE	BD	FACS
CD94	HP-3D9	IgG1	FITC	BD	FACS
CD103	Ber-ACT8	IgG1	keine	DAKO	IHC
CD103	Ber-ACT8	IgG1	FITC	BD	FACS
CD158a	EB6	IgG1	PE	Beckmann	FACS

MATERIAL

CD158b	GB183	IgG1	PE	Beckmann	FACS
CD158e ₁	Z27	IgG1	PE	Beckmann	FACS
E-Cadherin	NCH-38	IgG1	keine	DAKO	IHC
G250	KB	IgG1	keine	Willex	IHC
HLA-ABC,E,G	W6/32	IgG2a	keine	DAKO	FACS
ILT2	VMP55	IgG1	FITC	DAKO	FACS
NKp46	45G8	IgG1	keine	M. Colonna	IHC/CML
NKp46	BAB281	IgG1	PE	Beckmann	FACS
NKG2A	Z199	IgG2b	PE	Beckmann	FACS
NKG2D	149810	IgG1	PE	R&D	FACS
NKG2D	149810	IgG1	keine	R&D	CML
Perforin	δG9	IgG2b	FITC	BD	FACS
Perforin	δG9	IgG2b	keine	BD	IHC

¹ IHC= Immunhistochemie, CML= Zell-vermittelte Lyse (*cell mediated lysis*), KB= keine Bezeichnung.

² Antikörper sind an kleine Eisen-Kügelchen (*beads*) gebunden und somit ferromagnetisch.

2.8.2 Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper sind in *Tabelle 2.5* aufgeführt.

Tabelle 2.5 Verwendete Sekundärantikörper.

Spezifität	Organismus ¹	Konjugation	Herkunft	Verwendung
αMaus	Ziege	PE	Dianova	FACS
αRatte	Kaninchen	HRP	DAKO	IHC
αMaus	Kaninchen	HRP	DAKO	IHC
αMaus	Kaninchen	keine	DAKO	IHC
αAP	Maus	AP	DAKO	IHC

¹ Organismus, aus denen der jeweilige Antikörper gewonnen wurde.

HRP= *horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase), IHC= Immunhistochemie.

2.8.3 Reagenziensysteme für das Bio-Plex™-Gerät

Reagent kit A (Bio-Rad, Katalognummer 171-304000)

Human 8-Plex Cytokine Panel (Bio-Rad, Katalognummer 171-A11080)

(IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IFN-γ, GM-CSF)

Bio-Plex Human IL-5 Assay (Bio-Rad, Katalognummer 171-B12533)

Bio-Plex Human IL-13 Assay (Bio-Rad, Katalognummer 171-B13751)

Bio-Plex Calibration Kit (Bio-Rad, Katalognummer 171-203060)

2.9 Molekularbiologie

2.9.1 Primer

Die verwendeten Primer sind in *Tabelle 2.6* aufgeführt.

Tabelle 2.6 Verwendete Primer.

Spezifität	Primer		Herkunft	Verwendung
	Orientierung	Sequenz		
G-6-PDH		unbekannt	Search-LC	LightCycler™
IFN- γ		unbekannt	Search-LC	LightCycler™
IL-2		unbekannt	Search-LC	LightCycler™
CD2		unbekannt	Search-LC	LightCycler™
Foxp3	<i>sense</i>	5' CAGCACATTCCCAGAGTTCCTC 3'	E. Suri-Payer [149]	LightCycler™
	<i>antisense</i>	5' GCGTGTGAACCAGTGGTAGATC 3'		
IL-10		unbekannt	Search-LC	LightCycler™
DAP10	<i>sense</i>	5' ATGATCCATCTGGGTCACATC 3'	C.S. Falk	PCR
	<i>antisense</i>	5' TCAGCCCCTGCCTGGCAT 3'		
DAP12	<i>sense</i>	5' TCATGGGGGGACTTGAACC 3'	C.S. Falk	PCR
	<i>antisense</i>	5' GATTCGGGCTCATTTGTAATA 3'		
GAPDH	<i>sense</i>	5' CGATGCTGGCGCTGAGTAC 3'	Genzentrum	PCR
	<i>antisense</i>	5' CGTTCAGCTCAGGGATGACC 3'		
oligodT		(T) ₁₂₋₁₈	Invitrogen	Transkription

Einige Primersequenzen wurden vom Hersteller nicht mitgeteilt (unbekannt).

2.9.2 Enzyme

Reverse Transkriptase

Superscript II 200 U/ μ l, (Invitrogen)

Polymerasen

Platinum Taq Polymerase, (Invitrogen)

LightCycler™ FastStart Enzyme,

aus *LightCycler™ FastStart DNA Master SYBR® Green I* Reagenziensystem (Roche)

2.9.3 Reagenziensysteme

RNA-Isolierung

RNAqueous-4PCR, Ambion (Katalognummer 1914)

cDNA-Reinigung

Quiaquick Purification Kit, Quiagen (Katalognummer 28104)

2.9.4 Sonstige Reagenzien

Reverse Transkription

dNTP-Mix 10 mM, Invitrogen

Ribonuklease-Inhibitor *SuperaseIn* 1 U/μl, Ambion

0,1 M DTT, Invitrogen

5 x *1st strand buffer*, Invitrogen

H₂O PCR-*grade*, Roche

PCR

10 x *PCR Puffer*, Invitrogen

MgCl₂ 50 mM, Invitrogen

Quantitative PCR am *LightCycler*TM

*LightCycler*TM *FastStart Reaction Mix*, Roche

MgCl₂ 25 mM, Roche

H₂O PCR-*grade*, Roche

DNS-Agarosegelelektrophorese

ReadyLoad 100 bp DNA ladder Fragmentlängenstandard, Invitrogen

Agarose, Invitrogen

1 x *TAE-Puffer*:

10 x *TAE-Puffer*, Invitrogen

in A. dest.

6 x *Auftragspuffer für Agarosegele*:

0,5 % Bromphenolblau

30 % Glycerin

in 1 x *TAE*

2.10 Personen- und Herstellerverzeichnis

Person/Hersteller	Institut/Sitz
AEG	Nürnberg
Ambion	Austin, Texas, USA
Anz, David	Institut für Molekulare Immunologie, GSF München
ATCC	Rockville, Maryland, USA
Atomic Energy of Canada Ltd.	Ottawa, Ontario
Barnstead	Dubuque, Iowa, USA
BDK Luft- und Reinraumtechnik	Sonnenbühl
Beckmann Coulter/ Immunotech	Palo Alto, Kalifornien, USA
Becton Dickinson Biosciences	Jersey City, New Jersey, USA
Biochrom	Berlin
Bio-Rad Laboratories	Richmond, Kalifornien, USA
Biozym	Hess, Oldendorf
Canberra Packard	Meriden, Connecticut, USA
Cell Concepts	Umkirch
Cetus	Emeryville, Kalifornien, USA
Colonna, Marco	Washington University Medical School, St. Louis
Dako	Glostrup, Dänemark
Dianova	Hamburg
Difco Laboratories	Detroit, Michigan, USA
Dunn Labortechnik	Asbach
Eppendorf	Hamburg
Essex Pharma	München
Falcon	Oxnard, Kalifornien, USA
Falk, Christine S.	Institut für Molekulare Immunologie, GSF München
Feather	Osaka, Japan
Genzentrum	Martinsried
Greiner	Nürtingen
Heraeus	Hanau
Hirschmann	Unterhaching
IKA Labortechnik	Staufen
Invitrogen/ Life Technologies	Karlsruhe
Julabo	Seelbach
Kammerer, Robert	Labor für Tumorimmunologie, Urologische Abteilung Klinikum Großhadern, LMU München

MATERIAL

Kremmer, Elisabeth	Institut für Molekulare Immunologie, GSF München
Leica	Wetzlar
Liebherr	Biberach an der Riss
Menzel-Gläser	Braunschweig
Merck	Darmstadt
Messer Griesheim	Krefeld
Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach
MJ Research	Watertown, Massachusetts, USA
Nalgene	Rochester, New York, USA
NEN	Allston, Massachusetts, USA
Novocastra	Newcastle upon Tyne, USA
Nunc	Naperville, USA
Pan Biotech GmbH	Aidenbach
Pohla, Heike	Labor für Tumorummunologie, Urologische Abteilung Klinikum Großhadern, LMU München
Quiagen	Chatsworth, Kalifornien, USA
R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA
Roche	Mannheim
Sartorius	Göttingen
Schendel, Dolores J.	Institut für Molekulare Immunologie, GSF München
Schleicher und Schüll	Dassel
Search-LC	Heidelberg
Semperit	Wien, Österreich
Serotec	Oxford, UK
Sigma	St. Louis, Missouri, USA
Starlab	Ahrensburg
Suri-Payer, Elisabeth	Institut für Immunologie und Genetik, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
TPP	Trasadingen, Schweiz
Weiß, Elisabeth H.	Institut für Anthropologie und Humangenetik, Ludwig-Maximilians-Universität München
Wilex	München
WTW	Weilheim
Zeiss	Jena

3. Methoden

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Allgemeines

Unter der Immunhistochemie versteht man die Färbung von Gewebeschnitten mithilfe von Antikörpern. Bei den hier verwendeten indirekten immunenzymatischen Färbungen sind die jeweiligen spezifischen Primärantikörper unmarkiert. Die Detektionsantikörper sind mit Enzymen verbunden, die farblose Chromogene in unlöslich gefärbte Endprodukte umwandeln. Im folgenden werden zwei verschiedene Färbemethoden beschrieben, die sich im Ablauf der Färbeprozedur und in ihrer Sensitivität unterscheiden.

Bei jeder Färbung wurden sowohl Isotypkontrollen mitgeführt, als auch Negativkontrollen, bei denen der Primärantikörper durch 10 % AB-Serum ersetzt wurde, um die Spezifität des Sekundärantikörpers zu prüfen.

3.1.2 Schnitte

Sowohl von Nierentumorgewebe (NT) als auch von unverändertem „normalen“ Nierengewebe (NN) wurden am Kryotom Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Dafür wurde die Kammertemperatur auf -22 °C und die Objekttemperatur auf -17 °C eingestellt. Die Schnitte wurden auf speziell beschichtete *SuperFrost® Plus* Objektträger aufgezogen, für zwei Tage luftgetrocknet und am dritten Tag für die Färbungen verwendet. Alle Schnitte wurden unmittelbar vor der Färbung für 10 Min. in eiskaltem Aceton fixiert und luftgetrocknet. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, um das Abfließen der Färbereagenzien von den Schnitten zu vermeiden.

3.1.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden getestet und mit optimaler Verdünnung in 10 % AB-Serum für verschiedene Färbemethoden eingesetzt. Die Antikörper mit der jeweils verwendeten Verdünnung und Färbemethode sind in *Tabelle 2.7* aufgelistet.

Tabelle 2.7 Verdünnungen und Färbemethode der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Nachweis
Primärantikörper		
G250	1:100	Peroxidase
CD3	1:50	APAAP
CD3 ζ	1:500	APAAP
CD4	1:10	APAAP
CD8	1:50	Peroxidase
CD14	1:200	Peroxidase
CD56	1:10	APAAP
CD66b	1:100	Peroxidase
CD103	1:10	APAAP
E-Cadherin	1:10	APAAP
NKp46	1:10	APAAP
Perforin	1:100	APAAP
Isotypkontrollen		
Isotyp IgG1 (MOPC21)	1:100	APPAP/Peroxidase
Isotyp IgG2b	1:50	Peroxidase
Sekundärantikörper		
α Maus-HRP	1:100	Peroxidase
α Ratte-HRP	1:100	Peroxidase
α Maus-IgG	1:20	APAAP
Maus-APAAP	2:25	APAAP

3.1.4 Indirekte Färbung mit Peroxidase

Bei der Methode der indirekten Peroxidase-Färbung werden Sekundärantikörper verwendet, die gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet sind und chemisch mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) verbunden sind. Dieses Enzym oxidiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid unter anderem das Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), das unter Oxidation einen roten Farbniederschlag bildet.

Die fixierten und getrockneten Schnitte wurden für 5 Min. in PBS getaucht und mit 10 % AB-Serum in PBS für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Diese Flüssigkeit wurde anschließend durch den verdünnten Primärantikörper ersetzt, der für 60 Min. bei Raumtemperatur binden konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte einzeln unter fließendem PBS gespült und nochmals gemeinsam in einer Küvette für zweimal 3 Min. gewaschen. Die Inkubation mit verdünntem Sekundärantikörper erfolgte für 70 Min. bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschschrift wurden die Schnitte für 15 Min. bei Raumtemperatur in AEC-Substratlösung gefärbt und anschließend dreimal für 3 Min. in PBS gewaschen. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte für 10 Sek. mit unverdünnter Hämalaunlösung inkubiert, anschließend gründlich mit Leitungswasser gespült, mit Gelatine eingedeckt und im Dunklen aufbewahrt.

3.1.5 Färbung über die APAAP-Methode

Bei einigen Färbungen wurde die etwas sensitivere, aber auch kostspieligere und langwierigere Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode gewählt. Hierbei wird der Primärantikörper über Brückenantikörper mit den Detektionsantikörpern verbunden. Der Primärantikörper stammte jeweils aus der Maus, als Brückenantikörper wurde ein polyklonales Gemisch aus Kaninchen-Immunglobulinen verwendet, die gegen Maus-Antikörper gerichtet sind und so mit einem Fab-Arm an den Primärantikörper binden. Durch die Erkennung verschiedener Epitope auf dem Primärantikörper können mehrere Brückenantikörper binden und so die Färbung multiplizieren. Der Detektionsantikörper ist ein gegen die alkalische Phosphatase (AP) gerichteter Antikörper, dem Enzyme im Überschuss zugegeben sind, so dass an jedem seiner beiden Fab-Fragmente AP-Moleküle gebunden sind (Enzymimmunkomplex). Dieser Antikörper stammt ebenfalls aus der Maus und bindet deshalb an den zweiten Fab-Arm des Brückenantikörpers (*Abb. 2.1*).

Diese Methode ist sensitiver, da zum einen mehrere Detektionsantikörper binden, zum anderen jeweils zwei Enzyme anstatt eines einzigen Moleküls gebunden sind, wie es durch die chemische Bindung eines Enzyms an Antikörper erreicht wird. Die AP hydrolysiert Naphtholphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole bilden mit dem Chromogen Neufuchsin einen unlöslichen hellroten Azofarbstoff. Für die Färbung wurden die fixierten und getrockneten Schnitte in PBS getaucht und 20 Min. mit 10 % AB-Serum inkubiert. Dieses wurde anschließend für 60 Min. durch den verdünnten Primäranantikörper ersetzt. Die Schnitte wurden jeweils einzeln unter fließendem PBS und nochmals gemeinsam für zweimal 3 Min. in Küvetten gewaschen. Die Inkubation des Brückenantikörpers erfolgte ebenfalls für 60 Min. Nachdem erneut Waschschrte durchgeführt wurden, wurde der Detektionsantikörper aufgetragen, der für 30 Min. bei Raumtemperatur binden konnte. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Min. mit der Neufuchsin-Substratlösung inkubiert und mit fließendem destillierten Wasser gespült. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte durch Inkubation mit unverdünnter Hämalaunlösung für 10 Sek. und anschließender Spülung unter Leitungswasser. Die Schnitte wurden mit Gelatine eingedeckt.

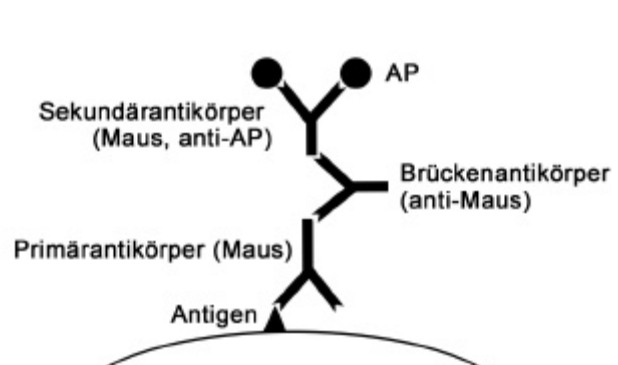


Abbildung 2.1 Prinzip der immunhistochemischen Färbung nach der Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode.

3.2 Allgemeine Methoden der Zellkultur

3.2.1 Allgemeine Bemerkung

Alle Schritte, die das Arbeiten mit vitalen Zellen beinhalteten, wurden an einer Sterilwerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Lösungen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

3.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut freiwilliger gesunder Spender erfolgte aus venösem Vollblut. Um das Gerinnen des Blutes zu vermeiden, wurden 0,1 ml Heparin pro 10 ml Blut zugesetzt. Das Blut wurde unmittelbar nach der Blutabnahme im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und auf 15 ml Ficoll-Lösung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Diese Röhrchen wurden für 25 Min. bei 840 g zentrifugiert, ohne nach Ablauf der Zeit die Bremse zuzuschalten. Dies gewährleistete eine optimale Schichtung der verschiedenen Fraktionen. Die in der Interphase zwischen Ficoll (transparente Schicht) und Blutplasma (oberste Schicht) befindlichen Zellen wurden in ein frisches Röhrchen überführt und zweimal mit dem fünffachen Volumen an PBS gewaschen. Hierfür wurde bei 540 g für 10 Min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment durch Aufschütteln resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in RPMI III aufgenommen und gezählt. Diese Methode der Dichtezentrifugation wurde auch einige Male verwendet, um direkt isolierte TIL von Erythrozyten oder toten Zellen zu separieren.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde eine Zellprobe in jeweils bestimmtem Verhältnis mit Trypanblau verdünnt. Dieser Farbstoff wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, während tote Zellen dunkelblau gefärbt werden. Für einige Versuche wurden nur die Lymphozyten gezählt. Diese lassen sich anhand ihrer Morphologie von größeren Zellen wie beispielsweise Monozyten oder Tumorzellen unterscheiden. Die Zellen wurden in allen vier Großquadranten des Hämazytometers ausgezählt und die Werte gemittelt. Die Zellzahl pro ml Suspension kann mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.2.4 Einfrieren von Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff musste dem Medium ein Gefrierschutzmittel zugesetzt werden, um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, die das Platzen der Zellen verursachen würden. Hierfür wird meist Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, das jedoch auf stoffwechselaktive Zellen toxisch wirkt. Alle Arbeitsschritte wurden deshalb zügig auf Eis durchgeführt.

Die einzufrierenden Zellen wurden sedimentiert und in kaltem FCS resuspendiert. Die Suspension wurde im Verhältnis 1:2 langsam mit kaltem Einfriermedium gemischt und in einem Volumen von jeweils 1 ml auf Einfrierröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden in eine Einfrierbox überführt, die für 24 Stunden bei -80 °C gelagert wurde. Dabei sorgte die durch Isopropanol gekühlte Einfrierbox bei -80 °C für eine schonende Erniedrigung der Temperatur um ca. 1 °C pro Minute. Anschließend wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

3.2.5 Auftauen von Zellen

Die Einfrierröhrchen wurden auf Eis aus dem Stickstofftank ins Labor transportiert und anschließend in einem 37 °C warmen Wasserbad so lange erwärmt, bis die Zellsuspension am Rand des Röhrchens aufgetaut war. Die Suspension wurde in ein mit 2 ml PBS gefülltes 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, in das anschließend weitere 3 ml PBS zugetropft wurden. Das Röhrchen wurde sofort für 5 Min. bei 540 g zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift (8 Min. bei 540 g) wurden die Zellen für ihre weitere Verwendung im jeweiligen Kulturmedium resuspendiert.

3.2.6 Kultivierung von adhärennten Zelllinien

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in dem für den jeweiligen Zelltyp optimalen Medium. Das Mediumvolumen in einer kleinen Kulturflasche (25 cm² Adhärenzfläche) betrug 10 ml, in einer mittleren Kulturflasche (75 cm² Fläche) 15 ml. Transfizierte Zelllinien mit einer Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker wurden in den entsprechenden Selektionsmedien kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt wurde. Bei dichtem Zellrasen wurde das komplette Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS gespült, 10 µl/cm² Zellfläche Trypsin-EDTA (1 x) zugegeben und für 2 Min. bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Kompletmedium aufgenommen und auf zwei neue Kulturflaschen verteilt.

3.2.7 Kultivierung von Leukämiezelllinien

Die Leukämiezelllinien NKL und K562, sowie die aus K562 generierten Transfektanten wurden in liegenden Kulturflaschen mit 25 cm² Bodenfläche in jeweils 13 ml optimalem Medium kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde die Hälfte der Zellsuspension abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

3.2.8 Kultivierung von TIL

TIL wurden in *24-well*-Platten in TIL-Medium unter Zugabe unterschiedlicher Mengen an IL-2 kultiviert. Dabei wurden die Löcher (*wells*) am Rand der Platten mit PBS gefüllt und nur die inneren Löcher für die Kultivierung der Zellen benützt, um ein Austrocknen der Löcher und Kontaminationen zu vermeiden. Da sich die Zellen rasch am Boden der Platte sammelten, konnten Überstände abgenommen oder Medienwechsel durchgeführt werden ohne dabei Zellen zu verlieren. Bei dichtem Rasen wurden die Zellen eines *wells* mit einer Einmal-Pasteurpipette resuspendiert und auf zwei *wells* verteilt („splitten“).

Die Zellen wurden in einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen pro ml und Loch ausgesät. Je nach Wachstum der Zellen wurde alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.9 Simultane Messung mehrerer Zytokine im Zellkulturüberstand

Prinzip

Die simultane Messung mehrerer Zytokine in einem Zellkulturüberstand wurde am BioPlex™-Gerät durchgeführt. Das Prinzip der Quantifizierung ist in *Abbildung 2.2* dargestellt. Bei diesem System werden Antikörper gegen verschiedene Zytokine verwendet, die jeweils an kleine fluoreszierende Kügelchen gebunden sind. Die Kügelchen der verschiedenen Antikörper sind in jeweils unterschiedlichen Verhältnissen mit roten und grünen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und können so von einer Photozelle im Gerät unterschieden werden.

Im Reaktionsansatz bindet das jeweilige Zytokin an die Antikörper auf den Kügelchen. In einem weiteren Schritt wird das gebundene Zytokin an einem anderen Epitop mit einem Biotin-markierten Detektionsantikörper nachgewiesen. Durch die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Avidin an Biotin kann die Menge der gebundenen Zytokine photometrisch quantifiziert werden. Im Reagenziensystem enthaltene Standardkonzentrationen jedes Zytokins ermöglichen die absolute Quantifizierung über Standardkurven.

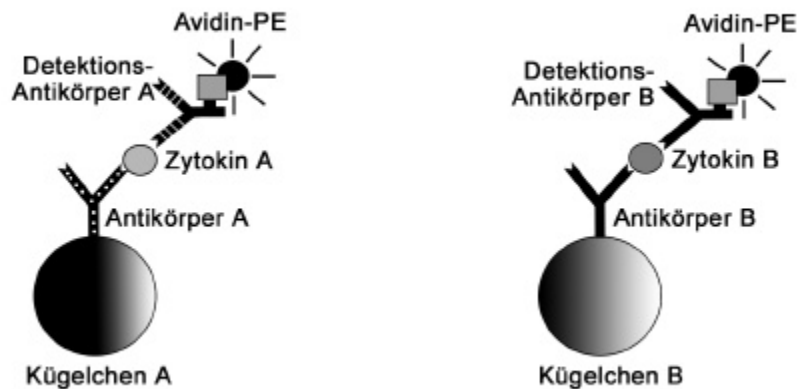


Abbildung 2.2 Prinzip des Bio-Plex™-Zytokin-Assays.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte mittels Reagenziensystemen der Firma Bio-Rad (siehe 2.8.3). Zuerst mussten lyophilisierte Zytokinstandards (je 25 ng) in jeweils 50 µl A. dest. resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert werden. Anschließend wurden die Standards mit Medium (RPMI III) verdünnt, so dass eine Verdünnungsreihe von 16000, 4000, 1000, 250, 62,5, 15,6, 3,9 und 0,9 pg/ml entstand. Dafür wurden je 12,8 µl Standard mit je 1387,2 µl Medium verdünnt (entspricht 16000 pg/ml). Es folgte eine Verdünnungsreihe durch Titration von jeweils 100 µl in 300 µl vorgelegtes Medium. Anschließend wurden die verschiedenen Kügelchen gemischt. Hierfür wurden jeweils 2 µl pro Kügelchen und Probe berechnet. Dieser Ansatz wurde daraufhin so in *Assay Buffer A* verdünnt, dass für jede Probe 50 µl Lösung vorhanden waren. Die benötigten Löcher einer *96-well-Bio-Plex MCV*-Platte wurden mit je 100 µl *Assay Diluent A* gewaschen. Hierbei wurde die Flüssigkeit in der Platte mithilfe eines Vakuum-Absaugegerätes durch die Filter am Plattenboden abgesaugt. Nicht verwendete *wells* wurden auf der Oberseite mit einer mitgelieferten Klebefolie abgeklebt. In jedes benötigte Loch wurden daraufhin 50 µl der gut auf dem Vortexer gemischten Kügelchen gegeben und abgesaugt. Die Kügelchen sind größer als die Poren des Filters, so dass sie in der Platte bleiben. Die Platte wurde zweimal mit 100 µl *Wash Buffer A* gewaschen. Anschließend wurden 50 µl der Standardverdünnungen bzw. der unverdünnten Zellkulturüberstände aufgetragen. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Zellkulturmedien ohne Zellen verwendet sowie 50 µl RPMI III als Negativkontrolle. Die gesamte Platte wurde auf der Oberseite mit Klebefolie bedeckt und mit Aluminiumfolie umwickelt. Sie wurde 60 Min. bei 300 U/Min. bei Raumtemperatur auf einem flachen Schüttler geschwenkt. Anschließend wurden die Platte abgesaugt und dreimal mit *Wash Buffer A* gewaschen. Die verschiedenen Detektionsantikörper wurden

unmittelbar vor Verwendung vorsichtig gemischt und 1:50 in *Ab-Diluent* verdünnt. Für jede Probe wurde ein Volumen von 25 µl berechnet, das in jedes Loch der Platte gegeben wurde. Die Platte wurde wie oben beschrieben zur Inkubation vorbereitet, für 60 Min. geschüttelt und wiederum dreimal gewaschen. Die Streptavidin-PE-Moleküle wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung 1:100 in *AB-Diluent* verdünnt, gut mit dem Vortexer gemischt und in einem Volumen von 50 µl pro Probe auf die Platten gegeben. Die Platten wurden wie beschrieben abgeklebt, unwickelt und für 10 Min. geschüttelt. Anschließend wurde die Platte abgesaugt und dreimal gewaschen. Zuletzt wurden jeweils 125 µl *Assay Buffer A* auf jede Probe gegeben. Die Platte wurde bis zur Messung im Dunklen aufbewahrt. Das Bio-Plex™-Gerät wurde unmittelbar nach der Färbung automatisch mithilfe des *Bio-Plex Calibrite Kit* kalibriert. Dazu wurden die im System enthaltenen Kügelchen wie im Herstellerprotokoll angegeben vorbereitet. Die Lokalisation der Standards auf der zu messenden Platte wurde über die Software eingegeben. Die Messung aller Proben erfolgte automatisiert.

Auswertung

Die einzelnen Standardkurven der jeweiligen Zytokine wurden von der Software automatisch berechnet. Dabei war es jedoch möglich den Bereich der Kurven durch das Streichen einzelner Proben zu verringern, wenn diese bei zu hoher oder zu geringer Konzentration vom Gerät nicht korrekt gemessen werden konnten. Die so generierten Standardkurven wurden zur Berechnung der jeweiligen Zytokinkonzentrationen in den einzelnen Proben verwendet. Dabei wurden nur solche Proben als auswertbar betrachtet, deren Konzentrationen im Bereich der gemessenen und berechneten Standards lag.

3.2.10 Zellseparation über ferromagnetische Antikörper

Für einige Versuche wurden Zellseparationen mithilfe von spezifischen Antikörpern durchgeführt, die chemisch an ferromagnetische (Eisen-) Kügelchen (*beads*) gebunden waren. Die Separation erfolgt über Magnet-Säulchen, an die nur solche Zellen binden, die mit den *beads* markiert sind und nach Entfernung des magnetischen Feldes wieder eluiert werden können. Diese Prozedur wurde am automatisierten Bindungs- und Eluierungssystem *autoMACS™* durchgeführt. Für die Separation wurden die Zellen sedimentiert und mit 80 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 20 µl Antikörper pro 10^7 Zellen für 15 Min. im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde mit dem fünffachen Volumen an MACS-Puffer für 10 Min. bei 300 x g gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellseparation am *autoMACS* erfolgte mit dem Programm „POSSEL“ nach Bedienungsanleitung.

3.3 Gewinnung der Gewebeproben

Die tumortragende Niere wurde unmittelbar nach ihrer Entnahme im Operationsaal in einem sterilen Beutel in das Pathologische Institut des Klinikums Großhadern transportiert. Hier wurde von einem Pathologen ein jeweils etwa 2 cm³ großes Stück aus makroskopisch identifizierbarem Tumorparenchym und möglichst weit entferntem Normalparenchym steril entnommen und auf unterschiedliche 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Ein Teil der Gewebe wurde für immunhistochemische Untersuchungen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff konserviert.

3.4 Isolierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)

3.4.1 Isolierung von TIL durch Kultivierung des Gewebes

Zu Beginn der Arbeit wurden TIL durch die Methode des „Auswanderns“ gewonnen. Hierfür wurden die Tumorgewebeproben in einer Petrischale gut mit PBS gewaschen, um Kontaminationen mit peripheren Lymphozyten zu vermeiden und mit einem Skalpell in Stückchen von etwa 3 mm³ Größe geschnitten. Die Stückchen wurden in die Löcher einer *24-well*-Platte vereinzelt und für 14 Tage in TIL-Medium mit 10 U/ml IL-2 kultiviert. Nach vier Tagen ließ sich ein radiäres Auswandern von Lymphozyten beobachten. Am fünften und zehnten Tag wurde die Hälfte des Mediums gewechselt, am 14. Tag wurden die Zellen mit einer Einmal-Pasteurpipette resuspendiert und geerntet. Dabei blieben die adhärent wachsenden Zellen am Boden der Zellkulturplatte heften. Die geernteten Zellen wurden unmittelbar für weitere Versuche eingesetzt oder bis zu Ihrer Verwendung eingefroren.

3.4.2 Direkte Isolierung von TIL durch Homogenisierung des Gewebes

Um zu untersuchen, ob sich die Eigenschaften der kultivierten TIL von den TIL *in situ* unterscheiden, wurden die Lymphozyten im weiteren Verlauf der Arbeit direkt aus dem Tumorparenchym isoliert. Hierfür wurde das Gewebe ebenfalls in PBS gewaschen und in RPMI III mit einem Skalpell in etwa 1 mm³ große Stückchen geschnitten. Anschließend wurde das Gewebe mit dem Stempel einer 50 ml-Spritze vorsichtig am Schalenboden zerdrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde zweimal über ein Sieb (*Cellstrainer*) filtriert. Die Lymphozyten wurden über die Ficoll-Dichtezentrifugation von Erythrozyten und toten Zellen separiert. Die gewonnenen TIL wurden bis zu Ihrer weiteren Verwendung in mehreren Portionen kryokonserviert.

3.5 Gewinnung von Nierenzellkarzinomzellen

Durch die Kultivierung der Gewebestückchen für die Gewinnung ausgewanderter TIL konnten in einigen Fällen auch adhärent wachsende Nierenzellkarzinomzellen gewonnen werden. An Tag 14 der Gewebekultur blieben nach der Ernte der TIL die adhärent wachsenden Zellen am Boden haften. Um ein besseres Wachstum dieser Zellen zu gewährleisten, wurde das Medium auf Kompletmedium umgestellt, da Tumorzellen in Medium mit FCS meist besser wachsen. Bei konfluentem Zellrasen wurden die adhären Zellen geerntet und in einer kleinen Kulturflasche (25 cm² Adhärenzfläche) vereinigt.

3.6 Chromfreisetzungstest

3.6.1 Markierung der Zielzellen

Für die Untersuchung der zellvermittelten Lyse (*cell mediated lysis*, CML) wurden sogenannte Chromfreisetzungstests durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom markiert, das nach Lyse der Zellen als verbleibende Radioaktivität im Überstand nachgewiesen und quantifiziert werden konnte.

Etwa 1×10^6 Zellen wurden mit 30–50 µl radioaktivem Natriumchromat (ca. 85 µCi, in RPMI III verdünnt) für 60 Min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde das radioaktive Nuklid von den Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit CML-Medium gewaschen um überschüssiges ⁵¹Cr zu entfernen.

3.6.2 Direkte zellvermittelte Lyse (CML)

Bei der zellvermittelten Lyse wurden die markierten Zellen direkt als Zielzellen für die Lymphozyten verwendet. Hierfür wurden die Effektorzellen auf 96-well-Rundboden-Platten in abnehmenden Zellzahlen in einem Volumen von 50 µl titriert. Die markierten Zielzellen wurden in konstanter Zahl von 2000 Zellen pro 50 µl auf die Lymphozyten verteilt, so dass sich abnehmende Effektor-zu-Zielzellverhältnisse ergaben. Für jede Probe ergab sich ein Gesamtvolumen von 100 µl. Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde ein Volumen von 50 µl pro Ansatz auf die Messplatten verteilt. Von jedem Ansatz wurden zur Überprüfung der Messwerte Duplikate angefertigt. Für die Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung wurden die Zielzellen nur mit Medium inkubiert, für die Bestimmung der maximalen Chromfreisetzung wurden 50 µl der Zielzellen direkt auf die Szintillationsmessplatten (*Luma-Plates*) gegeben. Dieser Wert wurde anschließend durch den Faktor 2 geteilt, um den Verdünnungsfaktor der Proben zu berücksichtigen.

3.6.3 Redirigierte Lyse

Bei der sogenannten redirigierten Lyse (*redirected lysis*) wurden die markierten Zielzellen, die selbst nicht von den zytotoxischen Zellen erkannt werden dürfen, mit Antikörpern beladen, welche bestimmte Rezeptoren auf den Effektorzellen stimulieren oder blockieren. Für diesen Ansatz hat sich die Verwendung der murinen Mastrozytomzelllinie P815 etabliert, da sie eine große Dichte an Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aufweist, die mit murinen Antikörpern gegen humane Antigene beladen werden können. Dazu wurden 25 µl Antikörper auf einer 96-well-Platte in absteigenden Konzentrationen titriert und für 30 Min. bei Raumtemperatur mit jeweils 1000 markierten P815-Zellen (in 50 µl) inkubiert, um das Binden der Antikörper zu ermöglichen. Im Anschluss wurden jeweils 25 µl Lymphozyten in konstanter Zellzahl zu den Ansätzen gegeben, so dass sich ebenfalls ein Gesamtvolumen von 100 µl pro Ansatz ergab, von dem nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit jeweils 50 µl auf die Messplatten verteilt wurden. Bei der *redirected lysis* wurden demnach unterschiedliche Antikörperkonzentrationen bei konstanten Effektor-zu-Zielzellverhältnissen verglichen. Zur Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung wurden die Zielzellen nur mit Medium inkubiert, zur Bestimmung der maximalen Lyse wurden 50 µl der Zielzellen direkt auf die Messplatten gegeben; der Wert wurde anschließend durch den Faktor 2 geteilt. Von jedem Ansatz wurden zur Überprüfung der Messwerte Duplikate angefertigt.

3.6.4 Messung und Auswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 50 µl der Überstände auf die Messplatten gegeben, möglichst ohne die am Boden sitzenden Zellen aufzusaugen. Die Platte wurde am *TOPCount*-Zählgerät gemessen, wobei die radioaktive Strahlung durch die Beschichtung der *Luma-Plate* in Lichtquanten umgewandelt wurde. Die Zähldauer jeder Probe dauerte 1 Min., so dass die Angabe der Messwerte in Lichtemissionen pro Minute (*counts per minute*= cpm) angegeben wurde.

Der Prozentsatz spezifischer Lyse kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}:2) - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}$$

Der Wert für die maximale Freisetzung musste halbiert werden, da die Zielzellen direkt auf die Messplatten gegeben und nicht wie in den anderen Ansätzen mit Effektorzellen oder Medium verdünnt worden waren.

3.7 Durchflusszytometrie

3.7.1 Allgemeines

Mithilfe der Durchflusszytometrie am *fluorescence activated cell scanner* (FACS) lässt sich die Expression bestimmter Moleküle über Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper analysieren. Hierfür wurden Antikörper verwendet, die gegen bestimmte Proteine auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren gerichtet waren. Der *FACSCalibur* ist mit zwei Lasern (488 nm Argon und 633 nm He/Ne) ausgestattet, die es erlauben verschiedene Farbstoffe simultan anzuregen. Diese emittieren daraufhin unterschiedliches Licht bestimmter Wellenlängen, das von Photozellen im Gerät qualitativ und quantitativ gemessen werden kann, so dass sowohl die Art der Markierung (die Expression bestimmter Moleküle) als auch die Intensität der Markierung (die Expressionsstärke) auf jeder einzelnen Zelle bestimmt werden kann. Zudem wird von jeder Zelle das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, *FSC*), ein Maß für die Größe der Zelle, und das Seitenstreulicht (*side scatter*, *SSC*), ein Maß für die Granularität der Zelle, bestimmt. So ist es möglich die in einer Probe enthaltenen Zellen nach Größe und Granularität einzuteilen und simultan auf die Expression verschiedener Moleküle zu prüfen.

In dieser Arbeit wurden Antikörper verwendet, die mit den Farbstoffen Fluorescein-Isothiocyant (FITC, FL-1, Emissionsmaximum bei 530 nm), Phycoerythrin (PE, FL-2, Emissionsmaximum bei 585 nm), oder Allophycocyanin (APC, FL-4, Emissionsmaximum bei 767 nm) markiert waren. Da tote Zellen bei vielen Wellenlängen eine gewisse Autofluoreszenz aufweisen, war es in einigen Fällen notwendig, diese unspezifisch positiven Zellen von vitalen Zellen zu unterscheiden. Hierfür wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PI) inkubiert, einem Farbstoff, der in die DNS toter Zellen interkalieren kann und bei Anregung Licht im orange-roten Wellenlängenbereich (FL-3, Messung bei 670 nm) emittiert. PI-positive, also tote Zellen, konnten so aus der Analyse ausgeschlossen werden.

3.7.2 Direkte Färbung der Zelloberfläche

Für die Markierung der Zelloberfläche wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen /ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 100 μ l der Zellen mit jeweils 2 μ l von bis zu drei verschiedenen direkt markierten Antikörpern (*Tabelle 2.4*) für 30-60 Min. im Dunklen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 5 Min. bei 540 g mit FACS-Puffer gewaschen. Bei einer geringen Anzahl von toten Zellen wurden die Zellen in 100 μ l *CellFix* fixiert und innerhalb von zwei Tagen

gemessen. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden, wurden die Ansätze gekühlt und im Dunklen aufbewahrt. Bei einem großen Anteil an toten Zellen wurden die Zellen nach dem Waschen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 1 µl Propidiumjodid (0,2 %) versetzt. Diese Proben wurden direkt im Anschluss an die Färbung gemessen. Bei jeder Messung wurden für die verschiedenen Zellen jeweils Negativkontrollen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden nicht spezifisch bindende Antikörper für die in der Messung verwendeten Isotypen (Isotypkontrollen) mitgeführt.

3.7.3 Indirekte Färbung der MHC-Klasse-I-Expression

Die MHC-Klasse-I-Expression der in der CML verwendeten Zielzellen wurde durch eine indirekte Färbung überprüft. Hierfür wurden die Zellen wie unter 3.7.2 beschrieben mit dem ersten Antikörper (*Tabelle 2.4*) inkubiert, der in diesem Fall allerdings nicht markiert war. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten PE-markierten Antikörper (α Maus-PE) auf die gleiche Weise inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in *CellFix* aufgenommen. Als Isotypkontrolle diente ein Ansatz mit einem nicht bindenden und ebenfalls unmarkierten ersten Antikörper.

3.7.4 Intrazelluläre Färbung

Neben der Oberflächenfärbung einer Zelle wurden teilweise auch intrazelluläre Proteine markiert. Hierfür wurde zuerst eine direkte Oberflächenfärbung (3.7.2) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Min. bei 4 °C mit 500 µl *CellFix* fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch einen Waschschriff mit 500 µl 0,1 % Saponin. Für die anschließende Inkubation mit den direkt markierten intrazellulären Antikörpern gegen Perforin und die CD3 ζ -Kette (*Tabelle 2.4*) wurden die Zellen in 100 µl 0,025 % Saponin aufgenommen und mit 2 µl des jeweiligen Antikörpers oder der passenden Isotypkontrolle (*Tabelle 2.4*) für 30-60 Min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 0,1 % Saponin gewaschen, in 100 µl PBS aufgenommen und innerhalb von zwei Tagen gemessen.

3.8 Methoden der Molekularbiologie

3.8.1 RNS-Isolierung aus Zellen

Die Isolierung von RNS aus vitalen Zellen wurde mithilfe des *RNAqueous-4PCR* Reagenziensystems durchgeführt. Dabei wurden pro Ansatz $0,5 \times 10^6$ Zellen mit 300 μl eines Guanidinthiocyanat-haltigen Puffers behandelt, der die Zellen aufschließt und Ribonukleasen inhibiert [172]. Dieses Lysat wurde bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bei der weiteren Aufarbeitung entsprechend des Herstellerprotokolls wurde die RNS über Quarz-Säulchen gereinigt, die spezifisch die proteinkodierende *messenger* RNS (mRNS) binden. Anschließend wurde die DNS über eine im System enthaltene DNase 1 verdaut, die in einem weiteren Schritt anhand eines beigefügten Puffers inaktiviert wurde. Das Volumen der Proben betrug nach allen Schritten 55 μl . Unmittelbar nach dieser Isolierung wurde die RNS bereits in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben, um eine Degradierung der RNS bei längerer Lagerung zu vermeiden.

3.8.2 Reverse Transkription und Aufreinigung der cDNS

Die isolierte RNS wurde durch eine reverse Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Da die mRNS als Träger der Proteininformation spezifisch umgeschrieben werden sollte, wurden oligo-dT-Sequenzen als Oligonukleotide verwendet. Diese binden an die Poly(A)-Schwänze der mRNS und dienen als Primer für die reverse Transkriptase.

10 μl der isolierten RNS wurden mit 0,5 μg oligo-dT-Primern und 1 mM dNTP in einem 12 μl -Ansatz für 10 Min. bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, um die Tertiärstruktur der RNS zu zerstören. Direkt im Anschluss wurden die Proben auf Eis gekühlt und mit einem Reaktionsgemisch versetzt, das die weiteren benötigten Reagenzien enthielt. Dieses bestand aus 1 \times *1st strand buffer*, 10 mM DTT, 1 U Ribonukleaseinhibitor *Superscript In* und 200 U reverse Transkriptase *Superscript II* in einem Endvolumen von 8 μl . Der komplette 20 μl -Ansatz wurde in einem Thermozykler für 70 Min. bei $42\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, bei dem die mRNS in cDNS umgeschrieben wurde. In einem weiteren Inkubationsschritt von 5 Min. bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ wurde das Enzym inaktiviert. Um die anschließende Amplifikation der cDNS zu optimieren, wurden die Proben mithilfe des *Quiaquick Purification*-Reagenziensystems aufgereinigt. Dabei wurden kurze Oligonukleotide sowie Salze und Enzyme aus dem Ansatz entfernt. Das Prinzip des Systems beruht auf einer Bindung der cDNS an bestimmte Quarz-beschichtete Säulchen, von denen die gereinigte cDNS am Ende eluiert werden kann. Die Reinigung wurde wie im Herstellerprotokoll angegeben durchgeführt. Die cDNS wurde mit einem Volumen von 30 μl Puffer von den Säulchen eluiert.

3.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden bestimmte Sequenzen der cDNS spezifisch amplifiziert, um zu untersuchen, ob diese Sequenzen in der Probe enthalten waren. Dies wurde mit spezifischen Primern für die Sequenzen der Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit Primern für die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt, ein Protein, das von jeder Zelle exprimiert wird und deshalb auch als eines der Haushaltsgene (*housekeeping genes*) bezeichnet wird.

Ein Reaktionsansatz enthielt die Endkonzentrationen der folgenden Reagenzien:

- 2 µl cDNS
- 1 x PCR-Puffer
- 0,25 mM dNTP
- 2,5 mM MgCl₂
- 5 µM Primer (*sense*)
- 5 µM Primer (*antisense*)
- 0,5 U Taq-Polymerase
- H₂O ad 20 µl

Die Amplifikation im Thermozykler erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Initiale Denaturierung	5 Min. bei 95 °C,
Amplifikation (30 Zyklen)	1 Min. bei 95 °C und
	0,5 Min. bei 62 °C (DAP10,DAP12) bzw.
	0,5 Min. bei 55 °C (GAPDH) und
	1 Min. 72 °C
Endpolymerisation	7 Min. bei 72 °C

Die Amplifikatlängen betragen: (Sequenzen der Primer siehe *Tabelle 2.6*)

- DAP10: 285 bp
- DAP12: 353 bp
- GAPDH: 396 bp

Die Proben wurden auf einem Agarosegel auf die Anwesenheit der spezifischen Fragmente überprüft. Zu diesem Zweck wurden jeweils 8 µl Probe sowie ein Fragmentlängenstandard auf das Gel aufgetragen (siehe unten).

3.8.4 Quantitative *real-time* PCR mithilfe des LightCycler™-Gerätes

Prinzip

Mithilfe des LightCycler™-Gerätes können bestimmte Nukleotid-Sequenzen in einer Probe quantitativ bestimmt werden. Die DNS wird dabei wie bei einer „herkömmlichen“ PCR amplifiziert. Zusätzlich ist in jeder Probe ein bestimmter Fluoreszenzfarbstoff enthalten. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNS und emittiert nur in diesem gebundenen Zustand und nach spezifischer Anregung Licht einer definierten Wellenlänge. Nach jedem Amplifikationsschritt wird die Intensität des emittierten Lichtes von einer Photozelle im Gerät gemessen, wobei die Intensität von der Menge des gebundenen Farbstoffes, also der Menge doppelsträngiger, d.h. amplifizierter DNS abhängt. Sind somit sehr viele Ausgangskopien einer Sequenz in der Probe enthalten, steigt die Anzahl der markierten Kopien und somit die Fluoreszenzintensität schneller an, als bei einer sehr geringen Anzahl an Ausgangskopien.

Die Spezifität der Sequenzen wird über eine Analyse der Schmelzkurven überprüft. Die in einer Probe enthaltenen Sequenzen entsprechen nur dann den Ausgangssequenzen, wenn sie bei einem bestimmbar maximalen Temperaturwert vollständig denaturiert vorliegen und somit keine Fluoreszenz mehr gemessen werden kann.

Durchführung

Die quantitative PCR wurde mit dem Enzym- und Farbstoffsystem *FastStart DNA Master SYBR® Green 1* durchgeführt. Dabei wird ein Reaktionsgemisch (10 x) aus Puffer, Farbstoff, Nukleotiden, MgCl₂ (10 mM) und Polymerase hergestellt. Die genaue Zusammensetzung dieses Reaktionsgemischs (RM) wurde vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Es wurde mit den spezifischen Primern und der Probe jeweils in einer speziell für den *LightCycler™* vorgesehenen Kapillare nach folgendem Schema gemischt:

Ansatz	RM	Primer		MgCl ₂	cDNS	H ₂ O
CPB	1 x	2 µl		-	1 µl	ad 20 µl
CD2	1 x	2 µl		-	1 µl	ad 20 µl
IL-10	1 x	2 µl		-	1 µl	ad 20 µl
IFN-γ	1 x	2 µl		-	1 µl	ad 20 µl
Foxp3 (100 µM)	1 x	<i>sense</i>	1 µl	2,4 µl	1 µl	ad 20 µl
		<i>asense</i>	1 µl			

METHODEN

Zur Optimierung der Amplifikation der Foxp3-Sequenzen wurde der Reaktion zusätzliches MgCl₂ (25 mM) zugegeben. Die Sequenzen und Konzentrationen der kommerziell erworbenen Primer für Cyclophilin B (CPB), CD2, IL-10 und IFN- γ waren nicht bekannt.

Die Kapillaren wurden mit beigefügten Deckeln verschlossen und für 30 Sek. bei 600 g in speziellen Adaptern zentrifugiert, um ihren Inhalt zu mischen. Während aller Arbeitsschritte wurden die Kapillaren in den Zentrifugenadaptern aufbewahrt, die in einen Kühlblock gesteckt wurden, um das Enzym zu schonen und das Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden.

Die Amplifikation der Sequenzen erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Initiale Denaturierung:

Programmtyp:	<i>regular</i>
Zyklen:	1
Zieltemperatur:	95 °C
Inkubationszeit:	10 Min.
Temperaturanstieg (°C / Sek.):	20
Fluoreszenzmessung:	keine

Amplifikation:

Programmtyp:	<i>quantification</i>		
Zyklen:	45		
Zieltemperaturen:	95 °C	60 °C	72 °C
Inkubationszeiten:	15 Sek.	10 Sek.	10 Sek.
Temperaturanstiege (°C / Sek.):	20	20	20
Fluoreszenzmessung:	keine	keine	am Ende

Schmelzkurvenanalyse:

Programmtyp:	<i>melting curve</i>		
Zyklen:	1		
Zieltemperaturen:	95 °C	58 °C	95 °C
Inkubationszeiten:	keine	10 Sek.	keine
Temperaturanstiege (°C / Sek.):	20	20	0,1
Fluoreszenzmessung:	keine	keine	kontinuierlich

Kühlung des Gerätes:

Programmtyp:	<i>regular</i>
Zyklen:	1
Zieltemperatur:	40 °C
Inkubationszeit:	30 Sek.
Temperaturanstieg (°C / Sek.):	20
Fluoreszenzmessung:	keine

Auswertung

Die Proben wurden mit der *LightCycler™ Data Analysis Software* ausgewertet. Dabei wurde für jede Probe ein Kreuzungspunkt (*crossing point*) definiert, der einen bestimmten PCR-Zyklus markiert. Eine Differenz von n Zyklen zwischen zwei Kreuzungspunkten bedeutet dann einen 2^n -fachen Unterschied zwischen beiden Proben, da sich die Amplifikate in jedem Zyklus verdoppeln. Die Kreuzungspunkte wurden über den *Second Derivative Maximum*-Algorithmus automatisch von der Software errechnet. Dabei wird der Kreuzungspunkt als erster Wendepunkt der Fluoreszenzkurve definiert (entspricht bei Kurvendiskussionen dem ersten Maximum der zweiten Ableitung). Bei einer höheren Anzahl von Ausgangskopien wird dieser Punkt schneller erreicht, als bei einer sehr niedrigen Kopienzahl innerhalb einer Probe. Ein höherer Kreuzungspunkt bedeutet deshalb eine geringere Expression des untersuchten Proteins. Über diesen Punkt konnten die Proben relativ zueinander verglichen werden. In *Abbildung 2.3* ist dieses Prinzip der Auswertung anhand eines Beispiels dargestellt.

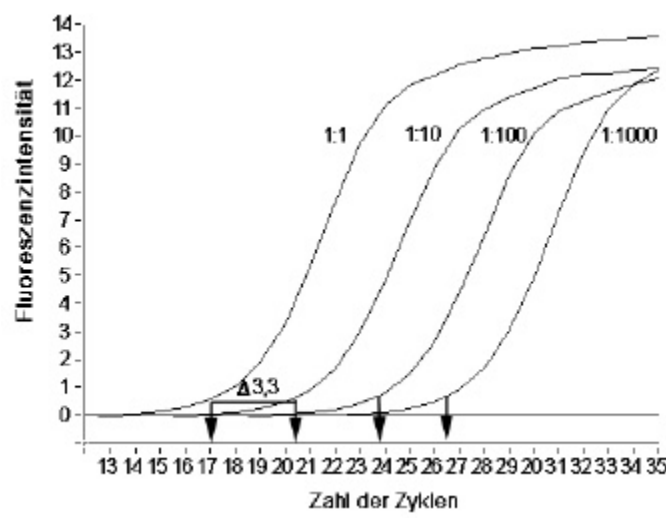


Abbildung 2.3 Auswertung über den *Second Derivative Maximum*-Algorithmus. Markiert sind die berechneten Kreuzungspunkte am ersten Umkehrpunkt. Sie lagen bei Zyklus 17, 20,3, 26,7 bzw. 26,5 der verschieden stark verdünnten Proben. Daraus ergab sich die Differenz Δ von 3,3 Zyklen zwischen der Probe 1:1 und 1:10. Das entspricht einem 9,8-fachen ($2^{3,3}$) Unterschied zwischen beiden Proben.

Diese Analysemethode wurde zur Auswertung der Ergebnisse gewählt, da sie völlig automatisch abläuft und von mathematischen Kriterien abhängt, die nicht durch willkürliche Einstellungen verändert werden können.

Die Expression des Haushaltsgens CPB diene bei allen Analysen als relativer Vergleich zwischen einzelnen Proben, da angenommen wird, dass dieses Gen von jeder Zelle unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus in gleicher Menge exprimiert wird. Die Anzahl von CPB-Fragmenten zwischen verschiedenen Proben kann daher als relativer Vergleichswert für die Anzahl der Zellen zwischen Proben angesehen werden. Zusätzlich wurde die Expressionsdifferenz dieses Gens mit derjenigen des Oberflächenmoleküls CD2 (*lymphocyte function-associated antigen-2*, LFA-2) verglichen. CD2 wird von T- und NK-Zellen exprimiert. Die Expression von CD2 im Vergleich zur Expression von CPB gibt deshalb einen Aufschluss über den Anteil an T/NK-Zellen zu anderen Zellpopulationen in verschiedenen Proben. Die Differenz Δ zwischen den Kreuzungspunkten zweier Proben gibt demnach einen Aufschluss über deren Unterschied in der Expression der jeweiligen Gene.

3.8.5 Gelelektrophorese

Die Nukleinsäuren wurden nach der PCR über ein 2 % Agarosegel aufgetrennt. Hierfür wurde die Agarose in 1 x TAE in einem Mikrowellen-Gerät aufgeköcht und auf etwa 50 °C abgekühlt. Anschließend wurden 2 μ l 1 % Ethidiumbromid auf 100 ml Volumen zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngigen Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Bestrahlung sichtbares Licht. Das Gel wurde noch warm in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde der Laufpuffer in die Kammer gegossen. Jeweils 8 μ l Probe wurden mit Auftragspuffer versetzt (Endkonzentration 1 x) und in die Geltaschen aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt. Zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde bei jedem Lauf ein Standard mit definierten Fragmentlängen mitgeführt. Die negativ geladenen DNS-Stränge laufen in Richtung Anode. Nach einer ausreichenden Auftrennung der Proben wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Digitalkamera aufgenommen.

4. Ergebnisse

Für die Charakterisierung der infiltrierenden Lymphozyten wurde zunächst mittels immunhistochemischer Färbungen die *in situ* vorliegende Situation beschrieben. Weiterhin wurden die Lymphozyten aus dem Tumor isoliert um zusätzlich phänotypische und funktionelle Eigenschaften beschreiben zu können. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Isolierungsmethoden miteinander verglichen.

4.1 Lymphozyteninfiltrat *in situ*: Immunhistochemie

Um die immunhistochemischen Färbungen beurteilen zu können, mussten nicht nur Tumor- und Normalparenchym unterschieden, sondern auch Gewebsstrukturen wie Blutgefäße, Tubuli und Stroma voneinander abgegrenzt werden können. Dies wurde durch eine Kernfärbung mit Hämatoxylin erreicht, die im Anschluss an jede Immunfärbung durchgeführt wurde. Die Kernfärbung beruht auf einer unterschiedlichen Ladung von Kern und Zytoplasma bei einem pH-Wert von 5,5, bei dem nur der Kern negativ geladen ist und deshalb mit dem basischen Farbstoff Hämatoxylin (Hämalaun) gefärbt werden kann.

Im Normalparenchym einer tumortragenden Niere waren sowohl distales und proximales Tubulusepithel als auch einige Glomeruli erkennbar (*Abb. 4.1a*). Aufgrund dieser Strukturen musste das Schnittmaterial aus der Nierenrinde stammen, da nur dort Glomeruli zu finden sind. Im Gegensatz zum Normalparenchym waren in Tumorgewebe (*Abb. 4.1b*) keine solchen Strukturen mehr vorhanden.

4.1.1 Tumorspezifische Färbungen durch den G250-Antikörper

Der monoklonale Antikörper G250 eignete sich zur selektiven Färbung des Tumorgewebes. Es ist beschrieben, dass histologisch unauffälliges Nierenparenchym nicht mit G250 markiert werden kann, während mehr als 90 % der klarzelligen Primärtumoren und somit etwa 75 % aller Nierenzellkarzinome das vom Antikörper erkannte Antigen auf der Mehrzahl der Tumorzellen exprimieren [173,174]. Vor kurzem konnte seine Identität mit dem membranständigen Protein MN/CAIX gezeigt werden, das seit längerem als Tumor-assoziiertes Antigen des Gebärmutterhalskarzinoms bekannt ist [173]. Es handelt sich um einen Komplex aus Carboanhydrase IX (CAIX)-Molekülen, die ansonsten nur auf Zellen der Magenschleimhaut und der Gallenwege exprimiert werden und bei Tumorpatienten in Serum und Urin nachgewiesen werden können. Die Expression des Komplexes auf Zellen des Nierenzellkarzinoms wird durch eine Mutation des Von-Hippel-Lindau-Gens (*VHL*) induziert, welche unter anderem auch zur Entstehung des RCC beiträgt [175]. Der G250-Antikörper, der ein Antigen dieses Proteins erkennt, wurde bereits in verschiedenen immuntherapeutischen Studien an Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom eingesetzt [14].

In *Abbildung 4.1a und b* sind Negativkontrollen mit dem IgG1-Antikörper MOPC21 (Isotypkontrolle) von histologisch unauffälligem Nierenparenchym („Normalniere“, NN) und pathologisch klassifiziertem klarzelligem Nierentumor (NT) gezeigt. Die Färbung mit dem Antikörper G250 ist beispielhaft an Gewebe der Patienten 2934 und 2936 gezeigt. Während das Normalparenchym der tumortragenden Niere jeweils ungefärbt blieb (*Abb. 4.1c und e*), waren die Primärtumoren der Patienten in unterschiedlichem Maß positiv (*Abb. 4.1d und f*) und ließen sich somit eindeutig als Tumorgewebe klassifizieren. Infiltrierendes Tumorstroma blieb ebenfalls ungefärbt. Das Ausmaß und die Intensität der Färbung unterschied sich sowohl bei Schnitten unterschiedlicher Herkunft innerhalb eines Tumorgewebes als auch zwischen Geweben verschiedener Patienten. Diese Variabilität in der Expression des Antigens ist bereits von Oosterwijk *et al.* beschrieben worden [174]. Die erhaltenen Färbungen entsprachen somit der beschriebenen Expressionsspezifität des G250-Antikörpers. Insgesamt wurden Gewebeschnitte von 17 verschiedenen Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom vom klarzelligen Typ untersucht. Von ihnen zeigte nur eine Tumorgewebeprobe (NT-2818) keine positive Färbung mit dem G250-Antikörper obwohl es sich nach weiteren histologischen Kriterien auch bei dieser Gewebeprobe um Tumorgewebe handeln musste.

ERGEBNISSE

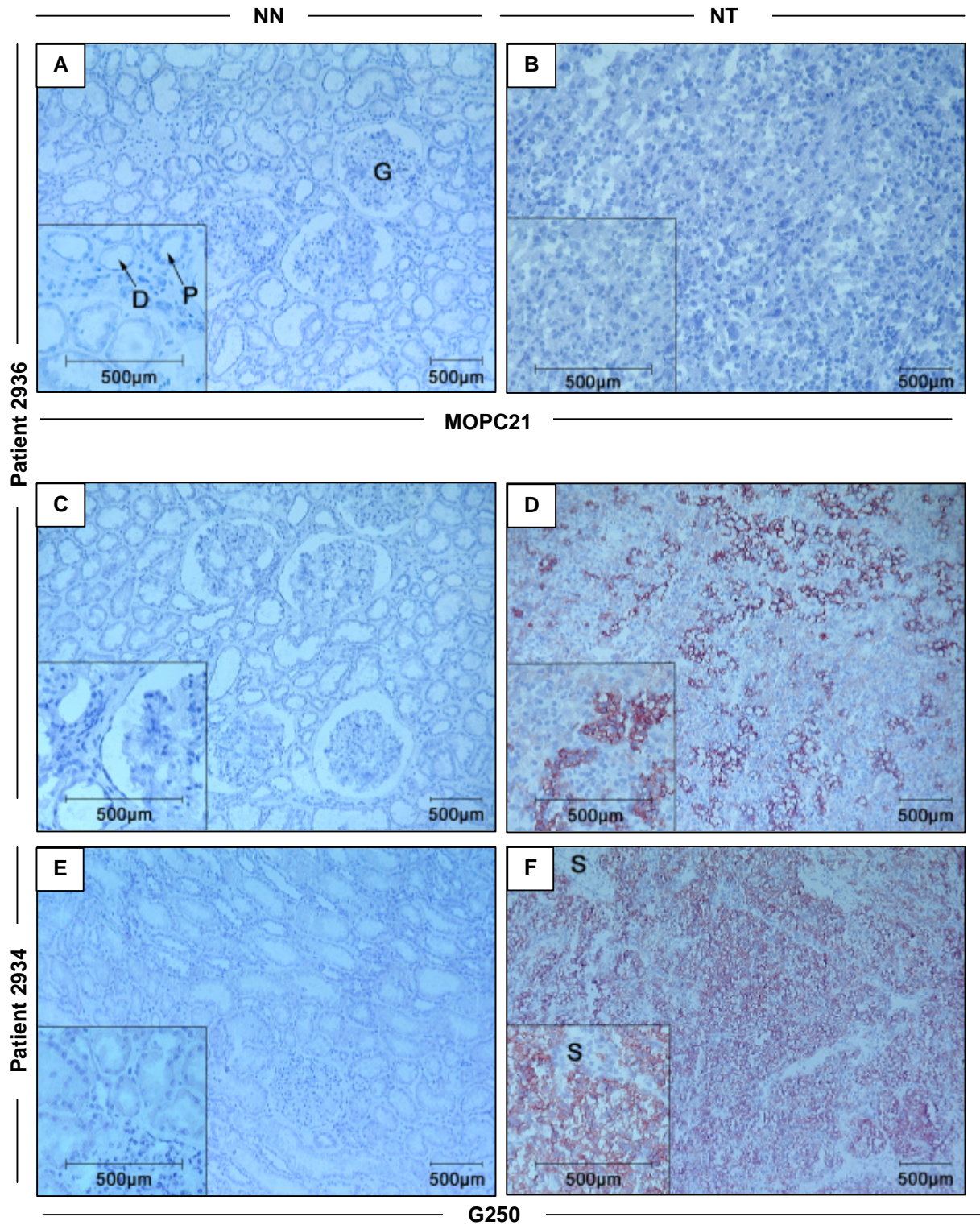


Abbildung 4.1 Färbung des RCC-assoziierten MN/CAIX-Antigens mit dem G250-Antikörper auf Gewebe von Nierentumor (NT) und Normalniere (NN). Peroxidase-Färbung mit dem IgG1-Antikörper MOPC21 (a,b) und dem G250-Antikörper (c-f) auf NN-2936 (a,c), NT-2936 (b,d), NN-2934 (e) und NT-2934 (f). Mikroskopische Vergrößerung x 10 bzw. x 20 (Fenster). G=Glomerulus, D=distaler Tubulus, P=proximaler Tubulus, S=Stroma.

4.1.2 Infiltrierende Leukozytenpopulationen

4.1.2.1 T-Zellen

Mittels immunhistochemischer Färbungen ließen sich unterschiedliche infiltrierende Leukozytenpopulationen charakterisieren. Als Beispiel sind in *Abbildung 4.2* Färbungen mit Antikörpern gegen CD3e (im folgenden als CD3 bezeichnet), CD4 und CD8 in Normalgewebe und zugehörigem Tumorgewebe eines Patienten (2936) und in Tumorgewebe eines weiteren Patienten (174) gezeigt. Wie in der Übersichtsansicht bei geringerer Vergrößerung zu erkennen ist, war im Normalgewebe ein relativ kleines CD3⁺ T-Zellinfiltrat zu finden (*Abb. 4.2a*). Das Tumorgewebe war dagegen wie bei Patient 2936 massiv (*Abb. 4.2b*) oder wie bei Patient 174 weniger stark (*Abb. 4.2c*) von T-Zellen infiltriert. Bei stärkeren Vergrößerungen lässt sich die Färbung dieses membranständigen Antigens gut erkennen, die Zellkerne (blau) blieben ungefärbt (*Abb. 4.2d-f*). Um die Lymphozyten in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zu unterscheiden wurden weitere Färbungen an Serienschnitten durchgeführt. Da die Schnitte eine Dicke von 5 µm aufwiesen und die Durchschnittsgröße eines Lymphozyten nur etwa 8-10 µm beträgt, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass immer dieselben Lymphozyten im nachfolgenden Schnitt getroffen wurden. Ein größeres Infiltrat konnte allerdings in den meisten Fällen über mehr als zehn Schnitte beobachtet werden. Die Zahl positiver Zelltypen in einem Schnitt blieb über einen Bereich von mehreren Schnitten etwa gleich (nicht gezeigt).

Im Normalparenchym des Patienten 2936 fanden sich etwa gleich viele CD4⁺ wie CD8⁺ Zellen (*Abb. 4.2g und k*). In Tumorgewebeproben konnten dagegen immer deutlich mehr CD8⁺ als CD4⁺ Zellen beobachtet werden. Sie verteilten sich wie bei Patient 2936 etwa homogen oder traten wie bei Patient 174 gehäuft auf (*Abb. 4.2h-i und l-m*). Die CD4⁺ Zellen zeigten zum Teil eine unterschiedliche Morphologie. In *Abbildung 4.2h* ist die digital stark vergrößerte Abbildung eines Lymphozyten gezeigt (linkes Fenster). Diese sind immer durch ein sehr kleines Verhältnis zwischen der Menge an Zytoplasma und Kern charakterisiert. Einige positive Zellen wiesen einen deutlich größeren Anteil an Zytoplasma auf (rechts). Hierbei musste es sich um Monozyten bzw. Makrophagen handeln, die ebenfalls CD4⁺ sind und diese Morphologie zeigen. Anhand der Färbung und Morphologie konnten CD4⁺ T-Zellen somit eindeutig identifiziert werden. CD8⁺ Lymphozyten konnten dagegen nicht als T-Zellen klassifiziert werden, da auch NK-Zellen das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen und hier morphologisch nicht von T-Zellen unterschieden werden können. Die immunhistochemischen Färbungen ließen somit keine eindeutige Aussage über das Verhältnis zwischen den beiden T-Zell-Subpopulationen zu.

ERGEBNISSE

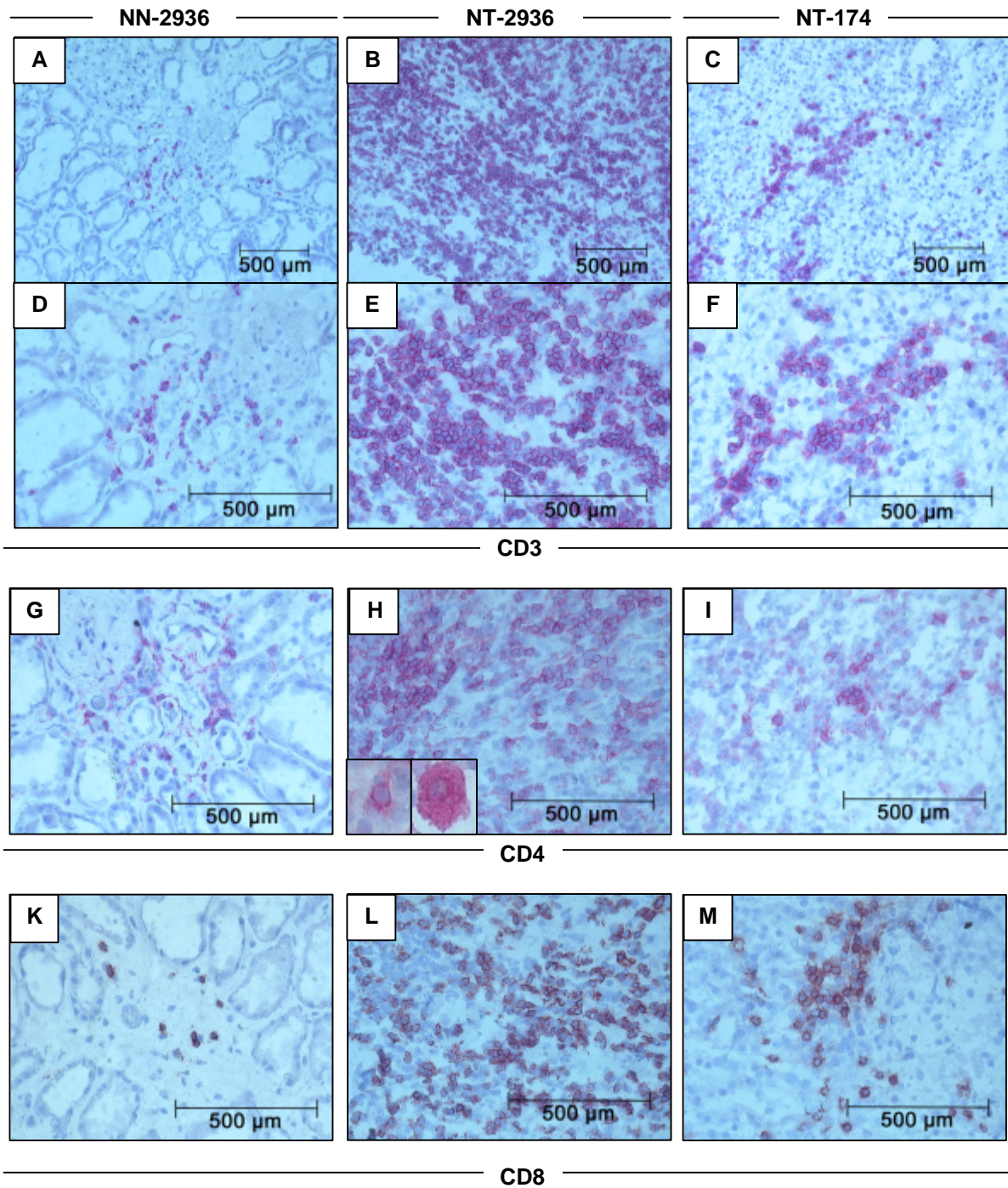


Abbildung 4.2 Färbung von T-Zellen in Nierentumor (NT) und Normalniere (NN). Färbung mit Antikörpern gegen CD3 (a-f), CD4 (g-i) und CD8 (k-m) auf den Geweben NN-2936 (a,d,g,k), NT-2936 (b,e,h,l) und NT-174 (c,f,i,m). Mikroskopische Vergrößerungen x 20 (a-c), bzw. x 40 (d-m). Färbungen von CD3 und CD4 nach der APAAP-Methode, von CD8 nach der Peroxidase-Methode immunhistochemischer Färbungen.

4.1.2.2 NK-Zellen

Die spezifische Färbung von NK-Zellen im Gewebe konnte bisher nicht über eine einfache (einfarbige) immunhistochemische Färbung erreicht werden. Die NK-Zellen werden „klassisch“ als CD3⁻CD56⁺ Zellen definiert. Das CD56-Molekül eignet sich allerdings nicht für eine spezifische Färbung der NK-Zellen, da es auch CD56⁺ T-Zellen gibt, die zudem innerhalb der RCC-TIL zu finden sind [20,31]. Weitere Moleküle, die von NK-Zellen exprimiert werden und bisher in der Immunhistochemie Verwendung fanden, werden ebenfalls nicht ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert. Oftmals konnte die Anzahl der NK-Zellen im Gewebe deshalb nur über einen Vergleich zwischen CD56⁺ und CD3⁺ Zellen geschätzt werden. *Abbildung 4.3* zeigt Färbungen von CD3 und CD56 beispielhaft an Serienschritten von Tumorgeweben der Patienten 174 und 2804. In beiden Fällen waren einige infiltrierende T-Zellen vorhanden (*Abb. 4.3a und b*). In Tumorgewebe des Patienten 174 fanden sich CD56⁺ Lymphozyten, die zahlenmäßig die Anzahl der T-Zellen überstiegen, so dass einige der positiven Zellen der Population der NK-Zellen zugeschrieben werden mussten (*Abb. 4.3c*). Bei Patient 2804 waren dagegen annähernd sämtliche Zellen gefärbt (*Abb. 4.3d*). Die meisten positiven Zellen wiesen dabei nicht die charakteristische Morphologie der Lymphozyten auf. Eine Kontrollfärbung mit dem G250-Antikörper zeigte, dass es sich bei den meisten CD56⁺ Zellen um Tumorzellen und nicht um Lymphozyten handelte (*Abb. 4.3d, Fenster*). Da die Expression von CD56 auf Tumorzellen bisher nie beschrieben worden ist, ist die Färbung als unspezifisch anzusehen. CD56⁺ NK-Zellen konnten somit nicht eindeutig von T-Zellen oder auch von Tumorzellen unterschieden werden. Der Antikörper gegen CD56 eignete sich somit nicht für eine spezifische Färbung der NK-Zellen.

Eine neue Möglichkeit für die Markierung der NK-Zellen eröffnete sich kürzlich durch die Beschreibung des AR NKp46, der von allen und ausschließlich von NK-Zellen exprimiert wird. Bisher ist die Färbung des Moleküls in der Immunhistochemie nicht beschrieben worden, weshalb verschiedene Antikörper, Methoden und Verdünnungen getestet wurden, um eine optimal spezifische und deutliche Färbung zu erzielen. Diese konnte über die indirekte APAAP-Methode und anhand eines nicht kommerziell erhältlichen unmarkierten Antikörpers gegen NKp46 erreicht werden (*Abb. 4.3e und f*). So konnte in einigen Tumorgeweben eine große Anzahl infiltrierender NK-Zellen gefunden werden, die bei Patient 174 etwa der Anzahl infiltrierender T-Zellen entsprach (*vgl. Abb. 4.3a und e*). Die Anzahl der NKp46⁺ Zellen war niedriger, als die Zahl der CD56⁺ Zellen, so dass ein Teil der CD56⁺ Zellen tatsächlich T-Zellen sein mussten (*vgl. Abb. 4.3c und e*). Die infiltrierenden NK- und T-Zellen waren über die gesamte Tumormasse verteilt und beschränkten sich nicht auf umgebendes oder intervenierendes Stroma.

ERGEBNISSE

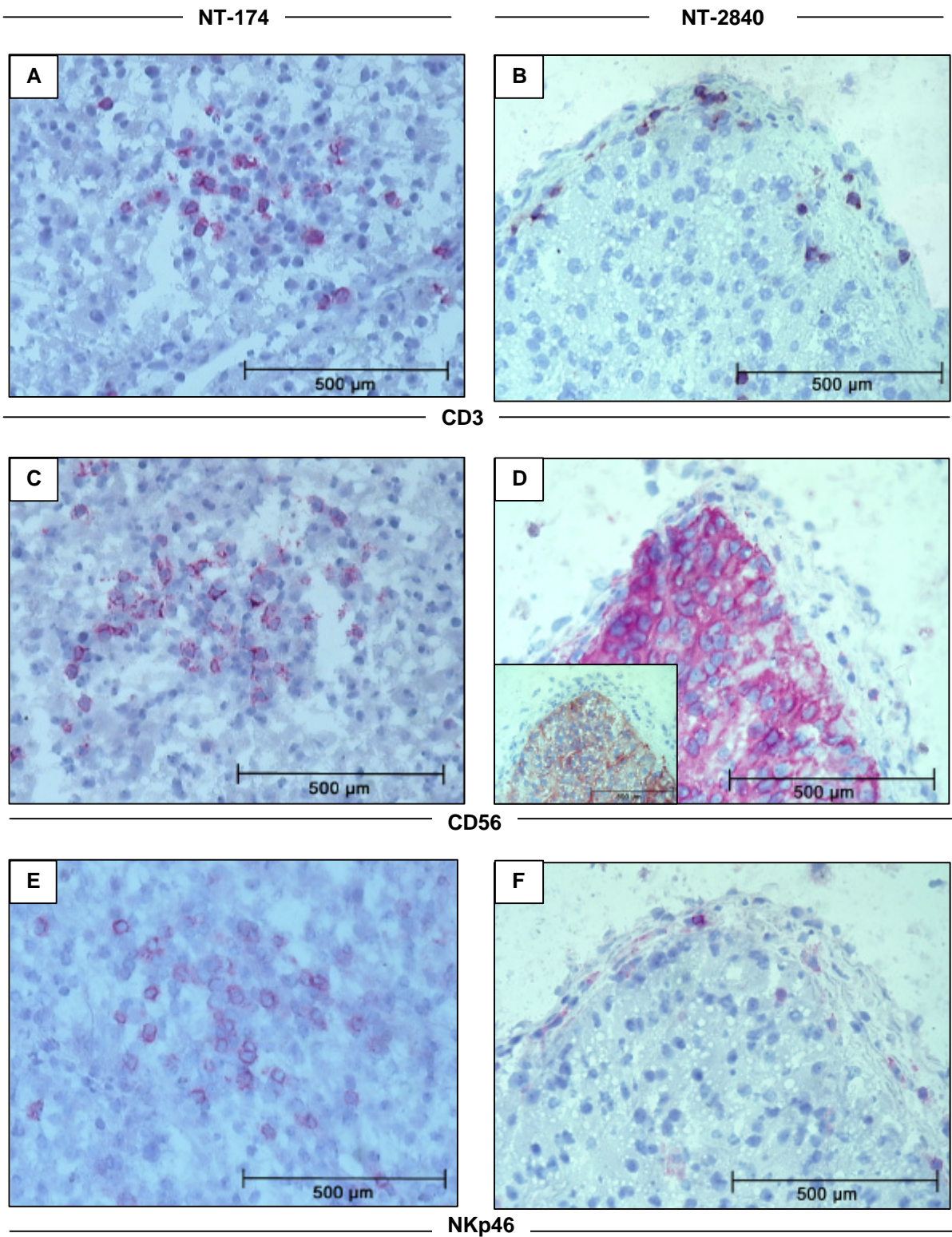


Abbildung 4.3 Färbung von T-Zellen und NK-Zellen in Tumorgewebe. APAAP-Färbung mit Antikörpern gegen CD3 (a,b), CD56 (c,d) und NKp46 (e,f) auf Tumorgewebe der Patienten 174 (a,c,e) und 2840 (b,d,f). Zusätzlich Färbung mit dem G250-Antikörper auf Tumorgewebe des Patienten 2840 nach der Peroxidase-Methode (d, Fenster). Mikroskopische Vergrößerungen x 40.

4.1.2.3 Monozyten bzw. Makrophagen

Wie bereits bei Patient 2936 gezeigt fanden sich in einigen Tumorgewebe Monozyten bzw. Makrophagen, die durch ihre morphologischen Eigenschaften und die Expression von CD4 bereits identifiziert werden konnten (4.2h, rechtes Fenster). Makrophagen sind phagozytische Zellen, die im Gewebe aus Monozyten entstehen und Mikroorganismen oder Bestandteile toter Zellen aufnehmen können. Diese werden auf der Zelloberfläche präsentiert und können die Aktivierung Antigen-spezifischer T- und B-Zellen bewirken. Die Makrophagen sind deshalb ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität und stellen einen entscheidenden Mechanismus für die Aktivierung der erworbenen Immunität dar. Die Phagozytose nekrotischer oder apoptotischer Zellbestandteile des Tumorgewebes durch anwesende Makrophagen würde deshalb zu einer Aktivierung Tumor-spezifischer T-Zellen beitragen.

Die spezifische Markierung dieser Zellen konnte durch die Färbung der CD14-Moleküle erreicht werden, die ausschließlich auf diesen Zellpopulationen exprimiert werden. *Abbildung 4.4* zeigt eine beispielhafte Färbung, in der vor allem anhand der digitalen Vergrößerung eine deutlich positive Zelle zu erkennen ist. Die Makrophagen traten nicht in Zellhaufen sondern jeweils vereinzelt und in sehr viel geringer Anzahl als infiltrierende Lymphozyten auf.

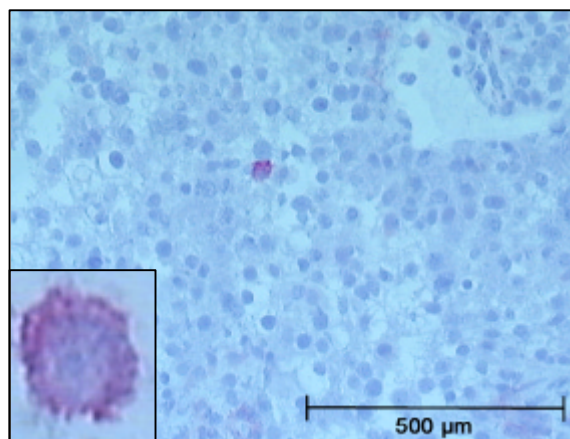


Abbildung 4.4 Färbung von Makrophagen in Tumorgewebe des Patienten 174. Peroxidase-Färbung mit einem Antikörper gegen CD14. Mikroskopische Vergrößerung x 40 und digitale Vergrößerung einer positiven Zelle (Fenster).

4.1.2.4 Granulozyten

Granulozyten sind ebenfalls phagozytische Zellen, die beispielsweise bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen eine zentrale Rolle spielen. Sie sind aber auch bei anderen entzündlichen Reaktionen des Immunsystems wichtig, da sie durch die Sekretion bestimmter Faktoren beispielsweise für die Erweiterung der Blutgefäße sorgen und so die Extravasation der Lymphozyten in verschiedene Gewebe beschleunigen.

Die Granulozyten konnten mit einem Antikörper gegen CD66b, ein Molekül das spezifisch auf Granulozyten exprimiert wird, nachgewiesen werden (*Abbildung 4.5*). In den digitalen Vergrößerungen lässt sich die Färbung dieses zytoplasmatischen und membranständigen Antigens deutlich erkennen. Hier wird auch die charakteristische segmentierte Morphologie des ungefärbten Zellkerns sichtbar. Die Granulozyten werden aufgrund dieser Eigenschaft auch als polymorphkernige Population innerhalb der Leukozyten bezeichnet. Im Normalparenchym der Niere fanden sie sich vorwiegend im Glomerulus, der einen Teil des Kapillarsystems der Niere darstellt. In Tumorgewebe konnten vereinzelt ebenfalls infiltrierende Zellen dieses Typs gefunden werden. Dies weist darauf hin, dass das Immunsystem eine Veränderung des Normalzustandes im Gewebe erkennt und auf die Anwesenheit des Tumors durch die Infiltration verschiedener Zellen reagiert.

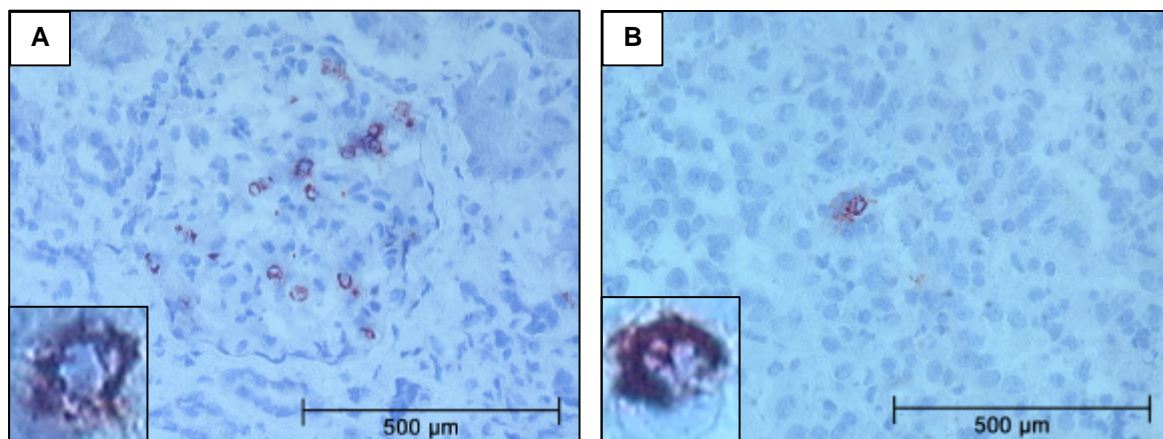


Abbildung 4.5 Färbung von Granulozyten in Nierentumor (NT) und Normalniere (NN). Peroxidase-Färbung mit einem Antikörper gegen CD66b auf in den Geweben NN-2664 (a) und NT-2664 (b). Mikroskopische Vergrößerung x 40 und digitale Vergrößerung einzelner positiver Zellen (Fenster).

4.1.3 Expression von Adapter- und Effektormolekülen

Diese und weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass Gewebe des Nierenzellkarzinoms von zytotoxischen Zellen, also CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen, infiltriert werden. Das scheinbar ungehinderte Wachstum der Tumoren lässt allerdings vermuten, dass diese Zellen im Tumor in einem anergen, also inaktiven Zustand vorliegen. Die Ursachen für diese Inaktivität sind bisher weitgehend ungeklärt. Im Fall des RCC und auch anderer Tumoren ist von einem Verlust der CD3ζ-Kette (CD247) berichtet worden, die üblicherweise von allen T- und NK-Zellen exprimiert wird und beispielsweise für die Weiterleitung positiver Signale über den T-Zellrezeptor-Komplex zuständig ist [34,35,176]. Auch eine verminderte Expression von Perforin würde zu einer geringeren Zytotoxizität der TIL beitragen. Beide Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der T- und NK-Zell-vermittelten Lyse, weshalb ihre Expression in Tumorgewebeproben überprüft wurde. *Abbildung 4.6* zeigt die Färbungen beispielhaft an Tumorgewebeproben der Patienten 174 und 2936. Beide zeigten eine deutliche Infiltration von T-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß (*Abb. 4.6a und b*). Die intrazellulär vorkommende CD3ζ-Kette war in beiden Fällen deutlich exprimiert (*Abb. 4.6c und d*). Die Zahl der CD3ζ⁺ Lymphozyten überstieg die Anzahl der T-Zellen, so dass unter den CD3ζ⁺ Zellen auch NK-Zellen zu sein schienen. Eine Verlust der Expression der CD3ζ-Kette konnte durch diese immunhistochemischen Ergebnisse demnach nicht bestätigt werden.

Alle bisher beschriebenen Färbungen bezogen sich auf Rezeptoren, die jeweils in der Membran der Zellen verankert waren. Die Perforin-Moleküle sind dagegen in sogenannten lytischen Granula im Inneren der Zelle gespeichert und werden nach der Aktivierung zytotoxischer Lymphozyten an der Kontaktstelle zu Zielzellen freigesetzt. Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen solcher intrazellulärer Effektormoleküle zeigte, dass die Anzahl der positiven Zellen stets weitaus geringer war als die Zahl infiltrierender Lymphozyten (*Abb. 4.6e und f*). Allerdings war die Intensität der Färbung sehr gering. Die digitale Vergrößerung zeigt dennoch deutlich, dass die Perforin-Moleküle an einer Stelle im Zellinneren gesammelt vorliegen konnten und so eine „Kappe“ bildeten (*Abb. 4.6e*, Fenster). Die vergrößerte Zelle in *Abbildung 4.6f* könnte an dieser Kappe am Zellrand quer angeschnitten worden sein, da die Färbung über die gesamte Fläche verteilt und kein Zellkern erkennbar war. Die Ansammlung von Perforin-Molekülen am Pol der Zelle könnte bedeuten, dass die zytotoxische Zelle durch den Kontakt mit einer benachbarten Zelle aktiviert worden war und der „tödliche Schlag“ (*lethal hit*) gegen die Zielzelle in Kürze ausgeführt werden sollte. Dies würde allerdings bedeuten, dass zumindest einige TIL nicht in einem inaktiven, sondern eher in einem aktivierten Zustand im Tumor vorlagen.

ERGEBNISSE

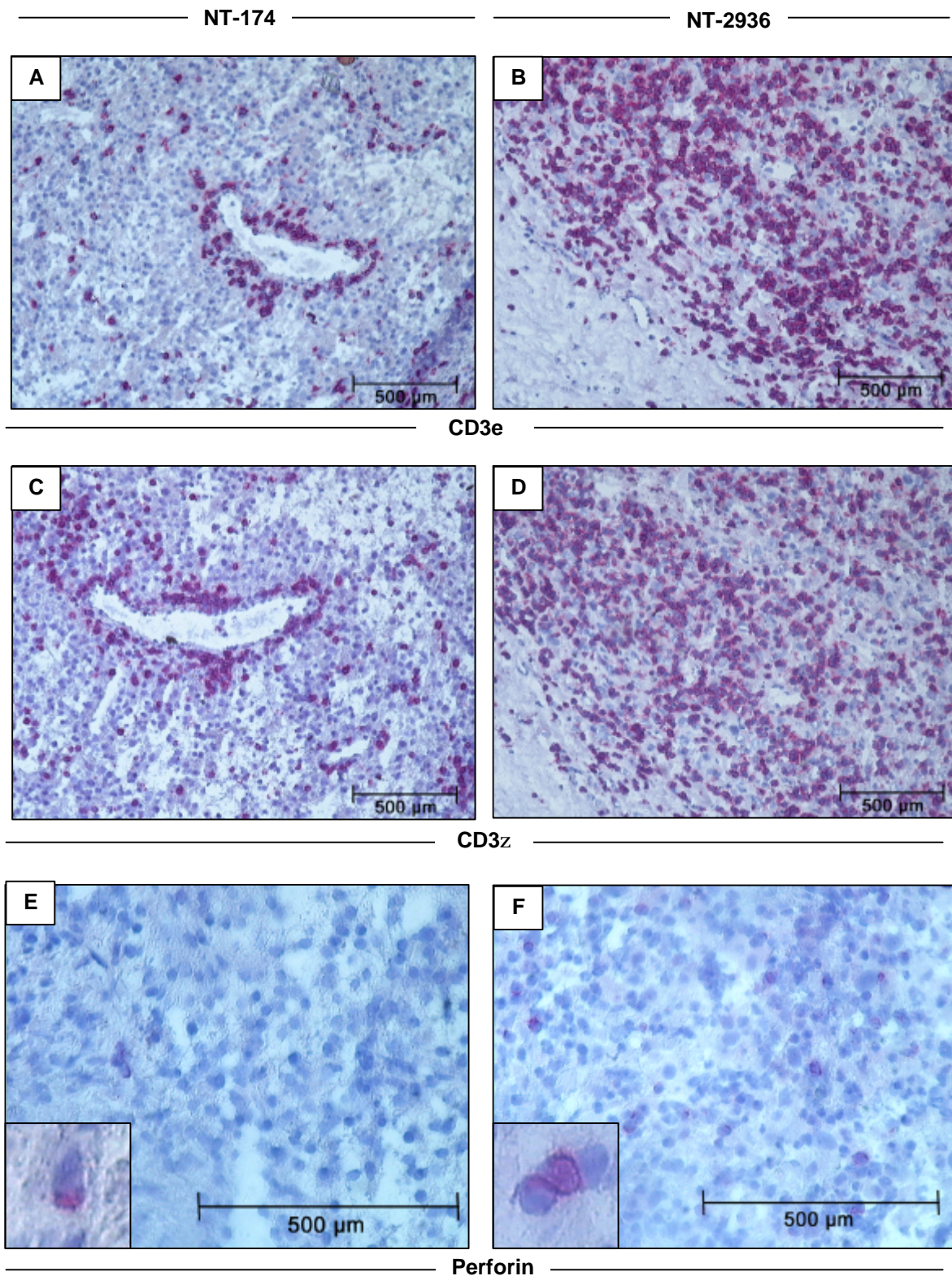


Abbildung 4.6 Färbung von T-Zellen, CD3 ζ -Kette und Perforin in Nierentumorgewebe (NT). APAAP-Färbung mit einem Antikörper gegen CD3e (a, b), CD3 ζ (c, d) und Perforin (e, f) auf NT-174 (a, c, e) und NT-2936 (b, d, f). Mikroskopische Vergrößerung x 20 (a-d) bzw. x 40 (e, f) und digitale Vergrößerungen positiver Zellen (Fenster in e und f). Die gezeigten Färbungen wurden freundlicherweise von D. Anz durchgeführt.

4.1.4 Expression von E-Cadherin und CD103

Die funktionelle Inaktivität infiltrierender Lymphozyten könnte auch von ebenfalls eingewanderten regulatorischen Zellen verursacht worden sein, die in der Lage sind andere Lymphozyten zu supprimieren. Die am ausführlichsten beschriebene Population regulatorischer Zellen ist eine Subpopulation von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}-Zellen). Für diese Zellen ist bisher kein individueller und spezifischer Marker beschrieben. Sie können lediglich durch eine Kombination verschiedener phänotypischer und funktioneller Eigenschaften eindeutig charakterisiert werden, weshalb eine einfache immunhistochemische Identifizierung der Zellen bisher nicht möglich ist.

Die Expression des Integrins $\alpha E(CD103)\beta 7$ (im folgenden als CD103 bezeichnet) wurde allerdings vor kurzem als Marker für eine sehr potente Population regulatorischer T-Zellen beschrieben [177]. Seine Expression auf TIL könnte deshalb auf das Vorhandensein von T_{reg}-Zellen hinweisen. *Abbildung 4.7* zeigt Färbungen infiltrierender T-Zellen und die Expression von CD103 sowie dessen Liganden E-Cadherin in Tumorgewebe der Patienten 174, 2936 und 2952. Die Gewebe der Patienten waren unterschiedlich stark mit T-Zellen infiltriert (*Abb. 4.7a-c*). Bei den Patienten 174 und 2952 konnten im Tumorgewebe einige CD103⁺ Lymphozyten gefunden werden, deren Anzahl allerdings geringer war als die der T-Zellen (*Abb. 4.7d und f*). Im Gewebe des Patienten 2936 konnten dagegen keine CD103⁺ Zellen gefunden werden (*Abb. 4.7e*). Alle Schnitte waren zur gleichen Zeit gefärbt worden, so dass ein methodischer Fehler ausgeschlossen werden konnte. Da jeweils eine deutliche Koexpression von CD3 und CD103 in aufeinanderfolgenden Serienschnitten der Tumorgewebe 174 und 2952 erkennbar war, schien eine Subpopulation an T-Zellen das CD103-Molekül zu exprimieren (vgl. *Abb. 4.7a und d*). Ob dieses Integrin auf den infiltrierenden Lymphozyten als Homing-Rezeptor in den Tumor fungiert haben könnte wäre dann plausibel, wenn das umgebende Gewebe den CD103-Liganden E-Cadherin exprimiert. Wie sich herausstellte, zeigten die Tumorgewebe in jenen Fällen eine schwache Färbung von E-Cadherin, in denen auch CD103⁺ Lymphozyten gefunden wurden, nicht jedoch im gegenteiligen Fall (*Abb. 4.7g-i*). Eine Rezeptor-Liganden-Interaktion wäre deshalb möglich. Die Expression von E-Cadherin im Parenchym einer normalen Niere ist in *Abbildung 4.7k-l* beispielhaft gezeigt. Die Übersichtsansicht veranschaulicht eine heterogene Färbung der Nierentubuli. Bei stärkerer mikroskopischer Vergrößerung ist erkennbar, dass die Expression von E-Cadherin auf die distalen Tubuli der Niere begrenzt war. Dies entsprach der in der Literatur beschriebenen Expression des Moleküls im Parenchym einer unveränderten Niere [178].

ERGEBNISSE

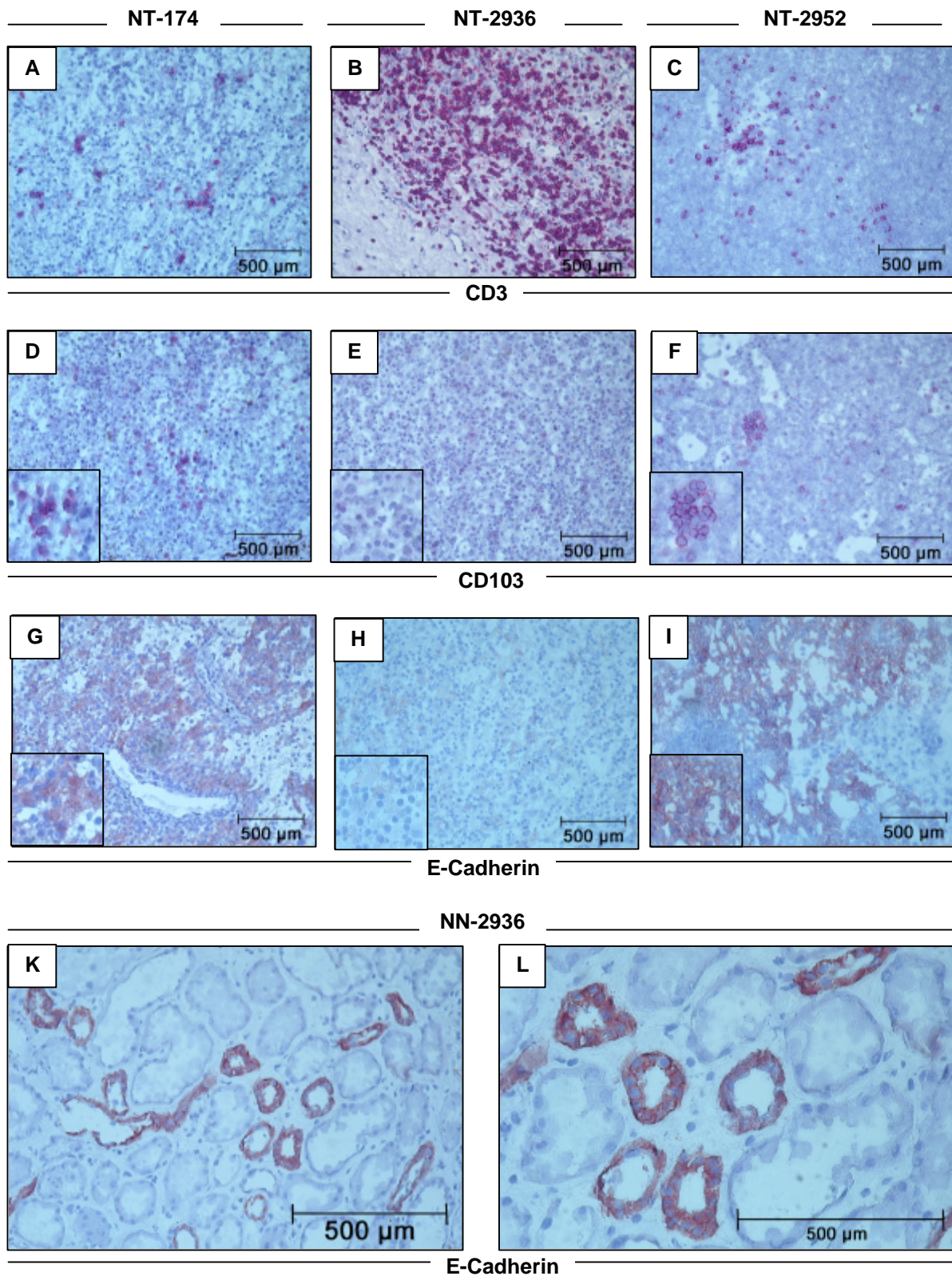


Abbildung 4.7 Färbung der T-Zellen, des Integrins CD103 und dessen Liganden E-Cadherin in Gewebe von Nierentumor (NT) und Färbung von E-Cadherin auf Normalniere (NN). APAAP-Färbung mit Antikörpern gegen CD3 (a-c), CD103 (d-f) und E-Cadherin (g-l) in den Geweben NT-174 (a,d,g), NT-2936 (b, e, h), NT-2952 (c, f, i) und NN-2936 (k, l). Mikroskopische Vergrößerung x 20 (a-k) bzw. x 40 (l) und digitale Vergrößerungen einzelner Ausschnitte (Fenster).

4.2 Lymphozyteninfiltrat *ex vivo*

Da die Methode der Immunhistochemie auf die Untersuchung einzelner phänotypischer Merkmale beschränkt ist und zudem keine Rückschlüsse auf die funktionellen Eigenschaften der Zellen zulässt, wurden die TIL aus verschiedenen RCC-Geweben frisch entnommener Tumoren isoliert und anschließend analysiert. Dabei wurden zwei verschiedene Isolierungsmethoden angewendet und untereinander verglichen.

4.2.1 Isolierung und zytotoxische Aktivität von TIL

Für eine weitergehende Charakterisierung der TIL wurden die Lymphozyten einerseits durch Kultivierung und andererseits durch Homogenisierung von Tumorgewebestückchen isoliert.

4.2.1.1 Isolierung durch Kultur der Gewebestückchen

Populationen ausgewanderter TIL

Zu Beginn der Arbeit wurden TIL durch die Kultivierung frischer Tumorgewebestückchen in IL-2-haltigem Medium (10 U/ml) isoliert. Die nach 14 Tagen ausgewanderten TIL wurden geerntet und mittels Durchflusszytometrie phänotypisch untersucht. *Tabelle 4.1* zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse sieben verschiedener Patienten.

Tabelle 4.1 Populationen ausgewanderter TIL.

TIL Nr. ¹	CD3 ⁻ CD56 ⁺ ²	CD3 ⁺ ²	CD3 ⁺ ³		
			CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺
2807	5	78	47	31	29
2907	6	93	63	41	60
2818	7	90	14	80	5
2840	11	86	91	10	36
2805	20	76	93	8	70
2904	28	66	33	65	33
2836	31	60	66	33	38

¹ TIL wurden nach Kultivierung von Tumorgewebestückchen für 14 Tage mit 10 U/ml IL-2 geerntet und analysiert.

² Angegebene Werte stellen die prozentualen Anteile der Zellpopulation an der jeweiligen Gesamtzahl der im FACS gewerteten Lymphozyten dar.

³ Angegebene Werte stellen die prozentualen Anteile an der Gesamtzahl der T-Zellen (CD3⁺) dar.

Die Anteile der NK- bzw. der T-Zellen innerhalb der TIL differierten zwischen verschiedenen Patienten. Sie lagen bei 5-31 % NK-Zellen (CD3⁻CD56⁺) bzw. bei 60-93 % T-Zellen (CD3⁺), jeweils gerechnet auf die Gesamtzahl lebender Zellen, die am FACS-Gerät eine für Lymphozyten charakteristische Größe und Granularität aufwiesen. CD19⁺ B-Zellen waren in den Kulturen mit einem prozentualen Anteil von lediglich 1-2 % an der Gesamtzahl der Lymphozyten vorhanden (nicht gezeigt).

Die α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors (CD25) wurde von der Mehrzahl der CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Da CD25 als Aktivierungsmarker bereits nach vier Stunden durch die Zugabe von IL-2 *in vitro* auf allen T- und NK-Zellen induziert werden kann, ist die Expression von CD25 auf TIL allerdings überwiegend als exogen induziert anzusehen. Sie konnte deshalb keinen zuverlässigen Hinweis auf das Vorhandensein einer T_{reg}-Zellpopulation geben, die ebenfalls durch die Markerkombination CD3⁺CD4⁺CD25⁺ charakterisiert ist.

Innerhalb der T-Zellen konnte nur bei den Patienten 2904 und 2818 eine überwiegende Anzahl CD8⁺ gegenüber CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden. Bei allen anderen isolierten TIL-Populationen waren immer vorwiegend CD4⁺ T-Zellen vorhanden. Dies entsprach nicht den *in situ*-Daten, die bei den meisten RCC-Patienten histologisch beobachtet werden und einen deutlich höheren Anteil CD8⁺ Zellen zeigten (4.1.2.1 und [20,25,26]). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen konnte allerdings nicht zwischen NK- und T-Zellen unterschieden werden, die beide das CD8-Molekül auf der Oberfläche tragen. Die hier erzielten immunhistochemischen Ergebnisse können somit nicht direkt mit obiger Tabelle verglichen werden. Selbst die Additionen der Werte für NK-Zellen (CD8⁺) und zugehöriger CD8⁺ T-Zellen aus der gezeigten Tabelle führen jedoch in keinem Fall zu einer Umkehr des Verhältnisses zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und somit zu einer Angleichung an die immunhistochemischen Daten. Die aus dem Gewebe ausgewanderten TIL-Populationen spiegelten somit nicht die *in situ*-Situation wieder, sondern mussten während der Kultivierung der Gewebestückchen verändert worden sein.

Funktionalität ausgewanderter TIL

Die zytotoxische Aktivität der TIL wurde über Chromfreisetzungstests untersucht. *Abbildung 4.8* zeigt, dass die ausgewanderten TIL-2904 die MHC-Klasse-I-negative Erythroleukämiezelllinie K562 und die autologe Tumorzelllinie RCC-2904 lysieren konnten. Die TIL-2907 wiesen ebenfalls zytotoxische Aktivität gegen K562 und die in diesem Fall allogene Tumorzelllinie RCC-2904 auf.

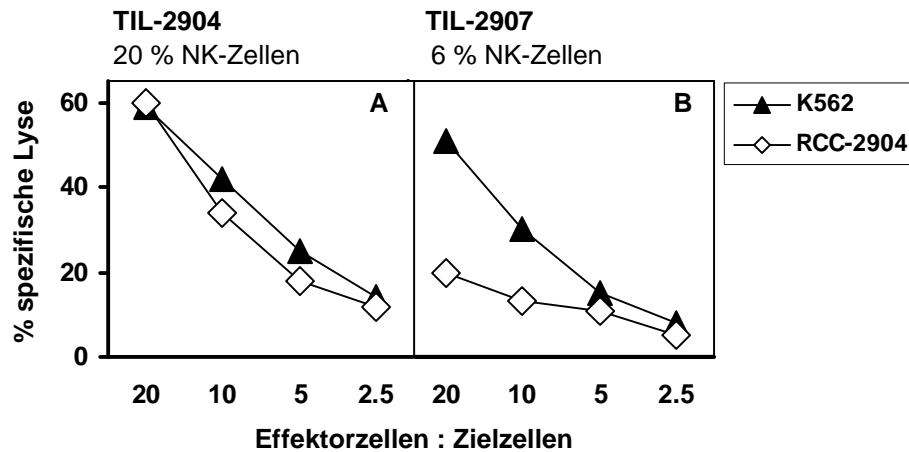


Abbildung 4.8 Zytotoxizität ausgewanderter TIL. Zytotoxische Aktivität von TIL-2904 (a) und TIL-2907 (b) gegen K562 und RCC-2904. Angegeben sind prozentuale Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten. TIL wurden durch Kultivierung kleiner Tumorgewebestückchen für 14 Tage mit 10 U/ml IL-2 isoliert und anschließend analysiert.

Um zu untersuchen, ob auf diese Weise kultivierte TIL die gleichen Eigenschaften wie TIL *in situ* aufwiesen oder ob Populationsverteilungen verändert und zytotoxische Aktivitäten während der Kultur der Zellen mit IL-2 erworben worden waren, wurden die TIL im weiteren Verlauf der Arbeit frisch aus Tumorgewebe isoliert und sofort bzw. nach eintägiger Kultur analysiert.

4.2.1.2 Direkte Isolierung von TIL ex vivo

Populationen direkt isolierter TIL

Für die direkte Isolierung der TIL ex vivo wurden die Tumorgewebe mechanisch homogenisiert, um eine Zerstörung der Oberflächenantigene durch die Verwendung von Verdauungsenzymen zu vermeiden. Die Zellausbeute nach anschließender Ficollierung schwankte zwischen Tumorgeweben verschiedener Patienten, obwohl die Menge des homogenisierten Materials bei den verschiedenen Patienten vergleichbar war.

Die Zellen wurden ohne weitere Kultivierungsschritte durchflusszytometrisch analysiert. Um den Phänotyp und die Zusammensetzung der TIL mit der autologen peripheren Situation vergleichen zu können, wurden PBMC der einzelnen Patienten ebenfalls charakterisiert. *Tabelle 4.2* zeigt eine Zusammenfassung der Daten fünf verschiedener Patienten.

Tabelle 4.2 Populationen direkt isolierter TIL und autologer PBMC.

Patient Nr. ¹		CD3 ⁻ CD56 ⁺ ²	CD3 ⁺ ²	CD3 ⁺		
				CD4 ⁺ ³	CD8 ⁺ ³	CD4 ⁺ CD25 ⁺ ⁴
174	TIL	41	50	46	54	n.u.
	PBMC	16	59	88	12	n.u.
2926	TIL	34	53	38	62	4 (10)
	PBMC	25	62	53	47	9 (20)
2936	TIL	12	84	34	61	6 (17)
	PBMC	8	83	67	33	5 (7)
2928	TIL	7	86	28	72	7 (25)
	PBMC	16	71	75	25	n.u.
2986	TIL	7	82	20	76	7 (35)
	PBMC	18	74	68	34	11 (16)

¹ TIL und PBMC der Patienten wurden direkt ex vivo isoliert und analysiert.

² Angegebene Werte stellen die prozentualen Anteile an der jeweiligen Gesamtzahl der im FACS anhand FSC und SSC gewerteten Lymphozyten dar.

³ Angegebene Werte stellen die prozentualen Anteile an der jeweiligen Gesamtzahl der T-Zellen (CD3⁺) dar.

⁴ Angegebene Werte stellen die prozentualen Anteile an der jeweiligen Gesamtzahl der T-Zellen (CD3⁺) bzw. der CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺CD4⁺, in Klammern) dar. Die Bezeichnung „n.u.“ steht für nicht untersuchte Markerkombinationen.

Keiner der Patienten litt an einer Lymphozytopenie, wie sie von anderen RCC-Patienten berichtet worden ist [31]. Der prozentuale Anteil der NK-Zellen (CD3⁻CD56⁺) an der jeweiligen Gesamtzahl der TIL war bei den Patienten höher oder auch niedriger verglichen mit der autologen peripheren Lymphozytenpopulation und erreichte bei TIL-174 und TIL-2926 einen Wert von mehr als 30 %. Dies konnte bei PBMC von Patienten und gesunden Spendern nicht beobachtet werden. Das Auftreten hoher Prozentsätze Tumor-infiltrierender NK-Zellen (NK-TIL) korrelierte mit der Beobachtung einer hohen Anzahl an NK-Zellen *in situ*, die anhand der immunhistochemischen Färbung von NKp46 identifiziert wurden (vgl. TIL-174 *Tabelle 4.2* und *Abb. 4.3a und e*).

Es war auffällig, dass bei allen Patienten jeweils mehr CD8⁺ als CD4⁺ T-Zellen innerhalb der TIL gefunden wurden. Das entsprach den unter 4.1.2.1 gezeigten Daten *in situ* und war innerhalb der autologen peripheren Populationen nicht zu finden, bei denen entsprechend zu Normalspendern stets eine Mehrzahl CD4⁺ T-Zellen gefunden wurde. CD8⁺ T-Zellen schienen somit selektiv in das Tumorgewebe rekrutiert worden zu sein; auch das Vorkommen von tumorspezifischen zytotoxischen (CD8⁺) T-Zellen innerhalb von RCC-TIL-Populationen ist bereits beschrieben worden [30].

Der Anteil der infiltrierenden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen variierte bei den Patienten und lag bei 4-7 % gerechnet auf die jeweilige Gesamtzahl der T-Zellen bzw. bei 10-25 % der CD4⁺ T-Zellen und war damit entweder höher (TIL-2936, TIL-2986) oder niedriger (TIL-2926) als innerhalb der autologen peripheren Population. In dieser Hinsicht unterschieden sich TIL und PBMC im Mittel nicht von peripheren Populationen gesunder Spender, bei denen der Anteil der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen bei etwa 10 % der T-Zellen bzw. 15 % der CD4⁺ T-Zellen lag (nicht gezeigt). Innerhalb der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen ist eine wichtige Subpopulation an T_{reg}-Zellen zu finden [138,140]. Da das CD25-Molekül allerdings auch von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, konnte nicht entschieden werden, ob diese Zellen zur Gruppe der T_{reg}-Zellen gezählt werden mussten oder aktivierte Lymphozyten darstellten. Da jedoch nicht alle CD4⁺ T-Zellen sowie nur ein geringer Anteil der CD8⁺ T-Zellen (nicht gezeigt) den Marker CD25 auf der Oberfläche trugen, schienen die Lymphozyten im Tumor nicht generell in einem aktivierten Zustand vorzuliegen, so dass weiterhin die Möglichkeit bestand, dass es sich auch um T_{reg}-Zellen handeln könnte. Dies kann allein durch phänotypische Untersuchungen nicht entschieden werden.

Die beschriebenen Unterschiede, die zwischen TIL und PBMC der Patienten beobachtet werden konnten, machten deutlich, dass durch die direkte Isolierung der Zellen aus dem Tumor eine individuelle Population an TIL gewonnen wurde, die in ihren phänotypischen Eigenschaften den TIL *in situ* entsprachen.

Vergleich ausgewanderter und direkt isolierter TIL-Populationen eines Gewebes

Wie die Ergebnisse aus 4.2.1.1 und 4.2.1.2 zeigen, unterschied sich die Zusammensetzung der TIL bei den beiden verschiedenen Isolierungsmethoden. Um zu zeigen, dass die Unterschiede zwischen den ausgewanderten und den direkt isolierten TIL durch die Kultivierung der ausgewanderten Zellen verursacht worden waren und nicht Unterschiede zwischen den Tumoren der einzelnen Patienten darstellten, wurden TIL eines einzigen Tumorgewebes sowohl direkt als auch durch Kultivierung isoliert. *Tabelle 4.3* zeigt phänotypische Eigenschaften ausgewanderter sowie direkt isolierter TIL des Patienten 2907 im Vergleich.

Tabelle 4.3 Vergleich verschieden isolierter TIL-2907.

Isolierung	CD3 ⁻ CD56 ⁺ ¹	CD3 ⁺ ¹	CD3 ⁺ ²		
			CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺
Direkt ³	12	67	39	61	19
Kultivierung ⁴	6	93	63	41	74

¹ Angegebene Werte stellen prozentuale Anteile an der jeweiligen Gesamtzahl der im FACS anhand FSC und SSC gewerteten Lymphozyten dar.

² Angegebene Werte stellen prozentuale Anteile an der jeweiligen Gesamtzahl der T-Zellen (CD3⁺) dar.

³ Isolierung der TIL durch mechanische Homogenisierung von Tumorgewebe.

⁴ Isolierung der TIL durch Kultivierung des Gewebes in IL-2-haltigem Medium.

Die Isolierung von TIL durch Kultivierung der Gewebe über 14 Tage in IL-2-haltigem Medium (10 U/ml) führte zu einer Abnahme des Anteils der NK-Zellen um die Hälfte. Die CD4⁺ T-Zellen hatten während der Kultivierung einen Wachstumsvorteil, der eine Umkehr des CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zell-Verhältnisses bewirkte. Zusätzlich führte die Anwesenheit von IL-2 zu einer erhöhten Expression der α -Kette des hochaffinen IL-2 Rezeptors (CD25) auf T-Zellen. Dies bestätigte die Beobachtung, dass die Gewinnung von TIL durch eine Langzeitkultivierung zu verschobenen Populationsverhältnissen und zu einer Aktivierung der Zellen führte, die nicht der *in situ* Situation entsprach. Die Kultivierung der Gewebestückchen eignet sich demnach bezüglich der Verteilung der NK- und T-Zell-Subpopulationen und einiger Oberflächenmarker nicht zur Charakterisierung der TIL *in situ*, sondern allenfalls zur Expansion Tumor-spezifischer TIL für die Identifizierung RCC-spezifischer Antigene [27,30].

Zytotoxizität frisch isolierter TIL

Wie unter 4.2.1.1 beschrieben, zeigten kultivierte TIL eine deutliche Zytotoxizität gegen verschiedene Zielzellen. Um festzustellen, ob direkt aus dem Tumorgewebe isolierte TIL ebenfalls diese Effektorfunktion aufwiesen, wurde die zytotoxische Aktivität der nicht-kultivierten TIL in Chromfreisetzungstests untersucht. Direkt *ex vivo* isolierte TIL zeigten kaum Lyse der MHC-Klasse-I-negativen Zelllinie K562 (Abb. 4.9). Dies war weitgehend unabhängig vom Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL, da selbst ein Prozentsatz von 28 % NK-Zellen innerhalb der TIL eines Patienten (TIL-2926, c) nur eine geringe Lyse der Zielzellen bewirkte. PBMC eines gesunden Spenders mit einem Anteil von 15 % NK-Zellen (PBMC-PH, d) zeigten dagegen eine deutliche NK-Zell-vermittelte Lyse. Auch die PBMC der Tumorpatienten waren in der Lage die Zielzellen zu erkennen. Wie der direkte Vergleich zwischen TIL und PBMC des Patienten 2986 (a und d) zeigte, konnten TIL im Gegensatz zu autologen PBMC nur einen sehr geringen Anteil der Zielzellen lysieren und zeigten somit eine stark beeinträchtigte zytotoxische Aktivität. Beide Zellpopulationen wurden im gleichen Experiment untersucht, um methodische Fehler auszuschließen. Als Positivkontrolle wurde die NK-Leukämie-Zelllinie NKL verwendet, die als NK-Standard-Zelle als Vergleichslinie für alle funktionellen NK-Zell-Experimente verwendet wurde und einen hohen Prozentsatz spezifischer Lyse zeigte (f). Ein Vergleich zwischen direkt isolierten und ausgewanderten TIL des Patienten 2907 verdeutlicht die stark verminderte Aktivität der nicht-kultivierten TIL *ex vivo* (vgl. Abb. 4.8b und 4.9b).

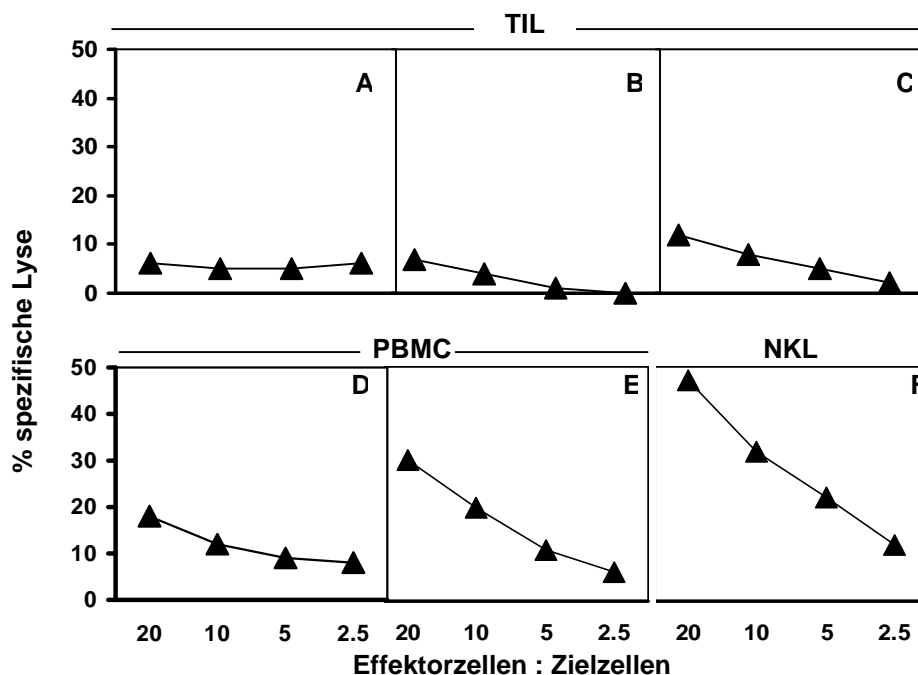


Abbildung 4.9 Zytotoxizität direkt isolierter TIL und PBMC. Zytotoxizität von TIL-2986 (a), TIL-2907 (b), TIL-2926 (c), PBMC-2986 (d) und PBMC-PH (e) gegen K562. Die NK-Leukämie-Zelllinie NKL diente als Positivkontrolle (f). Prozentuale Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten betragen 10 % (a), 12 % (b), 28 % (c), 15 % (d) bzw. 18 % (e).

Funktionalität der TIL nach Aktivierung über IL-2

Da kultivierte im Gegensatz zu frisch isolierten TIL stärkere Zytotoxizität gegen MHC-Klasse-I-negative Zellen zeigten, wurde der aktivierende Effekt des IL-2 auf die zytotoxische Aktivität der TIL überprüft. Dazu wurden die Zellen über Nacht mit niedrigdosiertem IL-2 (20 U/ml) kultiviert. Tatsächlich zeigten die TIL-Populationen am nächsten Tag eine deutliche Lyse der Zielzellen K562 und RCC-26, einer allogenen Tumorzelllinie (Abb. 4.10). Ein Vergleich der TIL-2926 vor und nach Kurzzeit-Kultivierung mit IL-2 macht deutlich, dass die Zellen durch das Zytokin aktiviert wurden (vgl. Abb. 4.9c und 4.10b). Die Fähigkeit, diese Zielzellen zu lysieren, war an Tag sieben der Kultur weiterhin erhalten (nicht gezeigt). Diese Art der Zytotoxizität gegen MHC-Klasse-I-negative Zielzellen ist den NK-Zellen zuzuschreiben, die per Definition eine nicht-MHC-restringierte Aktivität aufweisen und in Abwesenheit inhibitorischer Signale über MHC-Moleküle lytisch aktiv sind.

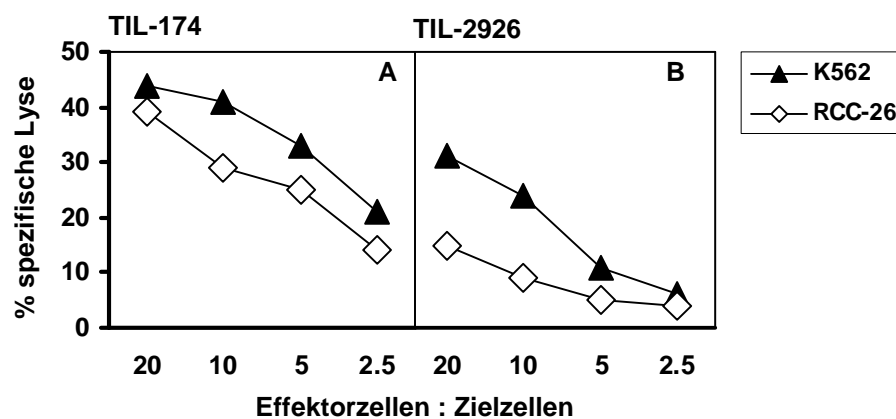


Abbildung 4.10 Zytotoxizität direkt isolierter TIL nach Aktivierung über IL-2. Zytotoxizität von TIL-174 (a) und TIL-2926 (b) gegenüber K562 und RCC-26. TIL-Populationen wurden direkt isoliert und über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert. Prozentuale Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten betragen 40 % (a) bzw. 34 % (b).

Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität vom Anteil infiltrierender NK-Zellen

Die Fähigkeit der TIL die MHC-Klasse-I-negative Zelllinie K562 nach Aktivierung mit IL-2 zu lysieren, war abhängig vom Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL (NK-TIL). In *Abbildung 4.11* ist dargestellt, dass Populationen mit einem Anteil von nur 6 % (TIL-2928, *a* und TIL-2952, *b*) bzw. 10 % (TIL-2986, *c*) NK-TIL trotz Aktivierung über IL-2 keine, oder nur eine geringe zytotoxische Aktivität zeigten. Als Positivkontrolle wurden PBMC eines gesunden Spenders mit einer vergleichbaren Anzahl an NK-Zellen verwendet, die ebenfalls über Nacht mit IL-2 kultiviert worden waren (PBMC-PH, *d*). Auch bei diesen peripheren Lymphozyten konnte eine Steigerung der Zytotoxizität der Zellen durch Kultivierung mit IL-2 erzielt werden, dennoch zeigten die peripheren NK-Zellen auch ohne Aktivierung über IL-2 eine deutliche Lyse der Zielzellen und unterschieden sich somit in ihrer zytotoxischen Aktivität von der Population der infiltrierenden Lymphozyten (vgl. *Abb. 4.9e* und *4.11d*).

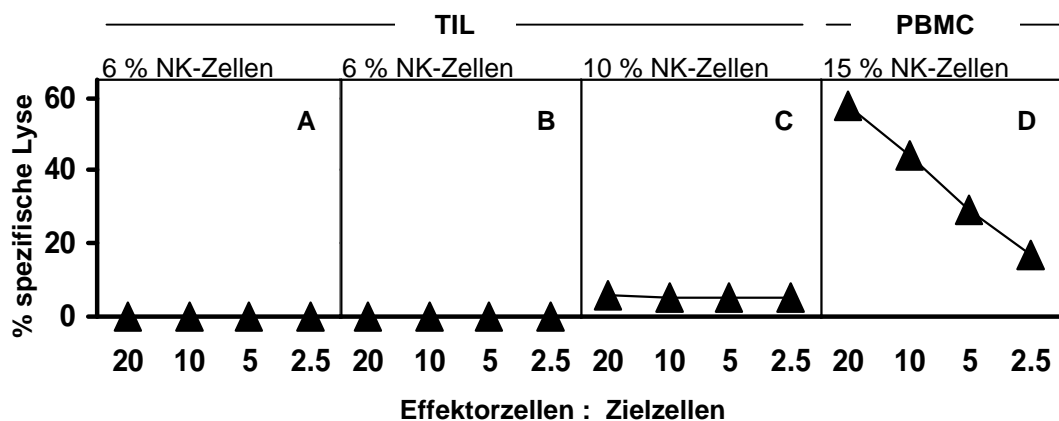


Abbildung 4.11 Zytotoxizität direkt isolierter und IL-2-aktivierter TIL mit geringen prozentualen Anteilen an NK-Zellen. Zytotoxizität von TIL-2928 (*a*), TIL-2952 (*b*), TIL-2986 (*c*) und PBMC-PH (*d*) gegen K562. Lymphozytenpopulationen wurden direkt isoliert und über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert. Angegeben sind die prozentualen Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten.

Diese Versuche machten deutlich, dass die direkt isolierten TIL nach Aktivierung über IL-2 nur dann eine Lyse der MHC-Klasse-I-negativen Zielzellen zeigten, wenn der Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL-Population hoch war. Ein hoher Prozentsatz an NK-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation im Tumorgewebe war somit mit einer höheren zytotoxischen Aktivität der TIL gekoppelt.

Da ausgewanderte TIL jedoch unabhängig vom Anteil der NK-Zellen Zytotoxizität zeigten, musste es möglich gewesen sein, die Inaktivität der TIL durch längere Kultivierung der Zellen über sieben bis 14 Tage mit IL-2 aufzuheben, selbst wenn der Anteil der NK-Zellen gering war (*Abb. 4.8b*). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser und weiterer Patienten in *Tabelle 4.4* zeigt, dass die zytotoxische Aktivität der TIL vom Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL-Population abhing. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der lytischen Aktivität und der Größe bzw. der Ausbreitung des Tumors festgestellt werden, welche über die Klassifizierung der Tumoren nach TNM-Kriterien charakterisiert wurden [163,164,179]. Entsprechend konnte auch kein Zusammenhang zwischen dem Anteil der NK-TIL und dem Tumorstadium festgestellt werden, so dass eine vermehrte Zahl an NK-Zellen und die damit verbundene stärkere zytotoxische Aktivität der TIL nicht mit einer geringeren Ausbreitung des Tumors gekoppelt war.

Tabelle 4.4 Zusammenhang zwischen der zytotoxischen Aktivität, dem Anteil an NK-Zellen und der Klassifikation des Tumors.

TIL ¹	% NK ²	Lyse ³	Tumor-Klassifikation ⁴
174	40	+	T3a N0 M0 G3 Stadium III
2924	44	+	T1 N0 M0 G2 Stadium I
2926	34	+	T1 N0 M0 G2-3 Stadium I
2907	8	-	T1 N0 M0 G2 Stadium I
2928	7	-	T2 N0 M0 G3 Stadium II
2952	6	-	T3b N2 M0 G3 Stadium IV
2986	10	-	T3b N0 M0 G2 Stadium III
2936	12	-	T3b N0 M0 G3 Stadium III

¹ TIL wurden direkt aus dem Gewebe isoliert und über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert.

² Prozentualer Anteil der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der im FACS anhand FSC und SSC gewerteten Lymphozyten.

³ Spezifische Lyse der K562-Zellen in einem Chromfreisetzungstest; + bedeutet > 30 % spezifische Lyse; - bedeutet < 15 % spezifische Lyse bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 20:1.

⁴ Tumorklassifizierung und Stadieneinteilung nach TNMG-Kriterien der *UICC* [163,164,179].

NK-Zellen als maßgebliche Effektorpopulation

Um zu untersuchen ob die Lyse der Zielzellen von TIL mit einem geringen Anteil an NK-Zellen durch eine Anreicherung der NK-TIL als Effektorzellen erreicht werden kann, wurde die CD56⁺ Zellfraktion der TIL über ferromagnetische Antikörper positiv selektiert. Diese Anreicherung der NK-TIL von 12 % auf 90 % innerhalb der TIL-2936 führte jedoch ebenfalls nicht zu einer Lyse der Zielzellen (Abb. 4.12). Periphere NK-Zellen desselben Patienten zeigten dagegen im selben Versuchsansatz eine deutliche Lyse von K562, so dass innerhalb eines Patienten nur die Population der TIL zytotoxisch inaktiv war. Beide Zellpopulationen wurden gleichzeitig separiert und analysiert, um methodische Fehler auszuschließen. Somit schien ein niedriger Anteil an NK-Zellen innerhalb der TIL-Population trotz Anreicherung der NK-Zellen und Kultivierung mit IL-2 mit einer Inaktivität der NK-Zellen gekoppelt zu sein.

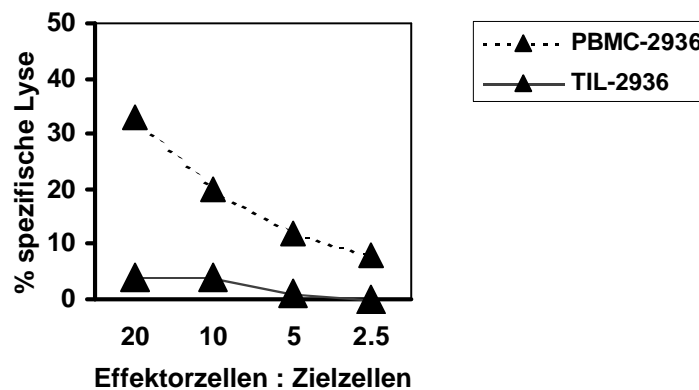


Abbildung 4.12 Lyse IL-2-aktivierter NK-Zellen aus TIL und PBMC. TIL und PBMC des Patienten 2936 wurden direkt isoliert, über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert und anschließend über Antikörper gegen CD56 separiert. Die CD56⁺ Zellfraktion der TIL bzw. PBMC enthielt 90 % bzw. 80 % NK-Zellen.

Diese Versuche warfen die Frage auf, ob tatsächlich die Population der NK-Zellen innerhalb der TIL für die Lyse der MHC-Klasse-I-negativen K562-Zellen verantwortlich war, da die Anreicherung der NK-Zellen keine Steigerung der Zytotoxizität bewirkte.

ERGEBNISSE

In einem weiteren Versuch konnte allerdings gezeigt werden, dass die NK-Zellen dennoch die maßgebliche Effektorpopulation innerhalb der TIL darstellten sofern eine Lyse der Zielzellen erfolgen konnte. Die Separation einer gemischten TIL-Population mit hohem Anteil an NK-Zellen in $CD56^+$ und $CD56^-$ Zellfraktionen zeigte deutlich, dass nur die $CD56^+$ Zellfraktion, welche den Großteil der NK-Zellen und nur einen kleinen Prozentsatz an T-Zellen enthielt, die Lyse der beiden Zielzelllinien K562 und RCC-26 bewirkte (Abb. 4.13).

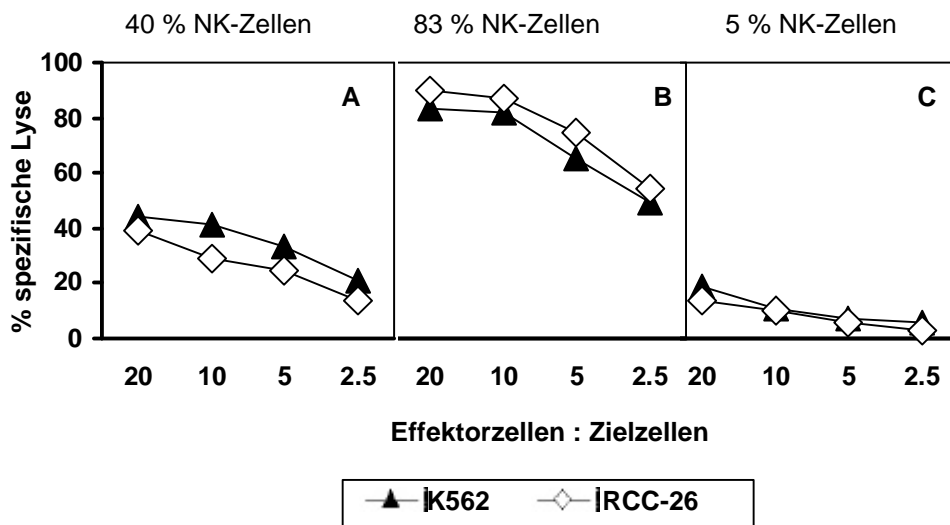


Abbildung 4.13 Die nicht-MHC-restringierte Lyse durch TIL wird von NK-Zellen vermittelt. Zytotoxische Aktivität der gemischten TIL-Population (a), der $CD56^+$ Zellfraktion (b) und der $CD56^-$ Zellfraktion (c) des Patienten 174 gegen K562 und RCC-26. Angegeben sind die prozentualen Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten. TIL-174 wurden direkt isoliert, über Nacht mit 20 U7ml IL-2 kultiviert und mit Antikörpern gegen CD56 separiert und simultan analysiert.

Frisch separierte und gleichermaßen kultivierte PBMC-Populationen von Patienten und gesunden Spendern zeigten in gleicher Weise eine Lyse der MHC-Klasse-I-negative Zelllinie K562. Nur die nicht separierte und die CD56⁺ Zellfraktion der PBMC-2986 konnten einen deutlichen Prozentsatz der Zielzellen lysieren (Abb. 4.14a). Dies konnte auch bei den PBMC-2989 gezeigt werden, die mit separierten NK-Zellen des gesunden Spenders JS verglichen wurden (Abb. 4.14b). Auch hier bewirkte die Anreicherung der NK-Zellen einen höheren Prozentsatz spezifischer Lyse. Dieser variierte zwischen verschiedenen Spendern, was an einem unterschiedlichen Aktivierungsstatus der Zellen im peripheren Blut der verschiedenen Spender liegen könnte.

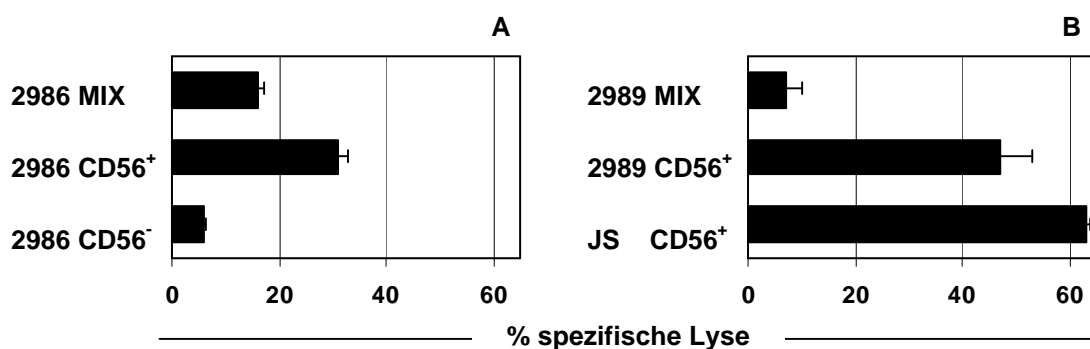


Abbildung 4.14 Die nicht-MHC-restringierte Lyse der PBMC wird von NK-Zellen vermittelt. Zytotoxische Aktivität von PBMC (MIX, 18 % NK-Zellen), angereicherten NK-Zellen (CD56⁺, 50 % NK-Zellen) und NK-Zell-depletierten Zellen (CD56⁻, 2 % NK-Zellen) des Patienten 2986 (a) sowie zytotoxische Aktivität von PBMC (MIX, 21 % NK-Zellen) und angereicherten NK-Zellen (CD56⁺, 80 % NK-Zellen) des Patienten 2989 und angereicherten NK-Zellen des gesunden Spenders JS (CD56⁺, 81 % NK-Zellen) (b) gegen K562-Zellen. Effektorzellen wurden direkt isoliert, über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert und teilweise mit Antikörpern gegen CD56 separiert (CD56⁺ Zellfraktionen). Gezeigt sind die Prozentsätze spezifischer Lyse bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 20:1.

Einige NK-TIL zeigten somit nach Aktivierung mit IL-2 deutliche Effektorfunktionen *in vitro*, die auch bei peripheren NK-Zellen von Normalspendern und von RCC-Patienten beobachtet werden können. In der *in vivo*-Situation, die durch die direkte Isolation der TIL am besten nachempfunden werden konnte, schienen die NK-TIL dagegen in einem inaktiven Zustand vorzuliegen, der abhängig von der Anzahl der NK-Zellen durch Kurzzeitkultivierung mit IL-2 aufgehoben werden konnte. Um Ursachen für die unterschiedlich starke Infiltration der NK-Zellen oder für den generell inaktivierten Zustand dieser Zellen im Tumor zu finden, wurde die Population der NK-TIL im weiteren Verlauf der Arbeit näher charakterisiert.

4.2.2 Charakterisierung der NK-TIL

4.2.2.1 Expression und Funktionalität inhibitorischer Rezeptoren

Vergleich der Expressionsmuster von IR auf TIL und PBMC

Ein Vergleich der Expressionsmuster verschiedener inhibitorischer Rezeptoren (IR) zwischen TIL und autologen PBMC mehrerer Patienten zeigte deutliche Unterschiede zwischen beiden NK-Populationen. Bei unterschiedlichen Patienten ließen sich jeweils ähnliche Tendenzen erkennen (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5 Expressionsmuster inhibitorischer Rezeptoren auf TIL und PBMC.

Patient ¹	CD3 ⁻²					
	CD158a ⁺ (p58.1 ⁺)	CD158b ⁺ (p58.2 ⁺)	CD158e ₁ ⁺ (p70 ⁺)	CD85j ⁺ (ILT2 ⁺)	CD94/ NKG2A ⁺	
174	TIL	6	8	0 ³	11	83
	PBMC	23	31	0	44	63
2986	TIL	13	43	1	n.u.	43
	PBMC	14	56	17	n.u.	39
2936	TIL	8	8	0	5	83
	PBMC	25	13	0	25	63
2928	TIL	29	29	14	14	57
	PBMC	38	38	19	94	50
2926	TIL	12	33	16	40	47
	PBMC	16	36	20	72	44

¹ TIL und PBMC wurden direkt isoliert, über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert und analysiert.

² Angegebene Werte sind prozentuale Anteile an der jeweiligen Gesamtzahl der NK-Zellen (CD3⁻CD56⁺). n.u.= nicht untersucht.

³ Uhrberg *et al.*[180] haben berichtet, dass einige Spender CD158e₁ nicht exprimieren.

NK-Zellen, die Rezeptoren der Ig-Superfamilie (KIR), wie p58.1, p58.2 und p70 (CD158a, CD158b und CD158e₁), und den IR ILT2 (CD85j) auf der Oberfläche trugen, waren im Tumor verglichen mit peripheren NK-Zellen stets unterrepräsentiert. Dagegen war der Anteil CD94/NKG2A⁺ NK-Zellen im Tumorgewebe stets höher als in der Peripherie. Eine individuelle Subpopulation an NK-Zellen schien den Tumor also bevorzugt zu infiltrieren.

Kürzlich ist beschrieben worden, dass eine NK-Subpopulation im peripheren Blut mit genau diesen phänotypischen Merkmalen ($\text{KIR}^- \text{NKG2A}^+$) eine immunregulatorische Rolle spielen könnte, da sie einerseits anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 produzieren und andererseits eine verminderte zytotoxische Aktivität zeigen, so dass sie die Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems eher verlangsamen [128]. Ein weiteres Charakteristikum dieser immunregulatorisch wirkenden NK-Zellen ist die hohe Expression von CD56 ($\text{CD56}^{\text{bright}}$). In *Abbildung 4.15a-c* sind diese beschriebenen Charakteristika beispielhaft an PBMC eines Patienten dargestellt. Während einige NK-Zellen mit schwacher Expression von CD56 (CD56^{dim}) verschiedene KIR exprimieren, sind die $\text{CD56}^{\text{bright}}$ Populationen stets KIR^- NK-Zellen. Bei peripheren Lymphozyten macht diese $\text{CD56}^{\text{bright}} \text{KIR}^-$ Subpopulation etwa 10 % aller NK-Zellen aus. Die Untersuchung verschiedener TIL-Populationen zeigte, dass die Expression von CD56 auf NK-TIL stark variierte. Die NK-TIL-174 zeigten eine sehr hohe Expression von CD56, während die NK-TIL der Patienten 2924 und 2986 dagegen hauptsächlich CD56^{dim} waren. Als Vergleichspopulation für diese Färbungen dienten autologe PBMC der Patienten, die jeweils gleichzeitig mit den TIL gefärbt und analysiert wurden (*Abb. 4.15d-i*). Bei diesen Zellen ließen sich die unterschiedlich stark CD56-exprimierenden NK-Zell-Populationen gut unterscheiden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die NK-TIL-Populationen zwar das Muster an IR trugen, das für die peripheren immunregulatorischen $\text{CD56}^{\text{bright}}$ NK-Zellen charakteristisch ist, die Expression von CD56 war dagegen bei der Mehrzahl der NK-TIL-Populationen CD56^{dim} und damit nicht mit dieser peripheren $\text{CD56}^{\text{bright}} \text{KIR}^- \text{CD94/NKG2A}^+$ NK-Population vergleichbar.

ERGEBNISSE

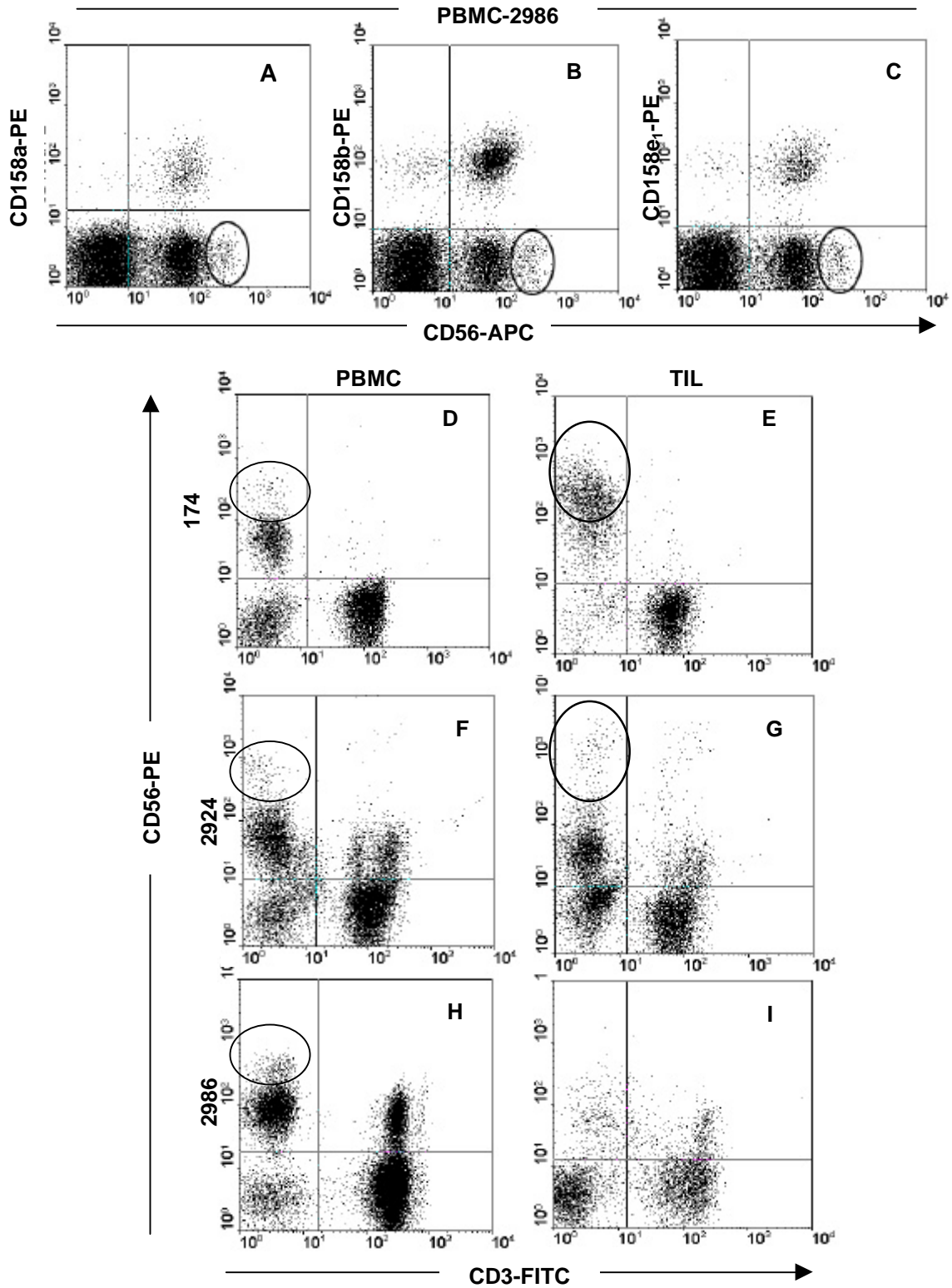


Abbildung 4.15 CD56^{dim} und CD56^{bright} Populationen von PBMC und TIL. Färbung von PBMC-2986 mit Antikörpern gegen CD3, CD56 und 158a (a), CD158b (b) bzw. CD158e₁ (c). Eingekreiste KIR⁻CD56⁺, sowie die KIR⁺CD56⁺ Zellen sind CD3⁻ NK-Zellen (a-c). Färbung von PBMC-174 (d), TIL-174 (e), PBMC-2924 (f), TIL-2924 (g), PBMC-2986 (h) und TIL-2986 (i) mit Antikörpern gegen CD3 und CD56. Gezeigt sind anhand FSC und SSC gewertete Lymphozyten. Die Quadranten wurden entsprechend der jeweiligen Isotypkontrollen gesetzt. Zusammengehörige TIL und PBMC (d-i) wurden jeweils gemeinsam gefärbt und analysiert.

Funktionalität der IR: Inhibierung der NK-Zell-vermittelten Lyse durch HLA-Transfektanten

Die Aktivität von NK-Zellen ist durch eine Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen reguliert. Die Zelllinie K562 trägt keine MHC-Klasse-I-Moleküle und damit keinen der bekannten Liganden für IR auf der Oberfläche. Sie wird aufgrund dieses als „missing self“ [89] bezeichneten Phänotyps von NK-Zellen erkannt und lysiert. Durch die Transfektion einzelner Liganden für IR in diese Zielzellen konnte der Effekt des so vermittelten inhibitorischen Signals über den passenden Rezeptor auf NK-Zellen abgefragt werden. Dabei wurde die Lyse der nicht-transfizierten Ausgangszelllinie K562 mit der Lyse der transfizierten Zelllinien K562-Cw*0304, K562-E und K562-G verglichen. Auf diese Weise konnte die Funktionalität vorhandener IR auf NK-TIL getestet werden. Alle Transfektanten wurden von Frau Prof. E. Weiß und ihren Mitarbeitern hergestellt und für die Untersuchungen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Die HLA-E-Transfektante wurde aus dem HLA-E-positiven K562-Klon B5 [112] hergestellt, indem eine cDNS konstruiert wurde, die für das β_2 -Mikroglobulin-Molekül kodiert an dessen N-Terminus über eine 15 Aminosäuren lange Verbindung das HLA-B7-Signalpeptid (VMAPRTVLL) gekoppelt wurde. Das Signalpeptid dient zur Stabilisation der HLA-E-Expression [112]. Diese Konstruktion ist bereits für ein HLA-A2-Peptid beschrieben worden [181]. Die Zelllinie K562-Cw*0304 wurde durch eine Klonierung der cDNS für das Cw*0304-Allel in einen pcDNA3-Vektor gewonnen, der in K562-Zellen transfiziert wurde. Die K562-G-Transfektante enthält ein Signalpeptid (MTAPRTLFL), das so mutiert wurde, dass es kein stabilisierendes Signalpeptid für HLA-E darstellt. So konnte ausgeschlossen werden, dass zusätzlich die Expression von HLA-E durch stabilisierende Signalpeptide von HLA-G verstärkt wurde. Die erfolgreiche Expression der transfizierten humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Allele wurde durch eine Oberflächenfärbung mit dem panMHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 überprüft. Wie in *Abbildung 4.16* zu sehen ist, waren die verschiedenen Transfektanten MHC-positiv, nicht jedoch die Ausgangszelllinie K562.

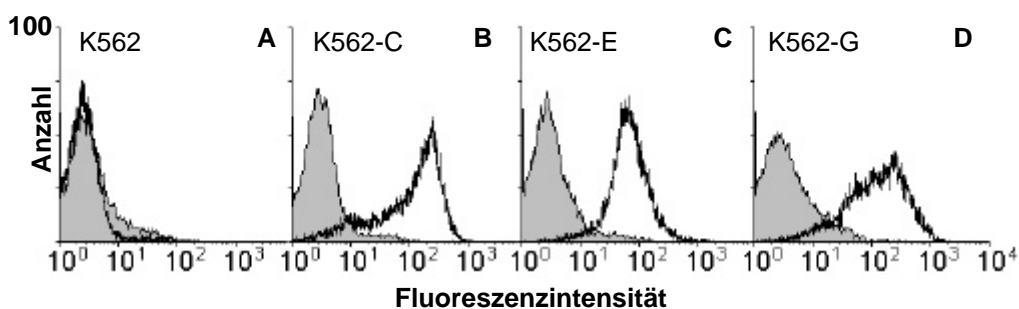


Abbildung 4.16 MHC-Klasse-I-Expression von nicht-transfizierten und HLA-transfizierten Zielzellen. Färbung der Zellen K562 (a), K562-Cw*0304 (b), K562-E (c) und K562-G (d) mit der Isotypkontrolle MOPC21 (grau gefüllte Kurven) und dem MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörper W6/32 (nicht ausgefüllte Kurven).

Die Transfektanten zeigten eine vergleichbar starke HLA-Expression. Kleinere Schwankungen der Expressionsstärke traten innerhalb der Zellen einer Zelllinie, oder auch zwischen den verschiedenen Zelllinien zu verschiedenen Kulturzeitpunkten auf, weshalb die Zellen vor jedem Versuch auf die MHC-Klasse-I-Expression überprüft wurden.

Zur Kontrolle des Versuchsaufbaus wurden PBMC oder separierte periphere NK-Zellen gesunder Spender als Effektorzellen eingesetzt. Die Lyseraten der nicht transfizierten K562-Zellen variierten bei verschiedenen Spendern (*Abb. 4.17*). Diese Differenzen in der zytotoxischen Aktivität konnten wiederum durch heterogene Aktivierungszustände der NK-Zellen im peripheren Blut verschiedener Spender bedingt sein. Zudem wiesen beide Populationen ungleich hohe Prozentsätze an NK-Zellen auf (*a*, PBMC-HP 10 % NK-Zellen und *b*, PBMC-PH 14 % NK-Zellen), was zu den unterschiedlich starken Lyseraten beigetragen haben konnte. Aufgrund unterschiedlicher NK-Aktivitäten war dies nicht bei allen Spendern der Fall (*c*, PBMC-CA 95 % NK-Zellen). Der inhibitorische Effekt der transfizierten HLA-Moleküle konnte deshalb zwar vergleichend zur Lyse der Ausgangszelllinie beurteilt werden, es musste jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Stärke der lytischen Aktivität zwischen den Spendern variierte. Die stärkste Inhibierung der peripheren NK-Zellen wurde jeweils durch die Expression des HLA-E-Moleküls verursacht, wogegen die Inhibierung durch HLA-Cw*0304 und HLA-G weniger ausgeprägt war und sich zwischen den Spendern unterschied. Dies könnte auf einer unterschiedlichen Zusammensetzung der jeweiligen NK-Subpopulationen beruhen [180].

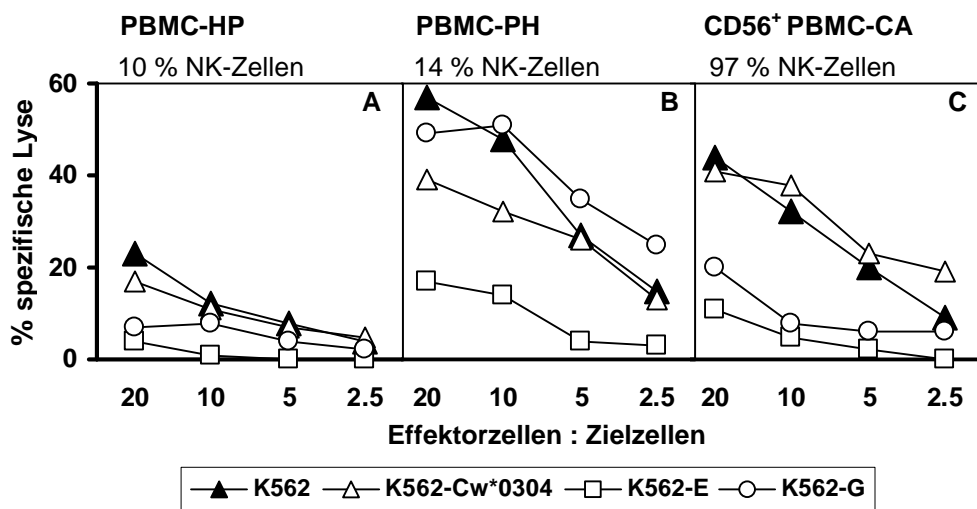


Abbildung 4.17 Inhibierung peripherer NK-Zellen durch HLA-Klasse-Ia und -Ib-Moleküle. Zytotoxizität von PBMC-HP (*a*), PBMC-PH (*b*) und angereicherter peripherer NK-Zellen (CD56⁺ Zellfraktion) des Spenders CA (*c*) gegen K562 und die HLA-Transfektanten K562-Cw*0304, K562-E und K562-G. Angegeben sind die prozentualen Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten. Die Zellen wurden direkt isoliert und über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert.

Ebenso wie PBMC zeigten auch TIL verschiedener Spender eine reduzierte Lyse der HLA-positiven Zielzellen, die wiederum am stärksten durch HLA-E-Moleküle verursacht wurde (Abb. 4.18). Der HLA-E-erkennende Rezeptorkomplex CD94/NKG2A wurde auf entsprechend vielen NK-TIL exprimiert (Tabelle 4.5). TIL-2926 zeigten dagegen trotz der Expression von p58.2 auf 30 % der NK-Zellen keine Abschaltung durch HLA-Cw*0304. Der Rezeptor existiert jedoch auch in Form eines aktivierenden Rezeptors (p50.2), der vom Antikörper GL183 ebenfalls erkannt wird. Von der Zahl der p58.2⁺ Zellen allein konnte deshalb nicht auf die Expression funktioneller IR geschlossen werden. Die funktionellen zytotoxischen Versuche waren hierfür entscheidend. Die TIL-147 zeigten eine Inhibition durch HLA-Cw*0304 sowie durch HLA-G und hatten 8 % p58.2⁺ NK-Zellen. Die separierten NK-TIL-174 zeigten das gleiche Inhibitionsmuster wie die nicht-separierte Population, aber mit einer stark erhöhten Lyserate, die durch die Anreicherung der Effektorzellen verursacht worden war (vgl. b, 40 % NK-TIL und c, 83 % NK-TIL). Dies war nicht durch eine unterschiedlich starke HLA-Expression der Transfektanten verursacht, da beide Zellfraktionen im selben Versuchsansatz verwendet wurden. Generell konnte beobachtet werden, dass in jeder untersuchten NK-Population aus TIL bzw. PBMC die Kapazität zur Inhibition über HLA-E und/oder –C und/oder –G vorhanden war. Der Grad der jeweiligen Inhibition durch diese drei HLA-Allele war unterschiedlich, mindestens eines der Allele besaß jedoch deutliche inhibitorische Funktion. Damit ließ sich erstmals zeigen, dass NK-Zellen nach Infiltration in Tumorgewebe ihre negative Regulation über MHC-Klasse-I-Moleküle beibehalten haben, selbst wenn die individuelle Zusammensetzung der NK-Population verglichen mit peripheren NK-Zellen variierte.

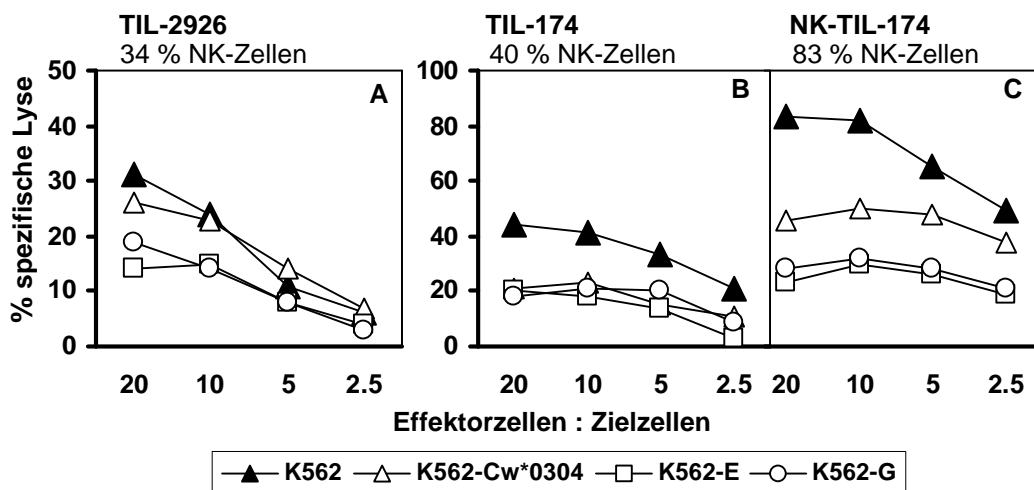


Abbildung 4.18 Inhibition von TIL durch Klasse-Ia und -Ib-Moleküle. Zytotoxizität der nicht-separierten Populationen TIL-2926 (a) und TIL-174 (b) bzw. über CD56 angereicherte NK-TIL-174 (c) gegen K562 und die Transfektanten K562-Cw*0304, K562-E und K562-G. Angegeben sind die prozentualen Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten. TIL wurden direkt isoliert und über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert.

Inhibierung der NK-vermittelten Lyse durch erhöhte MHC-Klasse-I-Expression

Um zu zeigen, dass die Aktivität von NK-Zellen nicht nur durch das Vorhandensein von Liganden für IR, sondern auch von deren Dichte auf der Zelloberfläche abhängt, wurden Zielzellen verwendet, die sich in der Expressionsstärke ihrer HLA-Klasse-I-Moleküle unterschieden. Dies konnte durch die Transfektion der Tumorzelllinie RCC-26 mit der cDNS für IFN- γ erreicht werden, die eine verstärkte Expression von HLA-A, -B, -C und E-Molekülen auf der Zelloberfläche bewirkt [168,182]. *Abbildung 4.19* zeigt die Expressionsstärke der MHC-Klasse-I-Moleküle beider Zelllinien nach Färbung mit dem Antikörper W6/32. Die IFN- γ -produzierenden Zellen RCC-26endo γ 1 wiesen eine erhöhte MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche auf.

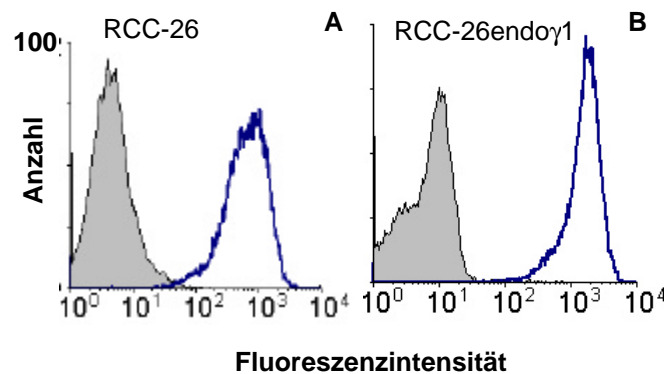


Abbildung 4.19 MHC-Klasse-I-Expression von RCC-26 und RCC-26 endo γ 1. Färbung von RCC-26 (a) und RCC-26endo γ 1 (b) mit der Isotypkontrolle MOPC21 (grau gefüllt Kurven) und dem MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörper W6/32 (nicht ausgefüllte Kurven). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten betragen 11,3 und 810,3 (a) bzw. 14,4 und 1811,8 (b).

Diese verstärkte Expression der MHC-Moleküle führte wie erwartet zu einer Abschaltung der TIL-vermittelten Lyse von Tumorzellen. In *Abbildung 4.20* ist dies am Beispiel der TIL-174 und TIL-2926 gezeigt, die eine um mehr als 50 % reduzierte Lyse der transfizierten Zelllinie aufwiesen. Als Kontrolle ist die Abschaltung peripherer Lymphozyten des gesunden Spenders PH gezeigt, bei denen ebenfalls eine signifikante Reduzierung der Lyse zu beobachten war.

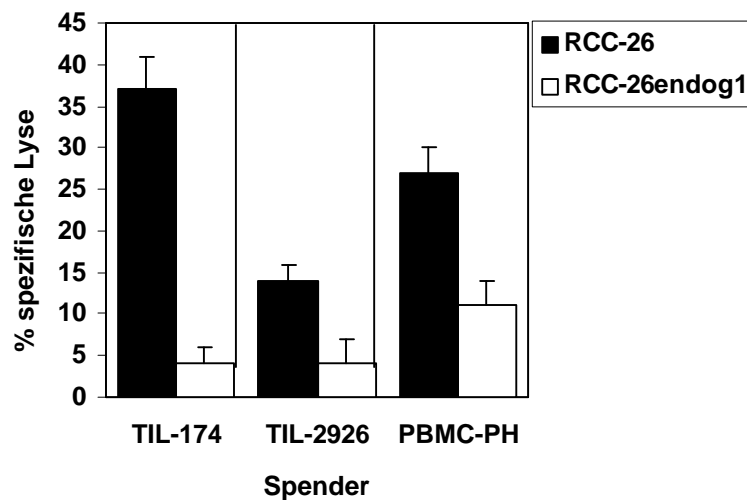


Abbildung 4.20 Inhibierung von TIL durch erhöhte MHC-Klasse-I-Expression auf Tumorzellen. Zytotoxische Aktivität von TIL-174, TIL-2926 und PBMC-PH gegen die allogene Tumorzelllinie RCC-26 und die IFN- γ -Transfektante RCC-26endog1. TIL und PBMC wurden direkt isoliert und über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert. Prozentuale Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten betragen 40 % (TIL-174), 34 % (TIL-2926) bzw. 15 % (PBMC-PH). Gezeigt ist der Prozentsatz spezifischer Lyse bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 20:1.

Diese Versuche belegten, dass die TIL die Tumorzellen aufgrund einer niedrigen MHC-Expression lysieren konnten. Durch die IFN- γ -induzierte verstärkte Expression von MHC-Molekülen auf den Tumorzellen wurde diese Lyse inhibiert. Wäre die Lyse durch spezifische (MHC-restringierte) T-Zellen verursacht worden, würde man dagegen erwarten, dass die RCC-26endog1-Zellen besser erkannt und lysiert werden. Dies wurde beispielsweise für die MHC-restringierten TIL-26 T-Zellen beobachtet [27]. Die Lyse der RCC-26-Tumorzellen wurde demnach durch nicht-MHC-restringierte NK-Zellen verursacht.

4.2.2.2 Expression und Funktionalität aktivierender Rezeptoren

NKp46

Die Expression des aktivierenden Rezeptors NKp46 auf NK-TIL konnte bereits *in situ* anhand der immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden (Abb. 4.3e und f). Entsprechend zu diesen Befunden exprimierten auch direkt isolierte TIL den Rezeptor NKp46. *Abbildung 4.21* zeigt eine repräsentative Oberflächenfärbung von TIL-2936 mit Antikörpern gegen CD3, CD56 und NKp46 und demonstriert, dass alle CD3⁺CD56⁺ NK-TIL den aktivierenden Rezeptor auf der Oberfläche trugen.

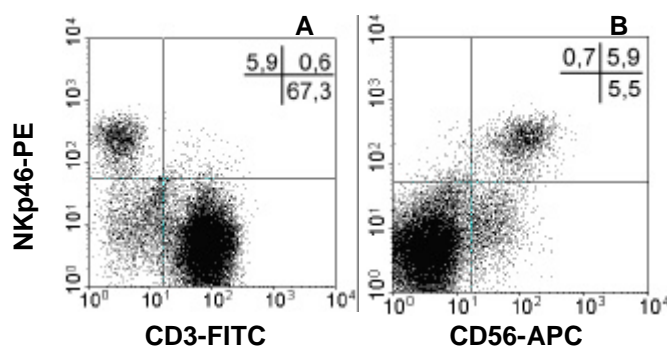


Abbildung 4.21 Expression von NKp46 auf NK-TIL. Simultane Oberflächenfärbung von direkt isolierten nicht kultivierten TIL-2936 mit Antikörpern gegen CD3, CD56 und NKp46. Gezeigt ist die Färbung von NKp46-PE gegen CD3-FITC (a) bzw. gegen CD56-APC (b) auf am FACS-Gerät anhand FSC und SSC gewerteter Lymphozyten. Angegeben sind die prozentualen Anteile der in den jeweiligen Quadranten liegenden Zellen an der Gesamtzahl der gemessenen Lymphozyten. Die Quadranten wurden anhand der jeweiligen Isotypkontrollen gesetzt.

Die Funktionalität dieses Rezeptors wurde durch eine redirigierte Lyse untersucht. Hierfür wurden Zellen der murinen Mastrozytomzelllinie P815 radioaktiv markiert und mit verschiedenen Konzentrationen des anti-NKp46-Antikörpers 45G8 oder einer passenden Isotypkontrolle (MOPC21) beladen und zusammen mit den Effektorzellen in einen Chromfreisetzungstest eingesetzt. Die Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren von P815 einerseits und an NKp46 auf NK-Zellen andererseits imitiert Liganden-Rezeptor-Interaktionen, wodurch ein positives Signal an die NK-Zelle transduziert wird und die Lyse der Zielzelle erfolgt. Als Positivkontrolle dienten periphere PBMC (14 % NK-Zellen) oder separierte NK-Zellen (90 % NK-Zellen) des gesunden Spenders PH. Die Aktivität der NK-Zellen war durch die Konzentration der Antikörper quantitativ regulierbar. Dies bestätigte, dass die Lyse durch den Antikörper und damit durch NKp46 verursacht wurde. Die Zielzellen, die mit der Isotypkontrolle beladen worden waren, wurden nicht lysiert (*Abb. 4.22*). Die NK-vermittelte Lyse beruhte demnach nicht auf einer Erkennung der P815-Zellen *per se*.

ERGEBNISSE

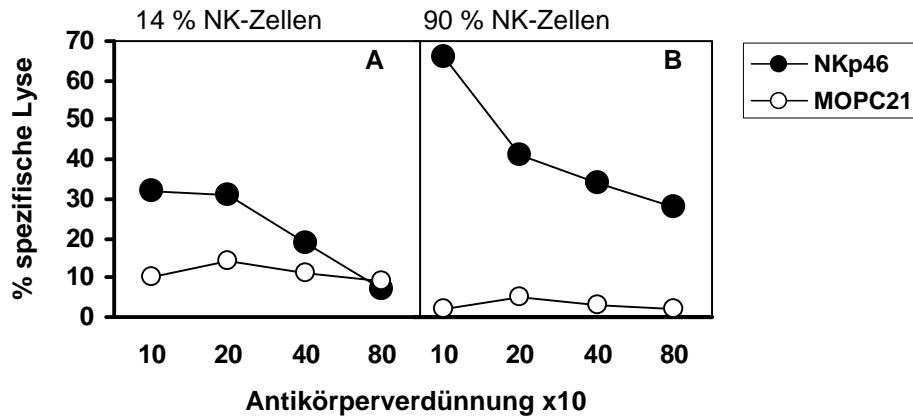


Abbildung 4.22 Redirigierte Lyse über den AR NKp46 durch PBMC eines gesunden Spenders. Zytotoxizität von gemischten PBMC (a) und der CD56⁺ Zellfraktion (b) des gesunden Spenders PH gegen anti-NKp46-beladene bzw. MOPC21-beladene P815-Zellen. Angegeben sind die prozentualen Anteile der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten. Die Zellen wurden direkt isoliert, über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert, über Antikörper gegen CD56 separiert und bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 40:1 eingesetzt. Die Antikörperkonzentration von MOPC21 betrug 20 µg/ml, für den Hybridomüberstand anti-NKp46 war sie nicht bekannt.

Im Gegensatz dazu zeigten direkt isolierte und Zytokin-aktivierte Populationen aus dem Tumorgewebe eine stark beeinträchtigte Zytotoxizität über NKp46. In *Abbildung 4.23* sind die Ergebnisse mehrerer Versuche zusammengefasst. Gemischte TIL-Populationen, die 6 %, 10 % bzw. 38 % NK-Zellen (TIL-2986, TIL-2952 bzw. TIL174) enthielten, zeigten keine Lyse der Zellen. Erst die Anreicherung der NK-Zellen auf 90 % und eine zusätzliche Aktivierung über weitere 24 Stunden mit IL-2 bewirkte eine NKp46-vermittelte Lyse der Zielzellen durch TIL-174. Dies konnte allerdings nicht bei TIL-2936 und TIL-2952 gezeigt werden. Sowohl auf die gleiche Weise angereicherte und kultivierte TIL-2936 (71 % NK-TIL) als auch TIL-2952 (47 % NK-TIL) konnten die Zielzellen nicht lysieren, also nicht über NKp46 aktiviert werden.

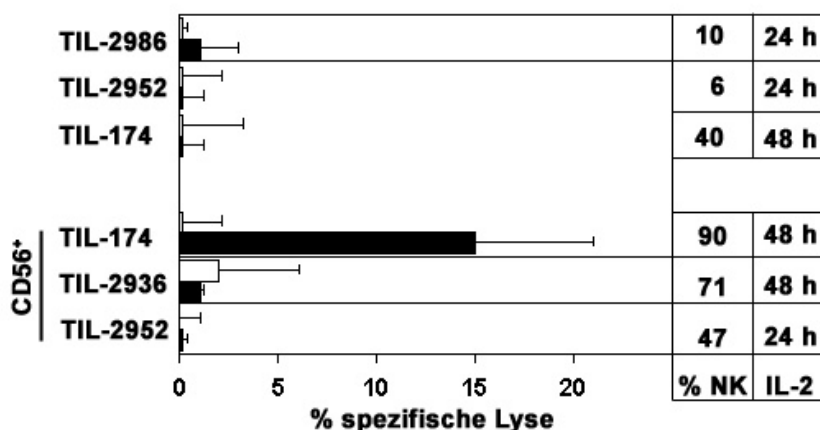


Abbildung 4.23 Redirigierte Lyse über NKp46 durch TIL verschiedener RCC-Patienten. Zytotoxizität von TIL-Fractionen gegen MOPC21-beladene (leere Balken) bzw. NKp46-beladene (ausgefüllte Balken) P815-Zellen. Gezeigt ist der Prozentsatz spezifischer Lyse bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 40:1 und einer Antikörperkonzentration von 200 ng/ml (MOPC21) bzw. einer Verdünnung des Hybridomüberstandes von 1:100 (NKp46). Prozentuale Anteile der NK-Zellen (% NK) beziehen sich auf den Anteil der NK-Zellen an der jeweiligen Gesamtzahl der Lymphozyten. TIL wurden direkt isoliert, für 24 bzw. 48 Stunden mit 20 U/ml IL-2 kultiviert (IL-2) und teilweise über einen Antikörper gegen CD56 separiert. Gezeigt sind Ergebnisse aus vier verschiedenen Versuchen.

ERGEBNISSE

Um auszuschließen, dass Lymphozyten dieser Spender generell keine Aktivierung über NKp46 zeigten, wurden autologe PBMC als Effektorzellen eingesetzt. Sowohl nicht separierte PBMC mit einem Anteil von 18 % NK-Zellen (PBMC-2986), als auch CD56⁺ Zellfraktionen mit mehr als 50-80 % NK-Zellen zeigten eine deutliche Lyse der Zielzellen, selbst wenn keine Aktivierung über IL-2 erfolgt war (PBMC-2989) (Abb. 4.24). Die lytische Aktivität der Zellen verschiedener gesunder Spender und RCC-Patienten war dabei unterschiedlich. Diese Unterschiede der NKp46-vermittelten Aktivierung bei verschiedenen Spendern bestätigten Berichte über den Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von NKp46 und der Stärke der Aktivierung, die bei verschiedenen Spendern genetisch bedingt unterschiedlich sein kann [98]. Verglichen zur Isotypkontrolle war in allen Fällen eine deutliche spezifische Lyse zu beobachten, was bedeutet, dass NKp46 auf NK-Zellen gesunder Spender aktivierende Signale auch ohne IL-2-Induktion vermitteln konnte, während TIL selbst nach Aktivierung mit IL-2 keine bzw. eine stark beeinträchtigte Lyse zeigten.

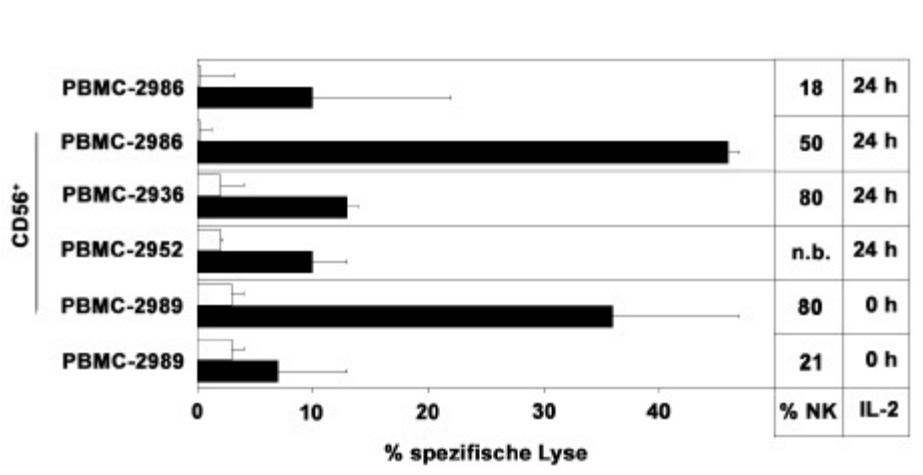


Abbildung 4.24 Redirigierte Lyse über NKp46 durch PBMC verschiedener RCC-Patienten. Zytotoxizität verschiedener PBMC von RCC-Patienten gegen MOPC21-beladene (leere Balken) bzw. NKp46-beladene (ausgefüllte Balken) P815-Zellen. Gezeigt ist der Prozentsatz spezifischer Lyse bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 40:1 und einer Antikörperkonzentration von 200 ng/ml (MOPC21) bzw. einer Verdünnung des Hybridomüberstandes von 1:100 (NKp46). Zellen wurden direkt isoliert, über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert oder nicht (24 h bzw. 0 h IL-2) und teilweise über einen Antikörper gegen CD56 separiert (CD56⁺). Prozentuale Anteile der NK-Zellen (% NK) beziehen sich auf die jeweilige Gesamtzahl der Lymphozyten (n.B. = nicht bekannt). Dargestellt sind Ergebnisse aus vier verschiedenen Versuchen.

Die mangelnde Aktivität der NK-TIL ließ sich also nicht durch einen generellen Defekt sämtlicher peripherer NK-Zellen dieser Spender erklären. Vielmehr bestätigen die Ergebnisse eine spezifische Inaktivität der NK-TIL, wie sie auch bei der Lyse gegen K562 festgestellt wurde.

NKG2D

NKG2D ist ein weiterer aktivierender Rezeptor, der auf allen NK- und CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird. Liganden für diesen Rezeptor sind beispielsweise die stressinduzierten *MHC class I chain related molecules* (MIC)A und MICB, die auch von einigen RCC exprimiert werden [183]. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen, vor allem dann, wenn die Lyse über Nkp46 eingeschränkt ist [97]. Die funktionelle Expression von NKG2D-Molekülen auf NK-TIL sollte deshalb einen weiteren Hinweis auf die Aktivierbarkeit der NK-TIL geben.

Wie *Abbildung 4.25a* zeigt exprimierten nahezu alle NK-TIL verschiedener Patienten den aktivierenden Rezeptor NKG2D, ebenso wie CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Es war jedoch auch über diesen Rezeptor nicht möglich, eine redirigierte Lyse der NK-TIL auszulösen (*Abb. 25b*). Dies konnte sowohl bei gemischten TIL-Populationen als auch bei separierten NK-TIL gezeigt werden. Als Positivkontrolle dienten NK-Zellen des gesunden Spenders PH, die gleichzeitig mit TIL-2936 analysiert wurden.

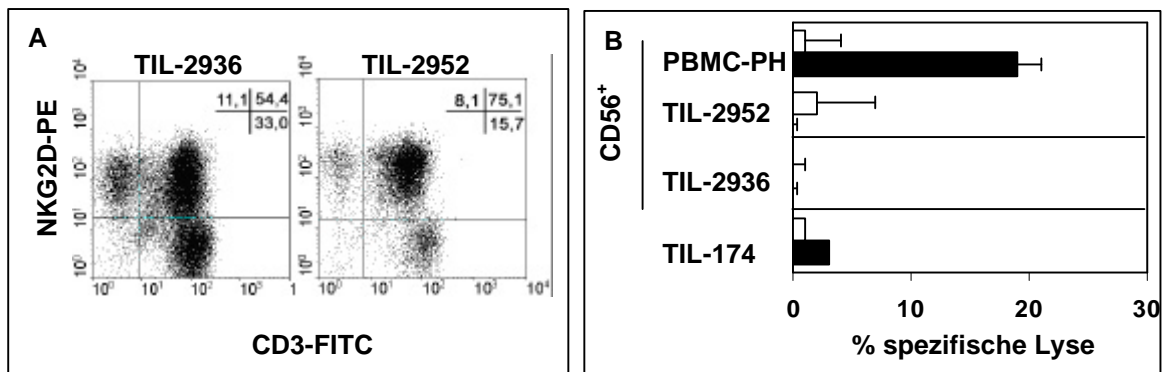


Abbildung 4.25 Expression und Funktionalität von NKG2D auf NK-TIL. *A*: Simultane Oberflächenfärbung von NKG2D, CD3 und CD56 auf zwei verschiedenen TIL-Populationen mit 12 % (TIL-2936) bzw. 9 % (TIL-2952) NK-Zellen. Gezeigt ist die Färbung von CD3-FITC gegen NKG2D-PE auf Lymphozyten. *B*: Redirigierte Lyse durch angereicherte NK-Zellen von PBMC-PH (90 % NK-Zellen), TIL-2952 (50 % NK-Zellen) bzw. TIL-2936 (90 % NK-Zellen) und durch TIL-174 (40 % NK-Zellen) über MOPC21 (leere Balken) bzw. NKG2D (ausgefüllte Balken). Gezeigt ist der Prozentsatz spezifischer Lyse bei einer Antikörperkonzentration von jeweils 200 ng/ml und einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 40:1. Alle Zellen wurden direkt isoliert, über Nacht mit 20 U/ml IL-2 kultiviert und gegebenenfalls über Antikörper gegen CD56 separiert. Dargestellt sind Ergebnisse aus drei verschiedenen Versuchen.

Die NK-TIL waren somit weder über NKG2D noch über NKp46 aktivierbar. Die einzige Ausnahme stellten NK-Zellen des Patienten 174 dar, die eine spezifische Lyse über NKp46 zeigten. In *Tabelle 4.6* sind einige Ergebnisse dieser Versuche zusammengefasst.

Tabelle 4.6 Zytotoxische Aktivität verschiedener TIL.

TIL ¹	NK ²	K562 ³	NKp46 ⁴	NKG2D ⁵
174	40	+	+*	–
2952	6	–	–*	–*
2986	10	–	–	n.u.
2936	12	–	–*	–*

* Als Effektorzellen wurden jeweils CD56⁺ Zellfraktionen eingesetzt.

¹ TIL wurden direkt isoliert und über IL-2 aktiviert.

² Prozentualer Anteil von CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten.

³ Lyse gegen K562 bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 20:1; + steht für > 15 % Lyse, – steht für < 6 % Lyse.

⁴ Redirigierte Lyse über NKp46 bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 40:1; + steht für 18 %, – für < 6 % Lyse.

⁵ Redirigierte Lyse über NKG2D bei einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis von 40:1; – steht für < 5 % spezifische Lyse. n.u.= nicht untersucht.

Wie unter 4.2.1 gezeigt, konnten IL-2-aktivierte TIL die MHC-Klasse-I-negativen K562-Zellen nicht lysieren, wenn der Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL niedrig war, auch wenn die NK-Zellen zuvor angereichert worden waren. Da die Zielzellen keine Liganden für IR hatten und die NK-Zellen somit nicht inhibieren konnten, schien der Defekt in einer fehlenden Aktivierbarkeit der NK-TIL zu liegen. Dies konnte am Beispiel der AR NKp46 und NKG2D bestätigt werden, über die tatsächlich keine Aktivierung der NK-TIL ausgelöst werden konnte. Eine Ausnahme stellten die TIL-174 dar, die einen hohen Anteil an NK-Zellen aufwiesen. Dies war sowohl mit einer Fähigkeit zur Lyse der K562-Zellen assoziiert, sowie mit einer Lyse über den AR NKp46. Die Zytotoxizität über diesen Rezeptor konnte allerdings nur dann ausgelöst werden, wenn die NK-TIL zuvor angereichert und über 48 Stunden mit IL-2 kultiviert worden waren. Somit zeigten auch die NK-TIL dieses Patienten eine verminderte Aktivierbarkeit verglichen mit verschiedenen NK-Zell-Populationen aus peripherem Blut.

CD16

Der Fc γ -Rezeptor III (CD16) dient NK-Zellen für eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Dabei binden Antikörper von opsonierten Partikeln mit ihrem Fc-Teil an CD16 und lösen so eine Quervernetzung der Rezeptoren aus, welche die NK-Zellen über CD3 ζ aktiviert. Eine höhere Dichte von CD16 auf der Oberfläche ist dabei charakteristisch für NK-Zellen mit höherer zytotoxischer Aktivität [128,184]. Periphere NK-Zellen lassen sich dabei in zwei Gruppen unterscheiden: die CD56^{dim}CD16^{hi} und die CD56^{hi} CD16^{-dim} Population (*Abb. 4.26a*). Die Populationen der NK-TIL sollten deshalb in dieser Hinsicht untersucht werden. Die Oberflächenfärbung mit einem Antikörper gegen CD16 zeigte eine sehr heterogene Expression zwischen verschiedenen TIL-Populationen (*4.26b-d*). Während bei TIL-2989 (*b*) und TIL-174 (*c*) 75 bzw. 82 % der NK-Zellen CD16⁺ waren, waren es bei TIL-2936 nur 21 % (*d*). Die Expression von CD16 war bei TIL-174 unabhängig von der CD56-Expression und auf allen positiven Zellen gleich stark. Bei TIL-2936 war die Expression von CD16 sogar mit einer höheren Expression von CD56 assoziiert und entsprach demnach nicht der in peripherem Blut vorliegenden Situation. Bei allen untersuchten TIL-Populationen war die Expression von CD16 jedoch schwächer als bei der Mehrzahl der peripheren NK-Zellen. Eine funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung ist bisher nicht bekannt.

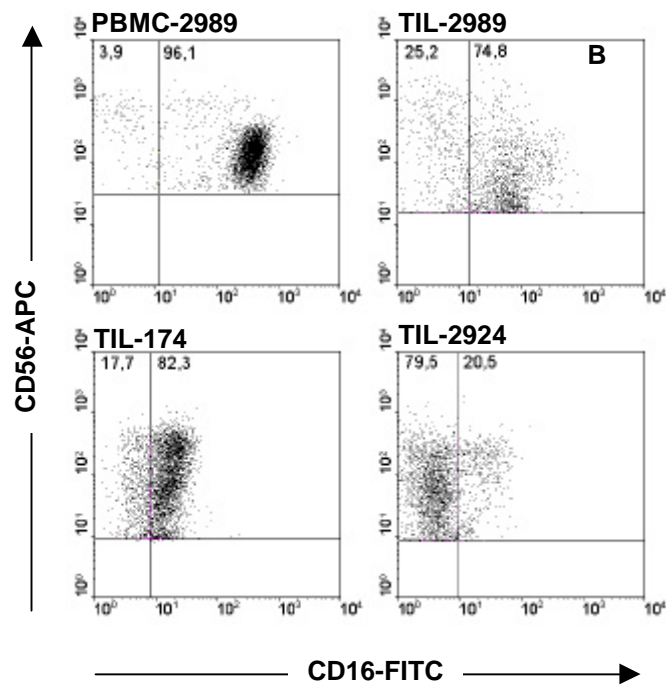


Abbildung 4.26 Expression von CD16 auf TIL und PBMC. Simultane Oberflächenfärbung von CD3, CD16 und CD56 auf PBMC (*a*) und TIL (*b*) des Patienten 2989 sowie auf TIL-174 (*c*) und TIL-2936 (*d*). Zellen wurden direkt isoliert und analysiert. Gezeigt sind CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen. CD3⁺ T-Zellen sind nicht dargestellt. Die Quadranten wurden anhand der jeweiligen Isotypkontrollen gesetzt.

4.2.2.3 Expression verschiedener Adaptermoleküle und Perforin

Die funktionellen Defekte der NK-TIL konnten durch die gezeigten Ergebnisse auf die fehlende Aktivierbarkeit der NK-TIL über einige Rezeptoren zurückgeführt werden, deren Expression auf der Zelloberfläche jedoch gezeigt werden konnte. Als weiterer Schritt wurde die Expression verschiedener Adaptermoleküle für diese Rezeptoren untersucht, die zur Weiterleitung der positiven Signale in NK-Zellen benutzt werden.

DAP10 und DAP12

Die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 dienen NK-Zellen zur intrazellulären Weiterleitung positiver Signale, die zum Beispiel über den AR NKG2D übermittelt werden. Die mangelnde Aktivierbarkeit der NK-TIL könnte durch eine fehlende oder verminderte Expression dieser Moleküle erklärt werden. Weil Antikörper gegen diese Proteine nicht verfügbar sind, aber die genomische Sequenz beider Proteine bekannt ist, konnte die Expression der Moleküle auf Ebene der mRNA untersucht werden. Hierfür wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern für DAP10 und DAP12 durchgeführt. Als Positivkontrollen wurde die Expression des Haushaltsgens GAPDH getestet und PBMC des gesunden Spenders FK eingesetzt. Wie *Abbildung 4.27* zeigt, wiesen sowohl periphere Zellen der Patienten als auch TIL eine zu peripheren NK-Zellen des gesunden Spenders vergleichbar hohe Expression beider Adaptermoleküle auf.

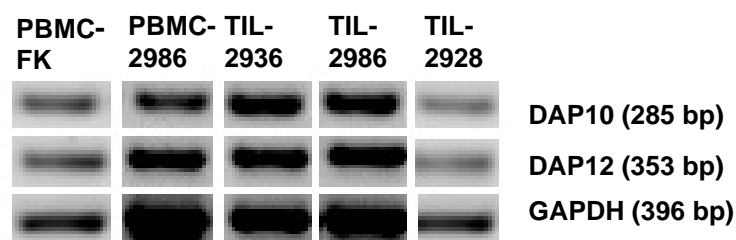


Abbildung 4.27 Expression der Adaptermoleküle DAP10 bzw. DAP12 und des Haushaltsgens GAPDH. Zellen wurden direkt isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Gezeigt sind die Banden nach Auftrennung auf einem 2 %igen Agarosegel. Die jeweiligen Fragmentlängen wurden anhand eines Größenstandards kontrolliert und sind jeweils in Klammern angegeben.

CD3ζ-Kette

Ein weiteres Adaptermolekül ist die ζ-Kette des CD3-Komplexes, die unter anderem zur Weiterleitung des Signals über CD16 und NKp46 dient. Da in einigen Veröffentlichungen eine Herabregulierung der CD3ζ-Kette auf TIL des RCC und anderer Tumoren berichtet wurde [34,35,176], wurde auch hier die Expression dieses Moleküls auf TIL untersucht. Dabei wurden die Zellen auf der Oberfläche mit Antikörpern gegen CD3 und CD56 gefärbt, um die verschiedenen Zellpopulationen unterscheiden zu können, und anschließend permeabilisiert, um die intrazelluläre ζ-Kette zu färben (Abb. 4.28). Alle direkt isolierten CD3⁺CD56⁺ NK-TIL zeigten ebenso wie die CD3⁺ T-Zellen eine deutliche Expression der CD3ζ-Kette. Die CD56^{bright} NK-Subpopulation ist bei peripheren NK-Zellen deutlich abgrenzbar und zeigt eine etwas schwächere Expression der ζ-Kette (a). Interessanterweise konnte diese Assoziation (CD56^{bright} CD3ζ^{dim} bzw. CD56^{dim} CD3ζ^{bright}) auch bei NK-TIL-2928 gefunden werden (e). Die Expression der ζ-Kette auf sämtlichen NK-TIL konnte auch über eine simultane Färbung des AR NKp46 gezeigt werden (f). Die Beobachtung der Expression von CD3ζ auf allen Lymphozyten korrelierte mit den histologischen Untersuchungen, die ebenfalls eine breite Expression der CD3ζ-Kette *in situ* vermuten ließen (Abb. 4.6).

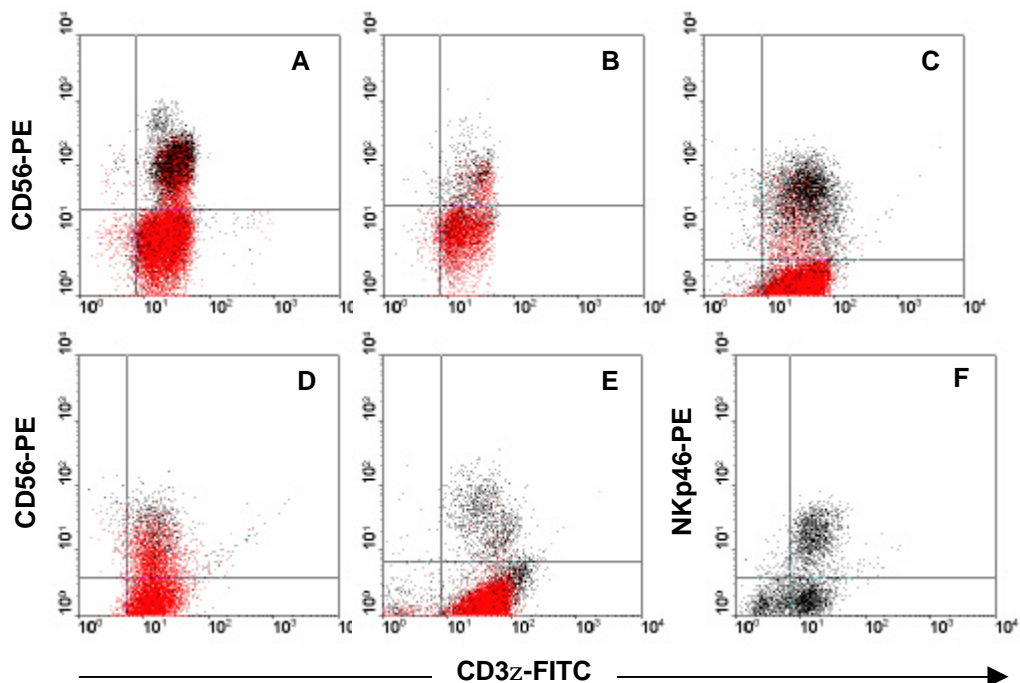


Abbildung 4.28 Expression der CD3ζ-Kette. Färbung von PBMC-2986 (a), TIL-2986 (b), TIL-2936 (c), TIL-2952 (d), TIL-2928 (e) und TIL-174 (f) mit Antikörpern gegen CD3, CD3ζ und CD56 (a-e) bzw. CD56, CD3ζ und NKp46 (f). In a-e sind CD3⁺ T-Zellen rot dargestellt. Gezeigt sind frisch isolierte und nicht kultivierte Lymphozyten. Die Quadranten wurden anhand der jeweiligen Isotypkontrollen gesetzt.

Perforin

Ein weiteres wichtiges Molekül für die Zytolyse durch NK-Zellen ist Perforin, das für die Aufnahme der gleichzeitig ausgeschütteten Granzyme in die Zielzelle benötigt wird, die dann eine Apoptose in den Zielzellen auslösen. Perforin wird von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert. NK-Zellen, die kein Perforin produzieren können, zeigen eine drastisch verminderte bis keine Zytotoxizität [37,38], weshalb die Perforin-Expression auf den isolierten TIL ebenfalls untersucht wurde. Perforin kann nur durch eine intrazelluläre Immunfluoreszenz-Färbung nachgewiesen werden. Um NK-Zellen von T-Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen CD3 und gegen CD56 markiert. Die vorhandene *in situ* Situation konnte am Besten durch die Verwendung frisch isolierter nicht kultivierter PBMC und TIL dargestellt werden. PBMC der gesunden Spender JS und FK dienten als Kontrolle, bei denen alle peripheren NK-Zellen wie erwartet eine deutliche Perforin-Expression zeigten (*Abb. 29a und b*). Sowohl die peripheren NK-Zellen als auch die TIL von RCC-Patienten wiesen ebenfalls eine Expression von Perforin auf, die in ihrer Stärke etwa mit den NK-Zellen der gesunden Spender vergleichbar war (*Abb. 29c-h*). Zwar exprimierten alle NK-Zellen Perforin, insgesamt waren allerdings nur etwa 30-40 % aller Lymphozyten positiv, wie es auch bei den PBMC der Normalspender beobachtet wurde. Dies korrelierte mit den Ergebnissen, die über die immunhistochemischen Färbungen erzielt wurden und bei denen die Zahl der Perforin-positiven Zellen weitaus geringer war als die Anzahl aller Lymphozyten (CD3⁺ und NKp46⁺ Zellen, *Abb. 4.6*).

Zusammenfassend fällt bei der Analyse der Aktivierbarkeit der NK-TIL auf, dass AR wie NKp46 und NKG2D zwar exprimiert wurden, aber trotz vorhandener Adaptermoleküle wie CD3 ζ und DAP10 / DAP12 eine Beeinträchtigung der zytotoxischen Aktivität der NK-TIL zu beobachten war. Da auch das Effektormolekül Perforin vorhanden war, muss der Defekt der NK-TIL an anderer Stelle der Signaltransduktion vermittelt werden.

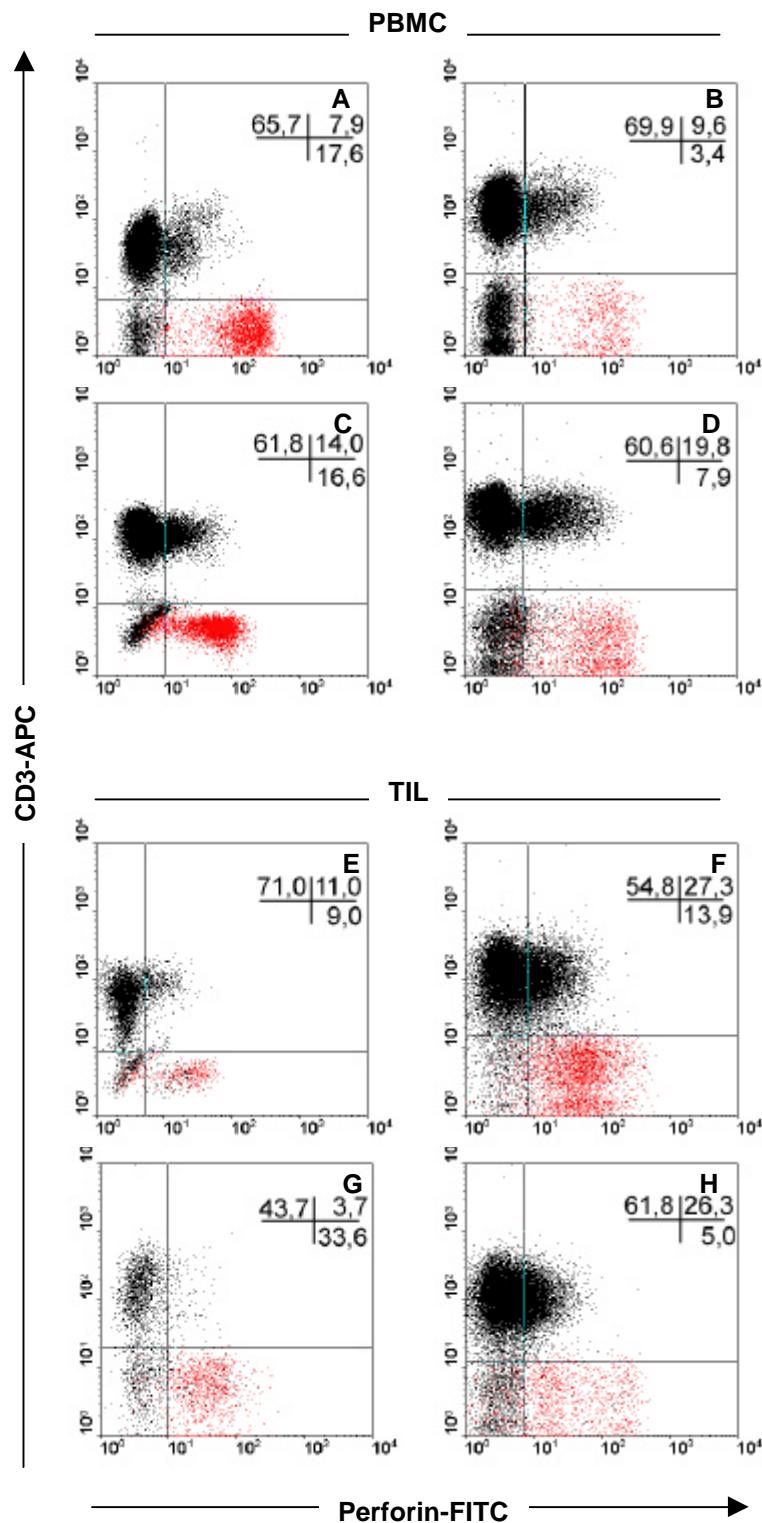


Abbildung 4.29 Perforin-Expression auf PBMC und TIL. Färbung von PBMC-JS (a), PBMC-FK (b), PBMC-2986 (c), PBMC-2036 (d), TIL-2986 (e), TIL-2936 (f), TIL-174 (g) und TIL-2928 (h) mit Antikörpern gegen CD3, Perforin und CD56. CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen sind rot dargestellt. Gezeigt sind direkt isolierte und nicht kultivierte Lymphozyten. Die Quadranten wurden entsprechend der jeweiligen Isotypkontrollen gesetzt. Angegeben sind die prozentualen Anteile der in den jeweiligen Quadranten liegenden Zellen.

4.2.2.4 Zytokinexpression der NK-TIL

IL-10- und IFN-g-Produktion direkt isolierter NK-TIL

Die Zytokinexpression direkt isolierter NK-TIL sollte einen Aufschluss über den Aktivierungszustand der Zellen *in vivo* geben. Dafür wurde die Expression der Zytokine IL-10 und IFN- γ auf Ebene der mRNA mithilfe des LightCycler™-Gerätes gemessen. Das hatte den Vorteil, dass die Zellen nicht kultiviert werden mussten, sondern der *in vivo*-Zustand auf Ebene der mRNA direkt untersucht werden konnte.

Die CD56⁺ Zellfraktion von TIL-2936 (90 % NK-Zellen und 1 % T-Zellen) zeigte eine deutliche Expression des Haushaltsgens Cyclophilin B (CPB) und der Zytokine IL-10 und IFN- γ (Abb. 30a). Eine Analyse der Schmelzkurven bestätigte die Spezifität der Produkte (Abb. 30b).

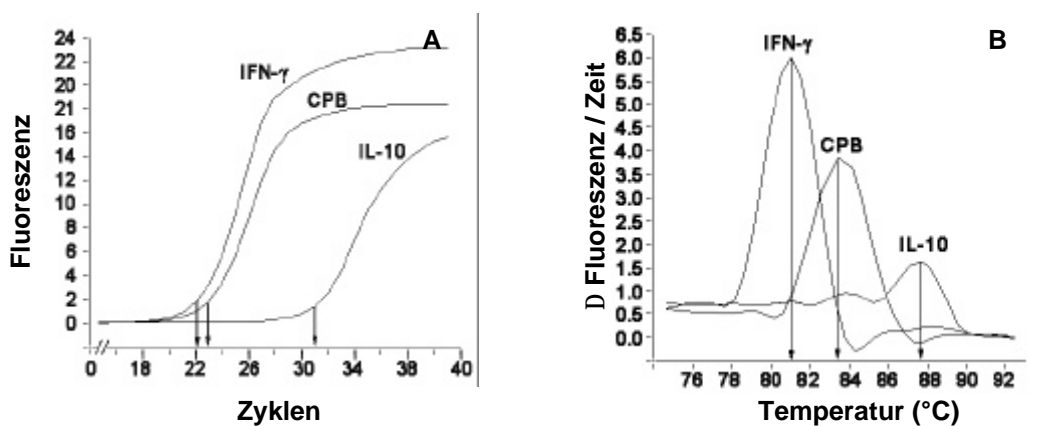


Abbildung 4.30 Quantitative real-time PCR der Produktion von IFN- γ , CPB und IL-10 aus cDNS von TIL-2936. A: Anstieg der Fluoreszenz bei spezifischer Amplifikation der cDNS von IFN- γ , CPB und IL-10, gewonnen aus direkt isolierten und nicht kultivierten TIL-2936. Die von der Software nach dem *Second Derivative Maximum*-Algorithmus errechneten Kreuzungspunkte lagen bei Zyklus 22, 23 und 31. B: Schmelzkurvenanalyse der Proben. Die maximalen Schmelztemperaturen lagen bei 80,8 °C, 83,7 °C und 87,3 °C und entsprachen damit den Werten untersuchter Positivkontrollen (nicht gezeigt).

ERGEBNISSE

Die Auswertung der Probe über einen relativen Vergleich mit autologen PBMC und PBMC der gesunden Spender PH und FK ist in *Tabelle 4.7* dargestellt.

Tabelle 4.7 Zytokinexpression von TIL und PBMC.

Zellen ¹	% ²		Kreuzungspunkt ³				Δ CPB ⁵		
	NK	TZ	CPB	CD2	IFN- γ	IL-10	CD2	IFN- γ	IL-10
Patient-2936									
TIL-2936	90	1	23	24	22	31	1	-1	8
PBMC-2986	50	50	22	22	29	30	0	7	8
Normalspender									
PBMC-PH	90	9	27	27	29	34	0	2	7
PBMC-FK	90	3	25	27	32	34	2	7	9

¹ TIL und PBMC wurden frisch isoliert und in CD56⁺ Zellfraktionen separiert.

² Prozentualer Anteil der jeweiligen Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten.

NK = CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen, TZ = CD3⁺ T-Zellen.

³ Von der Software über den *Second derivative Maximum*-Algorithmus automatisch errechneter Zyklus am ersten Wendepunkt der Fluoreszenzkurve (Kreuzungspunkt).

⁵ Differenz zwischen den jeweiligen Kreuzungspunkten zum jeweiligen Kreuzungspunkt von CPB (in Zyklen).

Die Kreuzungspunkte für das Haushaltsgen CPB lagen bei den verschiedenen Zellfraktionen bei unterschiedlichen Zyklen, so dass in den Proben wahrscheinlich unterschiedliche Mengen an RNS vorhanden waren. Die Werte für IFN- γ und IL-10 konnten deshalb nicht direkt untereinander verglichen werden, sondern mussten mit der jeweiligen Expression von CPB in Relation gesetzt werden. Die Differenz zwischen den jeweiligen Werten (Δ CPB) ergibt dann ein vergleichbares Maß für die Expression verschiedener Gene. Höhere positive Werte für Δ CPB bedeuten einen größeren Unterschied in der Expression und eine um $2^{\Delta\text{CPB}}$ geringere Expression des Gens im Vergleich zu CPB. Negative Werte stehen für eine $2^{\Delta\text{CPB}}$ höhere Expression des Gens im Vergleich zu CPB. Die Zulässigkeit dieser Rechenmethode kann am Beispiel der CD2-Expression erörtert werden. Sowohl die Expression von CD2 als auch diejenige von CPB wird von Lymphozyten wenig reguliert. Das Verhältnis zwischen der Expression beider Proteine (Δ CPB/CD2) sollte sich deshalb zwischen verschiedenen Lymphozytenpopulationen nicht wesentlich unterscheiden. Dies war bei den hier untersuchten Proben der Fall.

Sowohl die Expression von IFN- γ als auch von IL10 unterschied sich nicht signifikant zwischen TIL und PBMC von gesunden Spendern und RCC-Patienten, sondern lag innerhalb der zum Teil großen Schwankungsbreite, die bei PBMC gesunder Spender beobachtet wurde. Auffällig war jedoch, dass die IFN- γ -Produktion von TIL-2936 im Verhältnis zur Expression von IL-10 sehr hoch lag.

Produktion verschiedener Zytokine nach Kurzzeitstimulation mit IL-2

Wie bereits in *Abbildung 4.12* dargestellt wurde, konnten TIL einiger Patienten trotz Stimulation mit IL-2 und Anreicherung der NK-Zellen die MHC-Klasse-I-negative Zelllinie K562 nicht lysieren. Um die NK-TIL näher zu charakterisieren, wurde deren Zytokin-freisetzung während der Kultivierung mit IL-2 gemessen und mit derjenigen von peripheren NK-Zellen gesunder Spender verglichen. Im gezeigten Experiment wurden die NK-TIL-2936 mit PBMC des gesunden Spenders PH verglichen. Dazu wurde der Zellkulturüberstand stimulierter Zellen am Bio-Plex™-Gerät simultan auf das Vorhandensein sieben verschiedener Zytokine getestet. In *Abbildung 4.31* ist gezeigt, dass weder periphere NK-Zellen des gesunden Spenders PH noch die NK-TIL-2936 nach Kultivierung mit IL-2 die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ sezernierten. Die Analyse der Expression von IFN- γ und IL-13 ist aufgrund der hohen Werte im Medium kritisch zu betrachten. Einige Versuche haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Humanserum im Zellkulturmedium unspezifische Färbungen verursachen kann. Allerdings zeigten die NK-TIL eine deutlich höhere Produktion der Zytokine IL-10 und TNF- α als die peripheren NK-Zellen. Die Expression von IL-10 musste durch die Kultivierung der NK-TIL induziert worden sein, da bereits gezeigt wurde, dass die direkt isolierten NK-TIL-2936 keine unterschiedliche Expression zu den PBMC-PH aufwiesen (*Tabelle 4.7*). Die IL-10-Expression der frisch isolierten Zellen wurde allerdings nicht auf Ebene der Proteine sondern auf Ebene der mRNA gemessen, so dass die Unterschiede zwischen beiden Versuchen auch darauf zurückgeführt werden könnten, dass die NK-TIL bereits ohne Aktivierung über IL-2 eine verstärkte Expression von IL-10 zeigten, die auf Ebene der mRNA allerdings nicht nachweisbar war. Die Expression der Zytokine IL-10 und TNF- α ist charakteristisch für die CD56^{bright}CD16^{dim}-Population peripherer NK-Zellen [128]. Wie in *Abbildung 4.26d* gezeigt wurde, war die Mehrzahl der NK-TIL allerdings nicht CD56^{bright}CD16^{dim} und war deshalb nicht eindeutig mit diesen Zellen vergleichbar.

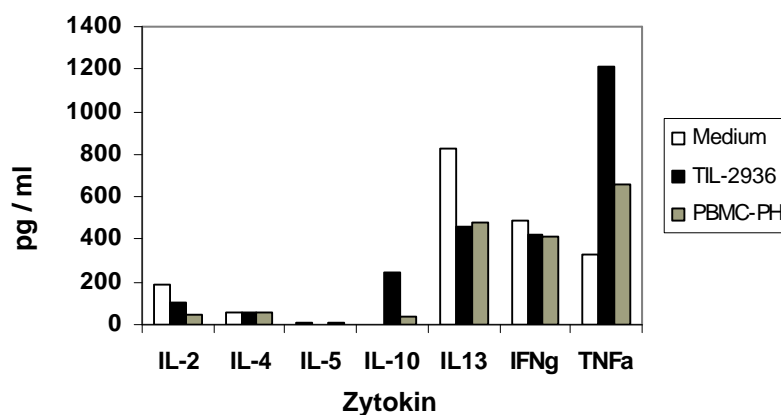


Abbildung 4.31 Zytokinexpression der NK-Zellen nach Stimulation mit IL-2. Simultane Messung verschiedener Zytokine im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit 20 U/ml IL-2 für 24 Stunden. Messung und Auswertung am Bioplex™-Gerät.

4.2.3 Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen

4.2.3.1 Phänotyp infiltrierender T-Zellpopulationen

Aus *Tabelle 4.2* und den histologischen Befunden (*Abb. 4.3*) wurde ersichtlich, dass die Mehrzahl der infiltrierenden T-Zellen zur Gruppe der zytotoxischen (CD8⁺) T-Zellen zählte. Die CD4⁺ Zellen stellten dagegen stets die Minderheit in den TIL-Populationen dar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Prozentsatz dieser Zellen den hochaffinen IL-2-Rezeptor CD25 trug, der unter anderem als Aktivierungsmarker für T-Zellen gilt (*Tabelle 4.2*). In *Abbildung 4.32* ist gezeigt, dass CD69, ein weiterer Aktivierungsmarker für Lymphozyten, der von peripheren T-Zellen kaum exprimiert wird, auf mehr als der Hälfte der infiltrierenden T-Zellen des Patienten 2986 vorhanden war. Dies deutet darauf hin, dass sich zumindest einige T-Zellen im Tumorgewebe in einem aktivierten Zustand befanden. Das fortschreitende Wachstum der Tumoren trotz Anwesenheit großer T-Zellinfiltrate lässt jedoch vermuten, dass auch die T-Zellen wie die NK-Zellen im Tumor eine verminderte Zytotoxizität aufweisen.

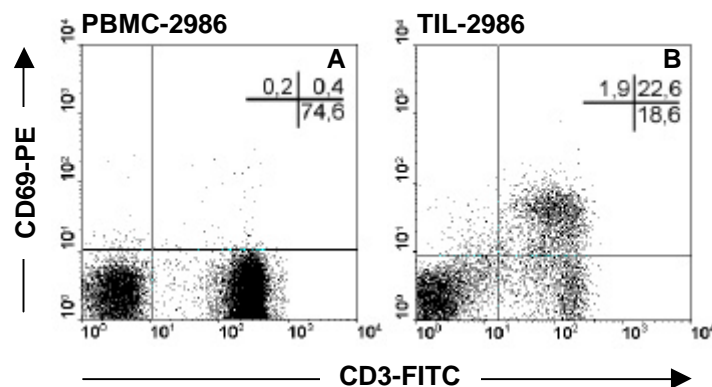


Abbildung 4.32 Expression von CD69 auf T-Zellen. Oberflächenfärbung von CD69 und CD3 auf PBMC (a) und TIL (b) des Patienten 2986. Die Zellen wurden direkt isoliert und analysiert. Gezeigt sind die anhand FSC und SSC gewerteten Lymphozyten. Die Quadranten wurden entsprechend der jeweiligen Isotypkontrollen gesetzt. Angegeben sind die prozentualen Anteile der in den jeweiligen Quadranten liegenden Zellen.

Für die Weiterleitung positiver Signale über den T-Zell-Rezeptorkomplex ist die Expression der CD3 ζ -Kette notwendig. Wie in *Abbildung 4.28* zu sehen war, wiesen sämtliche T-Zellen (rot) die intrazelluläre CD3 ζ -Kette auf. Auch die bereits beschriebenen histologischen Daten bestätigten diese Beobachtung (*Abb. 4.6*). Um weiterhin eine Ursache für die scheinbar funktionelle Inaktivität der T-Zellen im Tumor zu finden, wurde die Expression des Effektormoleküls Perforin auf T-Zellen analysiert. Ein gewisser Prozentsatz der CD3⁺ T-Zellen zeigte hierbei eine deutliche Expression von Perforin-Molekülen im Inneren der Zelle (*Abb. 4.29*).

Die Auswertung der Ergebnisse für die Population der T-Zellen ist im folgenden tabellarisch dargestellt (*Tabelle 4.8*).

Tabelle 4.8 Perforin-Expression auf T-Zellen.

Zellen ¹	CD3 ⁺ ²	
	CD8 ⁺	Perforin ⁺
Normalspender		
PBMC-JS	29	11 (38)
PBMC-FK	41	12 (29)
RCC-Patienten		
PBMC-2952	20	6 (30)
PBMC-2986	34	19 (56)
PBMC-2936	33	25 (76)
TIL-2952	81	9 (11)
TIL-2986	76	13 (17)
TIL-2936	61	33 (54)
TIL-174	54	8 (15)
TIL-2928	72	30 (42)

¹ TIL und PBMC wurden direkt isoliert und analysiert.

² Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der CD3⁺ T-Zellen bzw. der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (in Klammern).

Die PBMC von zwei gesunden Spendern und drei RCC-Patienten zeigten, dass der Anteil der Perforin-positiven Zellen zwischen 6 und 25 % an der Gesamtzahl der T-Zellen bzw. zwischen 29 und 76 % an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen schwankte. Die höchsten Prozentsätze Perforin-positiver T-Zellen waren bei zwei der Patienten-PBMC zu finden.

Die Anzahl der Perforin-positiven Zellen kann vom jeweiligen Aktivierungszustand der Zellen im peripheren Blut des jeweiligen Spenders abhängen und zum Beispiel auch bei einer aktuellen Immunantwort gegen Virusinfektionen erhöht sein. Zudem ist das Vorkommen von Perforin in einer Zelle immer nur eine „Momentaufnahme“ des aktuellen Zustands; eine kürzlich aktivierte zytotoxische Zelle könnte das Perforin auch gerade ausgeschüttet haben. Es war auffällig, dass drei von fünf TIL-Populationen sehr wenig Perforin-positiv T-Zellen aufwiesen. Die anderen beiden Populationen unterschieden sich dagegen nicht von der Kontrollgruppe. Für eine gesicherte statistische Auswertung dieser Ergebnisse war die Anzahl der analysierten Spender in den jeweiligen Fallgruppen (gesunde Spender bzw. RCC-Patienten) allerdings zu gering. Es kann deshalb lediglich ausgesagt werden, dass die TIL keinen generellen Defekt in der Expression von Perforin aufwiesen.

4.2.3.2 Zytokinexpression

Expression von IL-10 und IFN- γ auf Ebene der mRNA

Nach Kurzzeitkultivierung der TIL in Anwesenheit von IL-2 und folgender positiver Separation der NK-Zellen über Antikörper gegen CD56 konnte die CD56⁻ TIL-Population zur weiteren Charakterisierung verwendet werden. Die Expression der Zytokine IL-10 und IFN- γ sollte einen Aufschluss darüber geben, inwiefern die TIL zum Zytokinmilieu im Tumor beitragen und ob eher eine inflammatorische (IFN- γ) oder anti-inflammatorische (IL-10) Antwort vorlag. Als Vergleichspopulation wurden direkt isolierte PBMC von Tumorpatienten und gesunden Spendern verwendet. Nach Isolierung der mRNA und reverser Transkription wurde die cDNA mit spezifischen Primern quantitativ auf die Expression von CD2, IFN- γ , IL-10 und CPB untersucht. Die Auswertung der Proben ist in *Tabelle 4.8* zusammengefasst.

Tabelle 4.8 Expression von IFN- γ und IL-10 durch CD56⁻ TIL und PBMC-Populationen.

Zellen	n ¹	Zyklenzahl ²		
		Δ CPB/CD2	Δ IFN- γ /CPB	Δ IL-10/CPB
PBMC-GS ³	2	1,55 (-0,34/+0,34)	7,95 (-0,45/+0,45)	8,71 (-0,78/+0,78)
PBMC-RCC ⁴	4	2,73 (-1,15/+0,55)	8,01 (-0,91/+0,78)	5,02 (-1,90/+1,59)
TIL ⁵	4	1,14 (-0,76/+0,99)	5,36 (-1,80/+3,80)	2,98 (-2,58/+4,69)

¹ Anzahl der untersuchten Zellpopulationen.

² Differenz der Zyklen zwischen den errechneten Kreuzungspunkten für CPB und dem jeweiligen Amplifikat (Mittelwert) und maximale Abweichungen vom berechneten Mittelwert (in Klammern).

³ Direkt isolierte CD56⁻ PBMC gesunder Spender; Separation über Antikörper gegen CD56.

⁴ Direkt isolierte CD56⁻ PBMC von RCC-Patienten; Separation über Antikörper gegen CD56.

⁵ Direkt isolierte und über Nacht in 20 U/ml IL-2 kultivierte CD56⁻ TIL verschiedener Spender; Separation über Antikörper gegen CD56.

Die PBMC gesunder Spender zeigten untereinander eine sehr geringe Schwankungsbreite in der Expression von CD2, IFN- γ und IL-10. Dies bestätigte auch die Zuverlässigkeit der angewendeten Methode. Überraschenderweise zeigten die PBMC der Patienten eine CD2-Expression, die sich sowohl untereinander als auch vergleichend zu den PBMC gesunder Spender sehr stark unterschied. Die Expression von CD2 war im Verhältnis zu CPB bei drei PBMC-Populationen der RCC-Patienten deutlich geringer als bei der Kontrollgruppe. Demnach musste der Anteil der Lymphozyten innerhalb dieser PBMC geringer gewesen sein. Bei den phänotypischen Untersuchungen (FACS) konnte jedoch keine Auffälligkeit festgestellt werden (nicht gezeigt). Schmielau *et al.* [185] haben berichtet, dass in PBMC von Patienten mit Pankreas-, Brust- und Kolonkarzinom eine Gruppe aktivierter Granulozyten zu finden war, die bei gesunden Spendern nicht

gefunden werden konnte. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten jedoch nicht zeigen, dass diese Zellpopulation auch innerhalb der PBMC von RCC-Patienten zu finden ist (nicht gezeigt). Deshalb konnte nicht geklärt werden, um welche zusätzliche Zellpopulation es sich bei den hier untersuchten Patienten-PBMC handelte.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die IL-10-Produktion gerechnet auf die Gesamtzellzahl (Δ IL-10/CPB) bei den Patienten-PBMC erhöht war. Welcher Zelltyp für die Produktion des IL-10 verantwortlich war, konnte durch diese Untersuchungen nicht geklärt werden. Die Mittelwerte verglichen mit PBMC gesunder Spender unterschieden sich um etwa 3 Zyklen, so dass lediglich ausgesagt werden kann, dass die PBMC der RCC-Patienten im Mittel etwa achtmal mehr (2^3), mindestens jedoch viermal mehr IL-10 produzierten als die Kontrollgruppe.

Die Untersuchung der TIL-Populationen ergab eine stark schwankende Expression von IFN- γ , die zum Teil etwa der peripheren Situation entsprach, aber auch bis zu 16-mal (vier Zyklen) höher lag. Die TIL waren somit in der Lage mehr IFN- γ zu produzieren als periphere Lymphozytenpopulationen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Anteil der CD8⁺ T-Zellen, die eine wesentliche Quelle für die Produktion von IFN- γ darstellen, innerhalb der TIL-Populationen wesentlich höher lag als bei allen PBMC, so dass eine stärkere Produktion von IFN- γ durch die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen erklärt werden kann. Die Kultivierung der Zellen mit 20 U/ml IL-2 hatte keinen Einfluss auf die Expression von IFN- γ (nicht gezeigt).

Die Expression von IL-10 durch TIL war ebenfalls höher als bei peripheren Zellen gesunder Spender und selbst höher als bei den PBMC der Patienten.

Zusammenfassend zeigten die TIL sowohl die Produktion des inflammatorischen Zytokins IFN- γ , als auch des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Um eine Vorstellung des erzeugten Milieus zu bekommen, kann ein Vergleich mit der peripheren Situation herangezogen werden. Während periphere CD56⁻ Lymphozytenpopulationen gesunder Spender im Verhältnis zu CPB etwa gleiche Mengen an IFN- γ und IL-10 produzierten, zeigten die RCC-Patienten bei infiltrierenden Lymphozyten eine um bis zu 32-fach erhöhte Expression von IL-10 im Verhältnis zur Expression von IFN- γ , so dass ein eher anti-inflammatorisch wirkendes Zytokinmilieu im Tumor vermutet werden kann.

4.2.3.3 Regulatorische T-Zellen

Das Vorkommen von T_{reg}-Zellen innerhalb der TIL-Populationen könnte erklären, weshalb die relativ hohe Anzahl infiltrierender Lymphozyten keine effektive Lyse der Tumorzellen bewirken kann. Die Markerkombination CD3⁺CD4⁺CD25⁺ ist für die eindeutige Identifizierung von T_{reg}-Zellen nicht geeignet, da sie auch von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Durch das Vorkommen von Zellen mit diesem Phänotyp im Tumor (*Tabelle 4.2*) schien die Anwesenheit von T_{reg}-Zellen allerdings jedenfalls möglich. Auch die relativ hohe Expression von IL-10 (*Tabelle 4.7*), das von vielen regulatorisch wirkenden Zellen produziert wird und zudem die Entstehung solcher Zellen begünstigt, schien auf die Anwesenheit von T_{reg}-Zellen hinzuweisen. Da die Zellzahlen direkt isolierter Lymphozyten in keinem Fall ausreichten, um diese Zellen anzureichern und in einem funktionellem Assay zu untersuchen, wurden weitere phänotypische Merkmale untersucht.

Expression von CD103 auf TIL

Vor kurzem wurde veröffentlicht, dass das Integrin CD103 auf einer sehr effektiven Population von T_{reg}-Zellen exprimiert wird [177]. Wie bereits beschrieben, waren CD103⁺ Zellen *in situ* im Tumorgewebe vorhanden, allerdings konnte nicht geklärt werden, um welche Zellen es sich hierbei handelte (4.1.4). Direkt isolierte TIL wurden deshalb ebenfalls auf die Expression von CD103 auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen überprüft. In *Abbildung 4.33* sind repräsentative Färbungen von TIL und autologen PBMC der Patienten 2952 und 174 gezeigt. Während nur ein sehr kleiner Prozentsatz der peripheren T-Zellen das CD103-Molekül trug, zeigte die Mehrheit der TIL eine deutliche Expression von CD103. Auch alle weiteren untersuchten TIL wiesen überraschenderweise ebenfalls eine eindeutige Positivität mit CD103 auf. Der Anteil der CD103⁺ Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen schwankte bei den unterschiedlichen Populationen und betrug zwischen 10 und 90 %. Auffallend war jedoch, dass jeweils ein kleinerer Teil der CD4⁺ T-Zellen das Integrin trug, wohingegen die meisten CD8⁺ T-Zellen positiv waren (nicht gezeigt). Wie ebenfalls in *Abbildung 4.33* zu sehen ist, war zudem ein hoher Prozentsatz an CD3⁻CD103⁺ Zellen zu finden. Durch Färbungen mit CD56 und NKp46 konnte bestätigt werden, dass es sich hierbei um CD103⁺NK-Zellen handelte (nicht gezeigt).

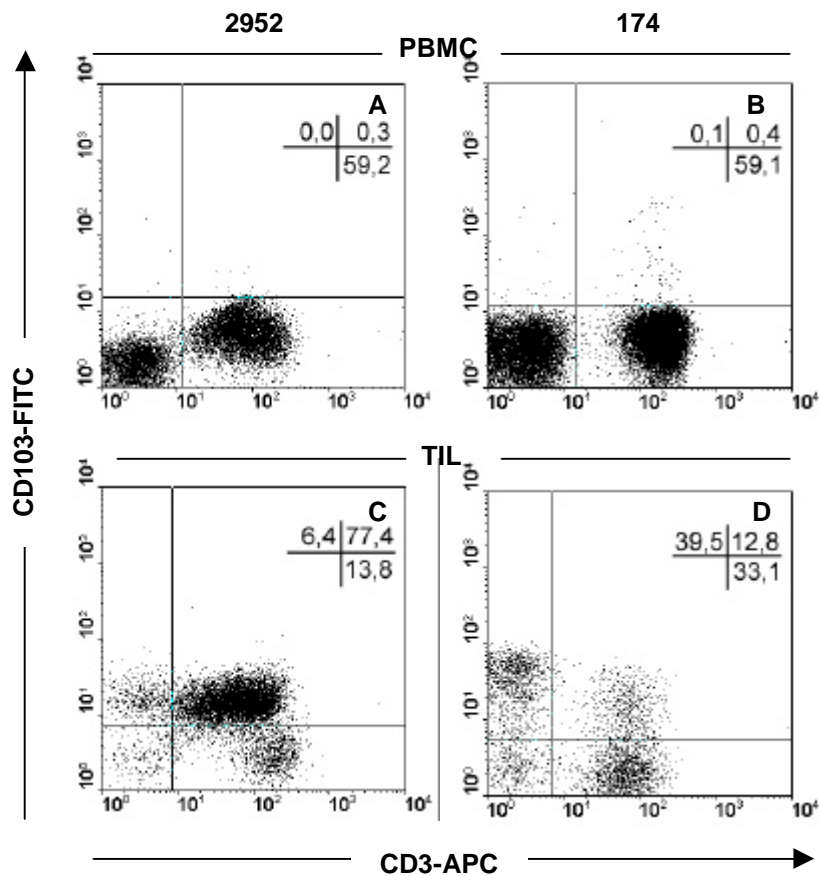


Abbildung 4.33 Expression von CD103 auf PBMC und TIL. Färbung von PBMC-2952 (a), PBMC-174 (b), TIL-2952 (c) und TIL-174 (d) mit Antikörpern gegen CD103 und CD3. Die Zellen wurden direkt isoliert und analysiert. Gezeigt sind am FACS-Gerät anhand FCS und SSC gewertete Lymphozyten. Die Quadranten wurden anhand der jeweiligen Isotypkontrollen gesetzt. Angegeben sind die prozentualen Anteile der in den jeweiligen Quadranten liegenden Zellen.

Die Expression von CD103 auf TIL des RCC ist bisher nicht beschrieben worden. Eine regulatorische Funktion von CD103⁺ Zellen ist nur für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beschrieben, nicht jedoch für NK-Zellen [177,186]. Die Expression von CD103 auf diesen verschiedenen Lymphozytenpopulationen machte es deshalb unwahrscheinlich, dass dieses Molekül innerhalb der TIL einen Marker für regulatorische Zellen darstellen könnte, schloss das Vorkommen dieser Zellen jedoch nicht aus. Diese Umstände machten eine weitergehende molekulare Charakterisierung der TIL notwendig.

Expression von Foxp3 auf der RNS-Ebene

Es ist beschrieben worden, dass die Expression von Foxp3 (*forkhead/winged helix transcription factor*, Scurfin) der Gruppe regulatorischer T-Zellen vorbehalten ist und eine Schlüsselrolle für die Aktivität von T_{reg}-Zellen spielt [187]. Die Expression von Foxp3 auf TIL wurde deshalb auf Ebene der mRNA durch eine quantitative RT-PCR überprüft. Als Vergleichspopulationen wurden frisch isolierte PBMC von gesunden Spendern und von RCC-Patienten verwendet, als Negativkontrolle dienten periphere NK-Zellen verschiedener gesunder Spender. Wie *Tabelle 4.9* zeigt, wurde Foxp3 von den PBMC der gesunden Spender und der RCC-Patienten in gleicher Höhe exprimiert. Die Werte wurden mit der Expression von CD2 in Relation gesetzt, um vergleichen zu können, wie sich die Foxp3-Expression auf die Zahl der Lymphozyten in einer Population verhält. NK-Zellen zeigten keine Expression von Foxp3 und bestätigten so die Zuverlässigkeit der Methode. Gerechnet auf die Zahl der Lymphozyten war die Expression von Foxp3 innerhalb der TIL gleich stark wie innerhalb der peripheren Populationen. Demzufolge schienen im Tumor nicht mehr T_{reg}-Zellen vorhanden gewesen zu sein als in einer peripheren Lymphozyten-Population. Diese Untersuchungen bestätigten jedoch erstmalig die Anwesenheit von infiltrierenden T_{reg}-Zellen in den TIL dieser Patienten.

Tabelle 4.9 Expression von Foxp3 in TIL und PBMC.

Zellen	n ¹	Δ Foxp3 / CD2 ²
NK-GS ³	6	– ⁴
PBMC-GS ⁵	3	5,89 (-0,23/+0,20)
PBMC-RCC ⁶	4	5,55 (-1,23/+0,48)
TIL ⁷	4	5,04 (-0,93/+1,61)

¹ Anzahl der untersuchten Populationen pro Gruppe.

² Differenz zwischen den Kreuzungspunkten von Foxp3 und CD2 (Mittelwert der untersuchten Populationen) und maximale Abweichungen vom Mittelwert (in Klammern).

³ Direkt isolierte periphere CD56⁺ NK-Zellen gesunder Spender; Separation über Antikörper gegen CD56.

⁴ Es konnte kein Anstieg der Fluoreszenz, also keine Expression von Foxp3 beobachtet werden.

⁵ Direkt isolierte CD56⁻ PBMC gesunder Spender; Separation über Antikörper gegen CD56.

⁶ Direkt isolierte CD56⁻ PBMC von RCC-Patienten; Separation über Antikörper gegen CD56.

⁷ Direkt isolierte und über Nacht mit 20 U/ml kultivierte CD56⁻ TIL; Separation über Antikörper gegen CD56. Die Kultivierung mit IL-2 hatte keinen Einfluss auf die Expression von Foxp3 bei CD56⁻ PBMC (nicht gezeigt).

Einfluss von TIL auf die Zytotoxizität autologer peripherer NK-Zellen

Ein weiterer Hinweis auf die Anwesenheit regulatorischer Zellen innerhalb der TIL wird aus *Abbildung 4.23* ersichtlich. Es konnte gezeigt werden, dass die NK-TIL-174 nur dann eine zytotoxische Aktivität über einen aktivierenden Rezeptor ausführten, wenn sie von der restlichen TIL-Population separiert wurden. Es schien demnach, als ob die NK-TIL von anderen infiltrierenden Lymphozyten supprimiert worden wären. Falls innerhalb der TIL eine regulatorische (supprimierende) Population vorhanden war, sollte diese nicht nur die Lyse infiltrierender Lymphozyten, sondern auch die Lyse peripherer Lymphozyten inhibieren können. Zudem legten Untersuchungen einer kürzlich veröffentlichten Arbeit nahe, dass regulatorisch wirkende Zellen auch die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen supprimieren könnten [127]. Um dies zu überprüfen, wurde die zytotoxische Aktivität peripherer NK-Zellen des RCC-Patienten 2986 in Anwesenheit von autologen TIL getestet. Als Kontrolle wurden autologe NK-depletierte PBMC verwendet, die anstelle der TIL zu den Effektorzellen gemischt wurden und keine Inhibition der Lyse vermitteln sollten. Die Population der verwendeten TIL enthielt 52 % CD103⁺ T-Zellen. Sämtliche CD103⁺ Zellen waren CD8⁺ T-Zellen. Der Anteil der CD103⁺ Zellen betrug 68 % an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen. Der Anteil der NK-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten betrug 6 %. Auf Ebene der mRNA wurde ermittelt, dass die gemischte TIL-Population 16-mal mehr IL-10 als IFN- γ produzierte; dies zeigten relative Vergleiche zur Expression von CPB und CD2 (nicht gezeigt). Die quantitative Expression von Foxp3 entsprach der Expression peripherer Lymphozyten (nicht gezeigt). Zudem wiesen innerhalb der TIL etwa 35 % der CD4⁺ T-Zellen das CD25-Molekül auf der Zelloberfläche auf (*Tabelle 4.2*). Die TIL-2986 entsprachen somit einer Population, die mehrere Eigenschaften von T_{reg}-Zellen vereinigte. Die Ergebnisse des Versuchs sind in *Abbildung 4.34* gezeigt. Die zytotoxische Aktivität peripherer NK-Zellen wurde durch die Anwesenheit der TIL nicht beeinflusst, da die NK-Zellen in Anwesenheit von TIL eine unverminderte Lyse der K562-Zellen, eine gleich starke Abschaltung durch HLA-E-Moleküle und eine unverminderte Lyse über den aktivierenden Rezeptor NKp46 zeigten. Diese Versuche konnten also keinen Einfluss von TIL auf die Lyse autologer NK-Zellen zeigen. Allerdings wurden die Zellen nur für die Dauer des Chromfreisetzungsvorganges (vier Stunden) miteinander kultiviert. Es wäre denkbar, dass diese Zeit nicht ausreichend war, um eine Suppression durch TIL zu ermöglichen. Eine längere Koinkubation beider Populationen gestaltete sich schwierig, da die Kulturbedingungen so gewählt werden mussten, dass ein eventuell vorhandener supprimierender Effekt der TIL nicht aufgehoben, die Effektorfunktion der NK-Zellen aber aufrecht erhalten werden sollte.

ERGEBNISSE

Eine Kultivierung beider Populationen ohne die Zugabe von IL-2 führte zu einer Abschaltung der NK-Zellen auch ohne die Anwesenheit autologer TIL (nicht gezeigt) und eignete sich deshalb ebenfalls nicht zur Untersuchung supprimierender Effekte der TIL.

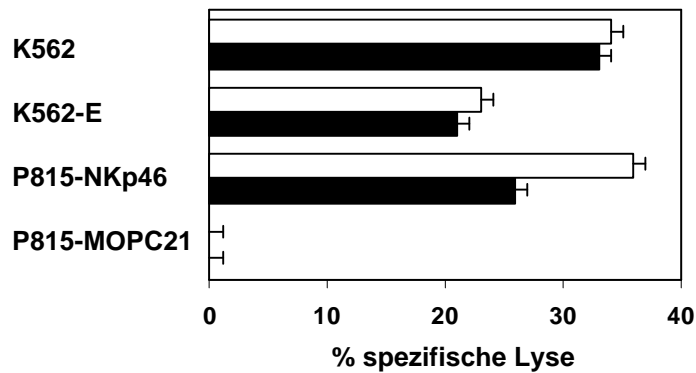


Abbildung 4.34 Lyse peripherer NK-Zellen in Anwesenheit autologer TIL. Zytotoxizität von NK-Zellen des Patienten 2986 in Anwesenheit von autologen TIL (leere Balken) oder autologen CD56⁻ PBMC als Kontrolle (ausgefüllte Balken). TIL und PBMC wurden direkt isoliert und über Nacht mit IL-2 aktiviert. Anschließend wurden die NK-Zellen über Antikörper gegen CD56 angereichert. Die Populationen wurden unmittelbar vor dem Chromfreisetzungstest zu gleichen Teilen untereinander gemischt. Gezeigt ist der Prozentsatz spezifischer Lyse bei einem Effektor (NK-Zell)-zu-Zielzellverhältnis von 20:1 (K562 und K562-E) bzw. von 40:1 (P815).

5. Diskussion

5.1 Gewebeproben

Für die Charakterisierung der TIL wurden ausschließlich solche Tumoren untersucht, die pathologisch als Nierentumoren vom klarzelligen Typ klassifiziert worden waren. So konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede zwischen den TIL-Populationen auf Unterschieden zwischen verschiedenen Tumortypen beruhten. Dies erschien auch deshalb sinnvoll, weil der klarzellige Typ des Nierenzellkarzinoms auf mehr als 70 % aller RCC zutrifft und aus immunologischer Sicht bisher am ausführlichsten charakterisiert worden ist.

5.2 Lymphozyteninfiltrat *in situ*

Die Untersuchung des Lymphozyteninfiltrates mittels immunhistochemischer Färbungen war notwendig um die *in situ* vorkommenden Begebenheiten zu charakterisieren. Sie sollte vor allem zur Beschreibung der infiltrierenden Zellpopulationen und als Kontrolle für die Beurteilung der isolierten Lymphozytenpopulationen dienen. Durch die Verwendung des G250-Antikörpers, der ein Nierenzellkarzinom-assoziiertes Antigen erkennt [173], konnte bestätigt werden, dass die vom Pathologen makroskopisch beurteilten und ausgewählten Tumorgewebeproben tatsächlich Teile klarzelliger RCC-Gewebe darstellten, da 16 von 17 Tumorgewebeproben positive Färbungen zeigten. Die einzige Ausnahme stellte das Gewebe des Patienten 2818 dar, das keine Färbung aufwies, aber ansonsten die typischen morphologischen Eigenschaften eines Tumorgewebes zeigte. Es ist bereits beschrieben worden, dass auch einzelne klarzellige Nierenzellkarzinome auftreten, die dieses Antigen nicht exprimieren [174]. Die Gewebeproben aus dem unveränderten Parenchym der Niere waren stets ungefärbt und wiesen die charakteristischen Strukturen eines unveränderten Nierengewebes auf. Sie dienten somit zur Überprüfung der Situation in Normalnierenparenchym. Allerdings muss stets berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um Parenchym einer Tumor-tragenden Niere handelte, die eventuell andere Eigenschaften besitzt als eine vollkommen gesunde Niere. Die Analyse der infiltrierenden T-Zellpopulationen bestätigte die bereits mehrfach veröffentlichte Beobachtung, dass die Nierenzellkarzinome im Gegensatz zu normalen Nierengewebeproben eine mäßige bis starke Infiltration von T-Zellen zeigen [19,22,25]. Die T-Zellen waren homogen innerhalb des Tumorgewebes verteilt und nicht auf das intervenierende oder Tumor-umgebende Stroma begrenzt, so dass sich die Zusammensetzung der TIL an verschiedenen Stellen innerhalb des Gewebes nicht zu unterscheiden schien. Diese Beobachtung wurde bereits bei anderen Tumortypen

beschrieben [188,189]. Die Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen konnte eine deutliche Überzahl der CD8⁺ Zellen gegenüber der CD4⁺ T-Zellen bestätigen, wie sie auch anderweitig meist beschrieben worden ist [25,26]. Diese Diskrepanz zu peripheren Lymphozytenpopulationen, bei denen in der Regel etwa doppelt so viele CD4⁺ wie CD8⁺ T-Zellen auftreten, konnte im Parenchym der unveränderten Niere nicht gefunden werden. Hier waren etwa gleich viele CD4⁺ wie CD8⁺ Zellen vorhanden. Allerdings tragen auch NK-Zellen das CD8-Molekül auf der Zelloberfläche, so dass nicht eindeutig geklärt werden konnte ob es sich bei allen CD8⁺ Zellen tatsächlich um T-Zellen handelte. Dies wurde nur dann angenommen, wenn eine Kolokalisation mit CD3⁺ T-Zellen im vorangegangenen Serienschnitt vorlag. Eine immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD3 und CD8 könnte einen Aufschluss darüber geben, welche der CD8⁺ Zellen tatsächlich T-Zellen sind. Allerdings ist eine solche Doppelfärbung nur anhand von Fluoreszenz-markierten Antikörpern möglich, da diese Farbstoffe eine eindeutige Messung und Quantifizierung verschiedener Farbanteile über eine spektrale Auswertung erlauben. Die Beurteilung von immunenzymatischen Doppelfärbungen, also von enzymatisch entwickelten Farbniederschlägen, erwies sich als sehr schwierig. Sowohl CD3- als auch CD8-Moleküle sind in der Membran verankert, so dass bei Kolokalisation beider Moleküle Mischfarben als schmale Ringe um die Zellen entstanden, die oftmals schwer von den jeweiligen Einzelfärbungen unterschieden werden konnten (nicht gezeigt). Das Vorkommen der einzelnen T-Zell-Subpopulationen im Tumorgewebe konnte deshalb nur anhand der isolierten TIL eindeutig geklärt werden. Aus den bereits genannten Gründen gestaltete sich in der Vergangenheit auch die Analyse der infiltrierenden NK-Zellen als schwierig. Bis vor kurzem war kein Marker bekannt, der spezifisch von jeder humanen NK-Zelle exprimiert wird, so dass diese meist als CD3⁻CD56⁺ Zellen definiert wurden. Dies erlaubte keinen eindeutigen Nachweis über eine einfache (einfarbige) Immunhistochemie, da auch einige T-Zellpopulationen CD56⁺ sind. In vielen Untersuchungen wurde deshalb die Anzahl der NK-Zellen über statistische Auswertungen zwischen CD3⁺ und CD56⁺ Zellen oder zusätzlicher Marker berechnet. In der vorliegenden Arbeit war auch diese Methode nicht anwendbar, da der verwendete Antikörper gegen CD56 in einigen Fällen unspezifische Färbungen sämtlicher Tumorzellen verursachte. Allerdings konnte eine Methode entwickelt werden, über die der vor kurzem beschriebene NK-Zell-spezifische Rezeptor NKp46 eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dies ermöglichte erstmals die eindeutige Identifizierung von infiltrierenden NK-Zellen über eine einfache immunhistochemische Färbung. Auf diese Weise konnte in Tumorgewebeproben einiger Patienten eine erhebliche Anzahl infiltrierender NK-Zellen festgestellt werden, die zum Teil die Anzahl infiltrierender T-Zellen deutlich überstieg.

Die Population der infiltrierenden NK-Zellen innerhalb der isolierten Lymphozyten wurde im folgenden ausführlicher charakterisiert, da diese auch körpereigene Zellen erkennen können, die wie viele Tumorzellen durch eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen charakterisiert sind. Aufgrund dieser Eigenschaft sollten sie eine wichtige Effektorpopulation bei der Eliminierung von Tumorzellen darstellen.

Neben der Identifizierung der T- und NK-Zell-Populationen im Gewebe konnten auch infiltrierende Makrophagen und Granulozyten aufgefunden werden. Auch die Anwesenheit dendritischer Zellen ist bereits beschrieben worden [23,24]. Somit waren sowohl wesentliche Zellpopulationen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität im Tumorgewebe vorhanden, so dass die Ineffektivität des Immunsystems bei der Abwehr des Tumors nicht darauf zurückgeführt werden kann, dass bestimmte Zellen nicht in der Lage waren das Gewebe zu infiltrieren.

Weitere immunhistochemische Färbungen sollten nun zusätzlich phänotypische Merkmale der TIL charakterisieren. So wurde zum einen die Expression der CD3 ζ -Kette überprüft. Diese ist für die Weiterleitung aktivierender Signale verantwortlich, die beispielsweise über den T-Zell-Rezeptorkomplex auf T-Zellen oder den aktivierenden Rezeptor NKp46 auf NK-Zellen übermittelt werden. Bereits vor einiger Zeit ist gezeigt worden, dass dieses sogenannte Adaptermolekül von TIL einiger RCC nicht exprimiert wird [34,35], womit eine funktionelle Inaktivität der TIL erklärt werden könnte. Innerhalb der hier verwendeten Gewebeproben konnte allerdings eine eindeutige Expression dieses Proteins festgestellt werden. Die Zahl der positiven Zellen entsprach in etwa der Zahl der T- und NK-Zellen, so dass davon ausgegangen wurde, dass die ζ -Kette von der Mehrzahl beider Lymphozytenpopulationen exprimiert wurde. Anhand der Färbungen konnte allerdings keine Aussage über die quantitative Expression dieses Moleküls auf den einzelnen Zellen getroffen werden. Ein kompletter Verlust der ζ -Kette auf Lymphozyten konnte somit ausgeschlossen werden, so dass die Abwesenheit dieses Proteins nicht für eine Inaktivität der TIL verantwortlich sein konnte.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einer funktionellen Inaktivierung der TIL beitragen könnte, wäre eine reduzierte Expression der Perforin-Moleküle, welche für die zytotoxischen Effektorfunktionen von NK- und T-Zellen benötigt werden. Sie werden an der Kontaktstelle zur Zielzelle freigesetzt und sind neben weiteren Molekülen für den Vorgang der Lyse der Zielzelle verantwortlich. Anhand Perforin-defizienter Mäuse wurde demonstriert, dass diese Proteine eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von Tumorzellen spielen und ihre Abwesenheit das Wachstum des Tumors beschleunigen kann [39,40]. Die Expression dieses Proteins im RCC wurde aus diesem Grund ebenfalls analysiert. Anhand immunhistochemischer Färbungen konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings keine eindeutige Aussage über die Expression

der Perforin-Moleküle getroffen werden. Zwar wurden in allen Tumorgeweben positive Zellen gefunden, allerdings war die Intensität der Färbung teilweise so gering, dass die Bewertung der Zellen schwer fiel. Im Vergleich zur Anzahl der zytotoxischen CD8⁺ T- und NK-Zellen waren jedoch auffällig wenige positive Zellen vorhanden. Eindeutigere Ergebnisse konnten anschließend über Fluoreszenzfärbungen an isolierten TIL erzielt werden und werden an jener Stelle ausführlich diskutiert.

Das Vorhandensein einer Population regulatorisch wirkender Zellen im Tumorgewebe könnte ebenfalls eine entscheidende Ursache für eine funktionelle Inaktivität der Lymphozyten darstellen. Meist bewirken diese Zellen eine Herabregulierung der Immunantwort, da sie die Proliferation oder auch zytotoxische Eigenschaften von aktivierten Lymphozyten auf verschiedene Weise supprimieren können. Die eindeutige Identifizierung regulatorischer Zellen über immunhistochemische Färbungen war bisher nicht möglich, da keine Oberflächenmarker für diese Population beschrieben worden waren, die eine Unterscheidung von anderen Lymphozyten ermöglichten. Allerdings wurde vor kurzem von Lehmann *et al.* veröffentlicht, dass eine Population regulatorischer T-Zellen der Maus durch die Expression des Integrins $\alpha_E(\text{CD}103)\beta_7$ charakterisiert ist, das nur auf einer sehr kleinen Population peripherer Lymphozyten exprimiert wird [177]. Der Nachweis dieses Proteins stellte somit eine neue Möglichkeit dar die Anwesenheit regulatorischer Zellen innerhalb der TIL *in situ* zu prüfen. Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen CD103 zeigten in der hier vorliegenden Arbeit die Färbung zahlreicher Lymphozyten in Tumorgeweben einiger Patienten, wohingegen in einigen anderen Tumorgeweben kaum positive Zellen gefunden werden konnten. Dieses Ergebnis kann nicht eindeutig beurteilt werden. Die Expression des Integrins wurde bisher vor allem auf infiltrierenden Lymphozyten des Gastrointestinaltraktes gefunden, aber auch einige Lymphozyten der Haut, der Blase, der Bauchspeicheldrüse und anderer Gewebe exprimieren dieses Protein [190,190-192]. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass das Integrin für die Wanderung von Lymphozyten in verschiedene Gewebe notwendig ist, so dass es bisher als Rezeptor für die Infiltration in verschiedene Gewebe eingestuft wurde [190,193]. Allerdings können humane CD8⁺CD103⁺ T-Zellen auch tatsächlich regulatorische Eigenschaften aufweisen, wenn sie von autologen epithelialen Zellen stimuliert wurden [186], was demnach auch bei Tumorzellen zutreffen könnte. Dieses Phänomen wurde allerdings bei Lymphozyten aus dem Magen-Darm-Trakt gezeigt, in dem die Entwicklung einer Toleranz des Immunsystems eine ausnehmende Rolle spielt, da die Fremd-Antigene aus der Nahrung keine Immunantwort auslösen dürfen. Im Nierenzellgewebe wurden CD8⁺CD103⁺ T-Zellen dagegen eher mit allospezifischen Reaktionen in Zusammenhang gebracht, die bei entzündlichen Erkrankungen der Niere und Transplantatabstoßungen auftraten und somit

vielmehr inflammatorische als immunsupprimierende Aktivitäten zeigten [194]. Gleiches wurde auch von solchen Lymphozyten berichtet, die bei einer Entzündung der Bauchspeicheldrüse in das Gewebe infiltrieren [192]. Im Mausmodell konnte allerdings wiederum gezeigt werden, dass der Verlust der CD103-Expression verschiedene autoimmune Reaktionen verursacht [195], so dass ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der CD103-Expression und dem Verlust regulatorischer Zellen hergestellt werden kann. Falls die Lymphozyten das Integrin CD103 benötigen, um epitheliale Gewebe infiltrieren zu können, sollte das jeweilige Gewebe den Liganden für das Integrin exprimieren. Liganden für CD103 sind die E-Cadherin-Moleküle, die eine Rolle bei Interaktionen zwischen einzelnen Zellen spielen [196]. Interessanterweise wurde der Verlust der E-Cadherin-Expression bei verschiedenen Tumoren wie dem Prostatakarzinom [197], dem Blasenkarzinom [191] und auch dem Nierenzellkarzinom [178] mit weiter fortgeschrittenen Tumorstadien oder der Entstehung von Metastasen [198] in Verbindung gebracht. Die E-Cadherin-Moleküle stellen durch homophile Interaktionen einen Kontakt zwischen den Zellen her, so dass ein Verlust der Bindungen eine Lockerung des Zellverbandes bewirkt und die Dissemination der Tumorzellen begünstigt. Anhand immunhistochemischer Färbungen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass einige RCC eine schwache bis mäßige Expression von E-Cadherin zeigten, während andere RCC negativ blieben. Dies entsprach in etwa den veröffentlichten Daten, die berichten, dass etwa 20-30 % der RCC E-Cadherin-positiv sind [178,191,199,200]. Die Bedeutung der unterschiedlichen E-Cadherin-Expression im RCC ist bisher ungeklärt. Unverändertes Nierenparenchym zeigte eine deutliche Färbung der distalen Tubuli. Klarzellige Nierenzellkarzinome entstehen allerdings aus den E-Cadherin-negativen proximalen Tubuli und sollten daher eigentlich keine Färbung aufweisen [201,202]. Zudem ist die Expression von E-Cadherin für die Ausbreitung des Tumors eher hinderlich. Somit wäre denkbar, dass die Expression von E-Cadherin auf dem RCC zu einem bestimmten Zeitpunkt spezifisch induziert wird, um auf diese Weise CD103⁺ Zellen anzulocken, die regulatorische Eigenschaften besitzen und dem Tumor helfen können einer inflammatorischen Antwort des Immunsystems zu entgehen. Entsprechend wurden in E-Cadherin-positiven Geweben auch CD103⁺ Lymphozyten gefunden, die in aufeinanderfolgenden Serienschnitten eine Kolo-kalisation mit T-Zellen zeigten. In E-Cadherin-negativen Geweben wurden keine CD103⁺ Lymphozyten gefunden. Aufgrund der kontroversen Veröffentlichungen über die Funktion CD103⁺ T-Zellen mussten allerdings zusätzlich funktionelle Untersuchungen an isolierten TIL durchgeführt werden um zu untersuchen, ob es sich bei den hier gefunden CD103⁺ TIL tatsächlich um eine Population regulatorisch wirkender T-Zellen handeln könnte.

5.3 Lymphozyteninfiltrat *ex vivo*

5.3.1 Isolierung der TIL

In der Vergangenheit lag das Interesse bei funktionellen Untersuchungen von TIL vor allem auf der Suche nach Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Zellen, die möglicherweise für eine Immuntherapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom eingesetzt werden könnten oder für die Identifizierung Tumor-assoziiertes Peptide nützlich sein würden. Einige dieser Zellen sind bereits beschrieben worden. Sie wurden jeweils durch die Langzeitkultivierung verschiedener TIL-Populationen isoliert [27-29]. Diese Methode erlaubte jedoch keine Aussage mehr über funktionelle Eigenschaften der TIL *in situ*. Ein Vergleich zwischen langzeitkultivierten und direkt isolierten TIL konnte in der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich sowohl die Populationen als auch die funktionellen Eigenschaften der TIL durch Kultivierung erheblich verändern. Während über 14 Tage mit IL-2 (10 U/ml) kultivierte TIL meist eine Mehrzahl an CD4⁺ T-Zellen aufwiesen, waren in direkt isolierten TIL-Populationen stets vorwiegend CD8⁺ T-Zellen zu finden. Letzteres korrelierte mit den histologischen Befunden und entsprach damit der tatsächlich vorliegenden Situation *in situ*. Um zu zeigen, dass diese Differenzen nicht auf Unterschieden zwischen verschiedenen Tumoren beruhten, sondern Kultivierungsartefakte darstellten, wurde die TIL-Population eines Patienten sowohl direkt isoliert als auch über 14 Tage kultiviert. So konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung nicht nur eine Verschiebung der T-Zell-Subpopulationen verursachte, sondern auch zu einer erheblichen Unterschätzung des Anteils der NK-Zellen im Tumor beitrug. Da dem Kulturmedium IL-2 zugegeben werden musste um das Überleben der Zellen zu sichern, hatten speziell CD4⁺ T-Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen.

Zudem veränderte sich die Expression einiger Oberflächenmarker der Lymphozyten, so dass eine phänotypische Charakterisierung der TIL *in situ* nach Langzeitkultivierung nicht mehr möglich war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die TIL *in situ* in einem inaktiven Zustand vorlagen. Sie waren nicht in der Lage verschiedene MHC-Klasse-I-negative Zielzellen zu lysieren, wenn sie direkt aus dem Gewebe isoliert wurden. Dieser Zustand wurde durch die Kultivierung der TIL in IL-2-haltigem Medium aufgehoben, da die über 14 Tage kultivierten TIL stets zytotoxische Aktivitäten zeigten. Die Kultivierung der Gewebestückchen mit IL-2 ließ somit ebenfalls keine Beurteilung der funktionellen Eigenschaften der TIL *in situ* zu.

Ein entscheidender Nachteil der direkten Isolierungsmethode stellte allerdings die oftmals sehr geringe Zellausbeute dar. Von jedem RCC-Patienten war ein nur etwa 2 cm³ großes Tumorgewebestück verfügbar, von dem ein Teil für histologische Untersuchungen zurückbehalten werden musste. Der Rest wurde für die direkte Isolierung der TIL verwendet. Nur in wenigen Fällen konnte so eine genügend hohe Anzahl vitaler TIL gewonnen werden. Es ist beschrieben worden, dass eine höhere Anzahl an TIL im Gewebe des Nierenzellkarzinoms mit einem weiter fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert [26,103,203]. Dieses Phänomen konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Bei fünf von sechs Patienten mit einem Tumorstadium I oder II konnten jeweils weniger als 10 x 10⁶ TIL gewonnen werden, während bei fünf von sechs Patienten mit einem Tumorstadium von III oder IV zwischen 20 x 10⁶ und 60 x 10⁶ TIL isoliert wurden, obwohl sich die Größe der homogenisierten Tumorgewebe nicht unterschied. Es ist weiterhin beschrieben worden, dass die TIL weiter fortgeschrittener Tumorstadien zudem eine signifikant niedrigere Proliferationsrate aufweisen [26]. Somit ist es möglich, dass bestimmte Tumoren bzw. TIL-Populationen für die hier durchgeführten Untersuchungen selektiert worden waren, deren Eigenschaften nicht unbedingt auf TIL aller Tumoren anwendbar sind. Trotz allem konnten einige Versuche mit direkt isolierten TIL aller vier Tumorstadien durchgeführt werden, so dass Korrelationen zwischen funktionellen Eigenschaften und der Ausbreitung der Tumoren abgeschätzt werden konnten.

5.3.2 Charakterisierung der verschiedenen TIL-Populationen

Wie bereits beschrieben wurde, konnte anhand funktioneller Untersuchungen gezeigt werden, dass direkt aus dem Tumor isolierte TIL kaum zytotoxische Aktivität gegenüber der Zielzelllinie K562 aufwiesen. Somit lagen zumindest nicht-MHC-restringierte Lymphozyten innerhalb der TIL in einem funktionell inaktiven Zustand im Tumorgewebe vor. Die funktionelle Inaktivität der infiltrierenden Lymphozyten wurde bislang immer angenommen, weil die Tumoren trotz einer hohen Anzahl an TIL kein vermindertes Wachstum aufzuweisen scheinen und einige Untersuchungen für eine verminderte Aktivität der TIL sprachen. Die in dieser Arbeit gezeigte zytotoxische Inaktivität der direkt isolierten TIL konnte allerdings teilweise bereits durch eintägige Aktivierung der TIL über niedrigdosiertes IL-2 aufgehoben werden; die Inaktivität dieser TIL war demnach reversibel. Bei einigen TIL-Populationen konnte so eine deutliche Lyse der Zielzellen erzielt werden. Dies war jedoch abhängig vom Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL. Nur solche Populationen, die einen NK-Zell-Anteil von etwa 30-40 % aufwiesen, waren in der Lage zytotoxische Aktivitäten zu zeigen. Populationen, die dagegen nur 6-15 % NK-Zellen beinhalteten, konnten die Zielzellen auch trotz eintägiger Aktivierung mit IL-2 nicht

lysieren, selbst wenn eine angereicherte Zellfraktion mit 90 % NK-Zellen als Effektorpopulation eingesetzt wurde. Somit war noch unklar, ob die Population der NK-Zellen tatsächlich für die zytotoxische Aktivität innerhalb der TIL verantwortlich war. Zudem konnte eine längere Kultivierung der TIL mit IL-2 die zytotoxische Aktivität aller Lymphozytenpopulationen wiederherstellen, unabhängig davon, wie viele NK-Zellen in den jeweiligen Populationen vorhanden gewesen waren. Trotz dieser Beobachtungen erwiesen sich die NK-Zellen als maßgebliche Effektorpopulation innerhalb der zytotoxisch aktiven TIL-Populationen, da die Depletion der NK-Zellen einen kompletten Verlust der lytischen Aktivität verursachte.

Zusammenfassend konnten die Untersuchungen somit zeigen, dass die NK-Zellen innerhalb der TIL in einem inaktiven Zustand vorlagen, der durch eine Kurzzeitstimulation der TIL zumindest dann wieder aufgehoben werden konnte, wenn ein hoher Anteil an NK-Zellen im Tumor gefunden werden konnte. Ein geringer Anteil an NK-Zellen korrelierte dagegen mit einer Inaktivität der Lymphozyten, die nur durch eine Langzeitkultivierung der TIL mit IL-2 wieder aufgehoben werden konnte. Der Anteil an NK-Zellen korrelierte somit mit der zytotoxischen Aktivität der TIL. Allerdings konnte keine Korrelation mit der Größe und der Ausbreitung des Tumors festgestellt werden. Ein höherer Anteil an NK-Zellen infiltrierte nicht bevorzugt in Tumoren weiter fortgeschrittener Tumorstadien oder konnte das Tumorstadium besser kontrollieren. Die Gründe für die unterschiedlich starke Einwanderung der NK-Zellen sind ungeklärt. Es wäre möglich, dass die NK-Zellen in einigen Tumoren verstärkt proliferieren können. Dies könnte bedeuten, dass Tumoren mit einem höheren Anteil an NK-Zellen eine geringere Fähigkeit aufweisen das Immunsystem zu inaktivieren. Die Proliferationskapazität der NK-TIL könnte an isolierten TIL über entsprechende Proliferationsmarker, wie beispielsweise die Färbung von KI-67 in NK-Zellen geklärt werden. Weiterhin ist es möglich, dass verschiedene RCC unterschiedliche Chemokine bzw. NK-Zellen verschiedener Patienten unterschiedliche Chemokin-Rezeptoren exprimieren, welche die Wanderung von NK-Zellen in das Nierenzellkarzinom beeinflussen.

Bisher ist keine Untersuchung über den Zusammenhang zwischen der Anzahl der NK-Zellen im RCC und der Prognose für die Tumorpatienten veröffentlicht worden. Dies lag in erster Linie daran, dass eine eindeutige Identifizierung der NK-Zellen über immunhistochemische Färbungen bisher nicht möglich war. Bei anderen Tumortypen konnte allerdings gezeigt werden, dass eine höhere zytotoxische Aktivität der NK-Zellen mit einer besseren Prognose für die Patienten korreliert [75-77]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Untersuchungen zeigen, dass die Anzahl der NK-Zellen und somit deren zytotoxische Aktivität im Tumor zwar keinen sichtbaren Einfluss auf die Entwicklung des Primärtumors hat, es wäre allerdings möglich, dass sie einen prognostischen Faktor für

die weitere Entwicklung des RCC (also von Rezidiven bzw. Metastasen) darstellt. Dies könnte ebenfalls erklären, warum etwa 20-30 % der Patienten auf eine Immuntherapie ansprechen, bei der ebenfalls das aktivierende Zytokin IL-2 verabreicht wird, andere Patienten dagegen nicht. Aussagen über den klinischen Verlauf der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten können jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht getroffen werden, da der vergangene Zeitraum seit Entfernung des Primärtumors, also auch der Isolierung der TIL, bisher nicht groß genug ist. Durch die hier entwickelte Möglichkeit die NK-Zellen im Gewebe über den aktivierenden Rezeptor NKp46 zu markieren, der auf jeder NK-Zelle spezifisch exprimiert wird, könnte nun allerdings eine retrospektive Untersuchung durchgeführt werden, die den Zusammenhang der Anzahl der NK-Zellen im Tumorgewebe mit dem klinischen Verlauf bereits vor längerer Zeit operierter Tumorkranken überprüft. Die Tumordatenbank des Labors für Tumorummunologie bietet hierfür eine optimale Möglichkeit, da dort Gewebeproben annähernd sämtlicher in Großhadern operierter RCC-Patienten seit mehr als zehn Jahren für histologische Untersuchungen asserviert wurden.

5.3.3 Charakterisierung der infiltrierenden NK-Zellen

Die bereits beschriebenen Untersuchungen konnten zeigen, dass die Population der NK-TIL eine maßgebliche Effektorpopulation bei der Eliminierung von Tumorzellen darstellte und wurde deshalb im weiteren Verlauf der Arbeit näher charakterisiert. Eine Erhöhung der MHC-Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen bewirkte eine Reduzierung der TIL-vermittelten Lyse. Dies bewies, dass die Erkennung der Tumorzellen auf einer reduzierten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen beruhte und bestätigte zudem erneut, dass die nicht-MHC-restringierten NK-Zellen für die Lyse der Tumorzellen verantwortlich waren. Bei einer durch zytotoxische T-Zellen vermittelten Lyse würde die Erhöhung der MHC-Moleküle eine bessere Erkennung der Tumorzellen bewirken. Die MHC-Moleküle sind für die Abschaltung der NK-Zellen verantwortlich, weil sie Liganden für inhibitorische Rezeptoren (IR) darstellen, die auf allen NK-Zellen exprimiert sind. Die Charakterisierung der Expressionsmuster verschiedener IR in der hier vorliegenden Arbeit konnte zeigen, dass eine bestimmte NK-Subpopulation das Tumorgewebe bevorzugt infiltrierte. Verglichen mit den jeweiligen autologen peripheren Populationen waren bei allen Patienten vermehrt solche NK-Zellen im Tumor vorhanden, die den IR-Komplex CD94/NKG2A trugen, wohingegen NK-Zellen mit Rezeptoren der KIR-Familie, wie p58.1 (CD158a), p58.2 (CD158b) und p70 (CD158e₁) und dem IR ILT2 (CD85j) im Tumorgewebe stets unterrepräsentiert waren. Die IR waren funktionell auf den NK-Zellen exprimiert, da die Aktivierung der unterschiedlichen IR über die Expression ihrer jeweiligen Liganden auf Zielzellen eine Reduzierung der zytotoxischen Aktivität der

NK-Zellen bewirkte. Entsprechend des Expressionsmusters der IR konnte über die Aktivierung des IR-Komplex CD94/NKG2A durch HLA-E-Moleküle (K562-E) die stärkste Reduzierung der lytischen Aktivität beobachtet werden. Die Dichte der HLA-E-Moleküle auf der Oberfläche von Zielzellen spiegelt die Expression der gesamten MHC-Klasse-I-Moleküle wieder, da die Reduzierung der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche eine Reduzierung von Signalpeptiden und auf diese Weise eine Reduzierung der HLA-E-Moleküle verursacht, welche durch die Signalpeptide stabilisiert werden. Tumorzellvarianten können eine verminderte Expression der MHC-Moleküle aufweisen um einem Angriff MHC-restringierter T-Zellen zu entgehen und exprimieren somit auch weniger HLA-E-Moleküle auf der Zelloberfläche. Solche Varianten sollten allerdings von NK-Zellen angegriffen werden können, die beispielsweise den HLA-E-Liganden-Komplex CD94/NKG2A exprimieren und Veränderungen der HLA-E-Expression auf Zielzellen erkennen. NK-Zellen exprimieren jedoch mehrere IR auf der Zelloberfläche, die für die Inaktivierung der NK-Zellen im Tumor verantwortlich sein könnten, so dass die fehlende Inhibierung durch HLA-E durch andere IR kompensiert werden kann. So konnte unter anderem eine deutliche Inhibierung der NK-TIL über die Expression von HLA-G auf Zielzellen festgestellt werden. Die HLA-G-Expression ist auf das Gewebe des Thymus und der Plazenta beschränkt, scheint auf einigen RCC jedoch induziert zu sein [60,61,204]. Dies könnte einen *tumor-escape*-Mechanismus darstellen, der den Tumoren erlaubt, einen Angriff der NK-Zellen trotz insgesamt niedriger Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen zu verhindern. Entsprechend wurde der IR ILT2, der einen möglichen Liganden für HLA-G darstellt, auf einigen NK-TIL exprimiert.

Der Mechanismus, der die selektive Rekrutierung von NK-Subpopulationen mit bestimmten IR in den Tumor bewirkt haben könnte, ist bisher nicht geklärt. Die Charakterisierung der Expressionsmuster verschiedener Chemokinrezeptoren auf diesen NK-Zellen könnte hier aufschlussreich sein, da sie gemeinsam mit anderen Faktoren für die Wanderung der Leukozyten in verschiedene Gewebe verantwortlich sind. Die bevorzugte Infiltration bestimmter NK-Zell-Subpopulationen scheint allerdings kein generelles Phänomen verschiedener Tumortypen zu sein. Bei infiltrierenden NK-Zellen des Leberzellkarzinoms wurden beispielsweise keine Unterschiede im Expressionsprofil der IR zwischen TIL und PBMC gefunden [205]. Es ist jedoch möglich, dass spezielle NK-Populationen den Tumor nicht selektiv infiltrieren, sondern die Expression bestimmter IR im Tumor aktiv verändern. So wurde von Stanley und Mitarbeitern gezeigt, dass eine Kokultivierung von NK- und RCC-Zellen die Oberflächenexpression von CD94 auf NK-Zellen erhöhen kann [206]. Die Induktion dieses IR auf NK-TIL könnte die Tumorzellen schützen und somit einen weiteren *tumor-escape*-Mechanismus des RCC darstellen. Anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass die Blockierung

bestimmter IR auf NK-Zellen wesentlich zu einer erfolgreichen Eliminierung von Tumorzellen beitragen kann [207]. Die Blockierung des IR-Komplexes CD94/NKG2A auf NK-Zellen von RCC-Patienten könnte eventuell eine NK-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen induzieren und als immuntherapeutischer Ansatz gesehen werden. Allerdings muss bei dieser Aktivierung der NK-Zellen bedacht werden, dass auch körpereigene Zellen über die Expression von HLA-E nicht mehr vor einem Angriff der NK-Zellen geschützt wären.

Neben der Charakterisierung der IR wurde auch die Expression und Funktionalität der aktivierenden Rezeptoren (AR) auf NK-TIL untersucht, um weitere Hinweise zu erlangen, warum die NK-Zellen im Tumor nicht aktiv sind. Es konnte gezeigt werden, dass die AR NKp46 und NKG2D auf der Oberfläche aller NK-TIL exprimiert waren. Über beide Rezeptoren konnte jedoch trotz Kurzzeitaktivierung über IL-2 keine zytotoxische Aktivität der NK-Zellen ausgelöst werden. Selbst angereicherte NK-Populationen zeigten keine spezifische Lyse der Zielzellen. Die einzige Ausnahme stellten angereicherte NK-Zellen der Patientin 174 dar, die über zwei Tage mit IL-2 aktiviert worden waren und eine eindeutige NKp46-vermittelte Lyse zeigten. Diese NK-Zellen stammten aus einer TIL-Population, die durch einen hohen Prozentsatz an NK-Zellen charakterisiert war. Die Aktivierbarkeit der NK-Zellen über bestimmte AR entsprach somit der zytotoxischen Aktivität gegenüber K562. Leider konnte ein ähnlicher Versuch zur Demonstration der NKG2D-vermittelten Lyse aufgrund der begrenzten Anzahl isolierter TIL nicht durchgeführt werden. Statt angereicherter NK-TIL wurde die gemischte TIL-Population eingesetzt, die keine spezifische Lyse der Zielzellen über NKG2D zeigte. Allerdings konnte mit dieser nicht-separierten TIL-Population auch über NKp46 keine Lyse erzielt werden. Es ist deshalb möglich, dass die NK-TIL-174 als angereicherte NK-Zell-Fraktion auch über NKG2D aktivierbar gewesen wären. Auch bei anderen TIL-Populationen war die Anzahl isolierter TIL ein limitierender Faktor bei funktionellen oder phänotypischen Untersuchungen. Die Anreicherung der NK-Zellen über Antikörper gegen CD56 führte oftmals zu einem erheblichen Verlust vitaler Zellen. Alternativ wurde versucht, die NK-Zellen durch eine Depletion der anderen Leukozytenpopulationen zu erreichen, allerdings konnten diese markierten und beispielsweise durch die induzierte Stimulation über den anti-CD3-Antikörper nicht mehr für phänotypische oder funktionelle Untersuchungen verwendet werden. Zum anderen beinhaltete die Negativfraktion der separierten Zellen nicht nur NK-Zellen sondern oftmals auch einige Tumorzellen und tote Zellen (nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurde eine positive Anreicherung der NK-Zellen über CD56 in Kauf genommen, wodurch zwar auch einige CD56⁺ T-Zellen separiert wurden, in den meisten Fällen jedoch eine Anreicherung der NK-Zellen auf mehr als 80 % erreicht werden konnte. Zudem wurde bisher kein stimulierender Effekt auf

NK-Zellen durch die Quervernetzung der CD56-Moleküle festgestellt, so dass funktionelle oder phänotypische Veränderungen der Zellen durch diese Methode der Separation ausgeschlossen werden konnten.

Alle durchgeführten funktionellen Untersuchungen zeigten, dass die zytotoxische Aktivität der NK-TIL nur dann beobachtet werden konnte, wenn der Anteil der NK-Zellen im Tumor im Verhältnis zur gesamten TIL-Population hoch war. Die Lyse MHC-Klasse-I-negativer Zellen oder allogener Tumorzellen konnte so bereits nach Kurzzeitaktivierung über IL-2 erreicht werden. Die spezifische Lyse über einzelne Rezeptoren wurde dagegen nur nach Anreicherung der NK-Zellen und zusätzlicher Aktivierung beobachtet. Ein Grund für diese verminderte Aktivierbarkeit der NK-Zellen über AR könnte sein, dass die Zielzellen K562 und RCC-26 gleichzeitig mehrere AR, wie zum Beispiel KIR2DS1, NKG2D und NKp46, auf NK-Zellen ansprechen. Dagegen könnte die Aktivierung über jeweils einzelne AR nicht ausgereicht haben um die NK-Zellen zu aktivieren. Dies wurde allerdings nur bei NK-TIL und nicht bei peripheren NK-Zellen beobachtet, so dass die NK-TIL eindeutig eine verminderte Aktivierbarkeit über diese Rezeptoren aufwiesen. Dieses Phänomen könnte auf einer fehlenden Weiterleitung des positiven Signals in NK-TIL beruhen. Bei infiltrierenden und auch peripheren T-Zellen verschiedener Tumorpatienten ist in der Vergangenheit beispielsweise von einer reduzierten bzw. fehlenden Expression der CD3 ζ -Kette berichtet worden, die auch für die Weiterleitung einiger positiver Signale in NK-Zellen notwendig ist [34,35,176,208]. Alle hier untersuchten Populationen peripherer und infiltrierender NK-Zellen zeigten jedoch eine deutliche Expression der ζ -Kette. Dies entsprach den bereits geschilderten Ergebnissen der immunhistochemischen Analysen. Vergleichend zu peripheren NK-Zellen gesunder Spender konnte keine reduzierte Expression der ζ -Kette auf NK-Zellen festgestellt werden, wie sie unter anderem von Finke und Tartour bei RCC-infiltrierenden T-Zellen beschrieben wurde [34,35]. Eine reduzierte Expression der CD3 ζ -Kette kann demnach nicht für die verminderte Aktivierbarkeit der NK-TIL verantwortlich sein.

Weitere Adaptermoleküle für AR sind DAP10 und DAP12, die beispielsweise für die Weiterleitung positiver Signale über NKG2D verantwortlich sind. Einige RCC-Zellen scheinen das Molekül MICA, einen Liganden für NKG2D zu exprimieren [183] und würden somit eine Aktivierung der NK-Zellen verursachen. Durch Selektion könnten deshalb Tumorvarianten entstehen, die Mechanismen entwickelt haben, um die Signalisierung über diesen Rezeptor zu verhindern, wie beispielsweise durch einen Verlust der Expression der Adaptermoleküle DAP10 oder DAP12. Dies konnte allerdings ausgeschlossen werden, da beide Moleküle innerhalb der TIL-Populationen exprimiert wurden. Es ist jedoch möglich, dass nicht die Adaptermoleküle, sondern Proteine, die weiter abwärts in der Signalkette liegen, für eine defekte Weiterleitung aktivierender

Signale verantwortlich sind. Die Expression und Funktionalität dieser Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft. Allerdings sollte die Expression des Effektormoleküls Perforin einen weiteren Aufschluss über den Aktivierungszustand der NK-Zellen im Tumor geben, da NK-Zellen, die kein Perforin exprimieren können, eine stark reduzierte zytotoxische Aktivität aufweisen [37,38]. Es konnte allerdings auch hier gezeigt werden, dass nahezu alle der untersuchten NK-TIL verglichen mit NK-Zellen gesunder Spender eine unvermindert hohe Expression von Perforin-Molekülen zeigten. Auch die Abwesenheit dieses Effektormoleküls war also nicht für die fehlende oder die reduzierte Aktivierbarkeit der NK-TIL verantwortlich.

Des Weiteren wurde die Produktion verschiedener Zytokine von NK-TIL untersucht und mit peripheren NK-Zellen gesunder Spender verglichen. Direkt isolierte und nicht kultivierte NK-TIL zeigten keine Unterschiede in der Produktion von IL-10 und IFN- γ . Nach eintägiger Stimulation mit IL-2 konnte allerdings eine verstärkte Freisetzung von TNF- α und IL-10 beobachtet werden. Beide Zytokine sind charakteristisch für eine kürzlich beschriebene periphere NK-Population, die beispielsweise durch ihre Expression des Zytokins IL-10 eine Rolle bei der Immunregulation zu spielen scheint [128,184]. Auch diese NK-Zellpopulation ist durch die Expression des IR-Komplexes CD94/NKG2A und die fehlende Expression von IR der KIR-Familie auf der Zelloberfläche gekennzeichnet, wie sie auch bei den hier untersuchten NK-TIL gefunden wurde. Allerdings sind diese regulatorisch wirkenden peripheren NK-Zellen durch eine auffallend hohe Expression der CD56-Moleküle auf der Zelloberfläche gekennzeichnet. Die NK-TIL zeigten dagegen keine einheitlich hohe, sondern vielmehr sehr variable Expression von CD56 innerhalb und zwischen den TIL-Populationen, die von schwacher über mäßige bis starke Expression des Moleküls reichte. So zeigten die NK-TIL-174 fast ausnahmslos eine hohe Expression von CD56 (CD56^{bright}), die NK-TIL-2924, -2928 und -2989 enthielten sowohl schwach CD56-exprimierende (CD56^{dim}) als auch CD56^{bright}-Populationen, während annähernd alle NK-TIL-2986 durch eine niedrige CD56-Expression gekennzeichnet waren. Die hohe Expression von CD56 auf der Oberfläche von NK-TIL war somit kein generelles Phänomen aller TIL-Populationen. In dieser Hinsicht waren sie deshalb nicht mit der beschriebenen peripheren NK-Population vergleichbar. Ein weiteres Charakteristikum der peripheren CD56^{bright} NK-Zellen ist die schwache Expression des Fc γ -Rezeptor III (CD16). Allerdings war auch die Expression dieses Rezeptors innerhalb und zwischen den einzelnen TIL-Populationen sehr heterogen. Die Expression des Rezeptors auf NK-TIL war im allgemeinen auffallend niedriger als bei der Mehrzahl der peripheren NK-Zellen, korrelierte hier aber nicht immer mit einer höheren Expression von CD56. Im Vergleich zu peripheren NK-Zellen könnten die TIL als CD16^{dim} charakterisiert werden. Wie die peripheren CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen waren auch die NK-TIL durch

eine geringere zytotoxische Aktivität trotz unverminderter Expression von Perforin gekennzeichnet, die durch die Zugabe von IL-2 erheblich erhöht werden konnte. Der CD56^{bright}CD16^{dim}-Population peripherer NK-Zellen wurde aufgrund ihrer Zytokinexpression und ihrer zytotoxischen Aktivität eine Rolle bei der Regulierung inflammatorischer Immunantworten zugeschrieben. Bei Betrachtung aller untersuchten Merkmale waren die NK-TIL nicht eindeutig mit dieser NK-Population vergleichbar, zeigten jedoch entscheidende Ähnlichkeiten in ihren Effektorfunktionen. Es ist deshalb denkbar, dass die NK-TIL im Tumor zu einer Herabregulierung der Immunantwort gegen den Tumor beitragen. Zu diesem Effekt könnte zum einen die Produktion von IL-10 nach Stimulierung über IL-2 beitragen durch das die Aktivität inflammatorischer T-Zellen reduziert wird. Zum anderen verhindert eine verminderte Aktivität der NK-Zellen die NK-Zell-vermittelte Aktivierung von DC [86] und kann somit zu einer fehlenden Aktivierung der adaptiven Immunität beitragen. Von della Chiesa und Mitarbeitern konnte zudem gezeigt werden, dass CD94/NKG2A⁺KIR⁻ NK-Zellen unreife DC sogar eliminieren können und somit ebenfalls eine inflammatorische Reaktion von T-Zellen verhindern können [209]. Dies geschieht über den AR NKp30 [210], der auch von einigen hier untersuchten NK-TIL exprimiert wurde (nicht gezeigt). Ob bestimmte Subpopulationen von NK-Zellen *in vivo* tatsächlich eine immunregulatorische Rolle spielen, ist bisher nicht bewiesen. Die Anwesenheit solcher Zellen im RCC könnte jedoch eine Erklärung für die funktionelle Inaktivierung des Immunsystems im Tumorgewebe darstellen. Wenn gezeigt werden kann, dass die Anzahl der NK-Zellen im Tumor und damit ihre Aktivierbarkeit mit einer besseren Prognose für die klinische Entwicklung der Patienten korreliert, müsste allerdings weiterhin geklärt werden, inwiefern solche regulatorisch wirkenden NK-Zellen in diesen Geweben vorhanden sind und welche Rolle sie für die weitere Ausbreitung des Tumors spielen. Eine weitergehende Charakterisierung der infiltrierenden NK-Zellen könnte in Zukunft somit entscheidend zu einem besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge im Tumor beitragen und dabei behilflich sein, weitere Strategien für neue Immuntherapien zu entwickeln.

5.3.4 Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen

Die Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen beinhaltete die Untersuchung phänotypischer Merkmale und die Expression einiger Zytokine. In erster Linie sollten die Untersuchungen Hinweise auf die Anwesenheit infiltrierender regulatorischer T-Zellen geben, die eventuell eine Unterdrückung der Immunantwort gegen den Tumor verursachen könnten. Wie über immunhistochemische Färbungen und weitere Untersuchungen der isolierten TIL-Populationen gezeigt werden konnte, waren unter den infiltrierenden T-Zellen mehrheitlich CD8⁺ T-Zellen zu finden. Die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 variierte zwischen und innerhalb der TIL-Populationen, so dass nicht alle infiltrierenden T-Zellen in einem aktivierten Zustand vorzuliegen schienen. Die Anzahl an CD25⁺ T-Zellen war etwa mit der peripheren Situation vergleichbar, wohingegen die Expression von CD69 auf deutlich mehr infiltrierenden als peripheren Lymphozyten gefunden wurde, so dass einige T-Zellen im Tumor durchaus aktiviert worden zu sein schienen. Dies wurde in der Vergangenheit bereits einige Male gezeigt [20,31].

Die CD3ζ-Kette, die bei T-Zellen für die Weiterleitung des aktivierenden Signals über den T-Zellrezeptor zuständig ist, war auf allen direkt isolierten nicht-kultivierten infiltrierenden T-Zellen exprimiert. Finke und Mitarbeiter hatten bei zehn von elf TIL-Populationen einen Verlust in der Expression der ζ-Kette festgestellt [34], bei Tartour *et al.* waren es dagegen nur vier von 13 untersuchten TIL-Populationen [35]. Im Gegensatz zu den hier untersuchten Patienten waren sämtliche Tumoren des Patientenkollektivs bei Finke *et al.* bereits metastasiert. Es wäre möglich, dass die CD3ζ-Kette der T-Zellen nur auf TIL dieser sehr weit fortgeschrittenen Tumorstadien reduziert ist, während dieser Mechanismus auf TIL früherer Tumorstadien nicht beobachtet werden kann. Dies könnte von diesen Tumoren als *escape*-Mechanismus benützt werden, da bereits gezeigt werden konnte, dass in weiter fortgeschrittene Tumoren verstärkt Lymphozyten einwandern können [26,203]. Die Tumorstadien des Patientenkollektivs von Tartour *et al.* wurden nicht veröffentlicht. Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv von sechs Patienten reicht nicht aus um statistisch gesicherte Aussagen treffen zu können. Es wurde allerdings deutlich, dass kein kompletter Verlust der ζ-Kette auf TIL vorlag und somit als Ursache für eine funktionelle Inaktivierung der infiltrierenden T-Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Die Expression der Perforin-Moleküle variierte sowohl zwischen verschiedenen TIL-Populationen als auch verglichen mit peripheren T-Zellen von RCC-Patienten und gesunden Spendern. Während bei PBMC gesunder Spender etwa 30-40 % der CD8⁺ T-Zellen Perforin exprimierten, waren es bei RCC-Patienten bis zu 80 % und bei TIL zwischen 11 und 54 %. Im Mittel waren es bei RCC-Patienten innerhalb der PBMC

mehr und innerhalb der TIL weniger Perforin-exprimierende CD8⁺ T-Zellen als innerhalb der PBMC gesunder Spender. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Populationen in den einzelnen Fallgruppen muss dieses Ergebnis allerdings kritisch betrachtet werden. Der Vergleich zwischen peripheren und infiltrierenden Zellen einzelner RCC-Patienten zeigte jeweils einen deutlich höheren Anteil Perforin-positiver CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie als im autologen Tumorgewebe (2986: 56 bzw. 17 %, 2936: 76 bzw. 56 %, 2952: 30 bzw. 11 %). Diese Beobachtung wurde auch von E. Nößner und Mitarbeitern festgestellt (Manuskript in Vorbereitung). Es wäre demnach möglich, dass die T-Zellen im Tumor eine geringere zytotoxische Aktivität als in der Peripherie aufweisen, weil weniger Perforin von den T-Zellen exprimiert werden kann. Die spezifische zytotoxische Aktivität der T-Zellen lässt sich allerdings nur schwer bestimmen, da jede T-Zelle mit dem passenden Antigen stimuliert werden müsste. Zudem ist bisher nicht geklärt, welche Rolle die Perforin-Moleküle bei der T-Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen spielen. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen eines Nierenzellkarzinoms von T-Zellen *in vivo* auch über einen Perforin-unabhängigen Weg eliminiert werden können [211]. Die relativ niedrige Anzahl Perforin-positiver Zellen im Tumor sprach somit zwar für eine reduzierte Aktivität der infiltrierenden T-Zellen, ein Verlust der Perforin-Expression scheint allerdings keine primäre Ursache für die Toleranz der T-Zellen gegenüber Tumorzellen darzustellen, da in jedem Tumorgewebe Perforin-positiv zytotoxische T-Zellen gefunden werden konnten. Es ist allerdings auch möglich, dass solche T-Zellen, die kein Perforin im Inneren der Zelle aufweisen, bereits aktiviert worden waren, die lytischen Granula somit ausgeschüttet haben und im Tumorgewebe nicht in der Lage sind erneut Perforin zu speichern. *In vitro* wird beobachtet, dass die zytotoxischen Zellen nach der Ausschüttung der Effektormoleküle den Antigen-Kontakt abbrechen und erst dann erneut zytotoxische Aktivität zeigen. Es wäre denkbar, dass die T-Zellen, die im Tumorgewebe in ständigem Kontakt zu Tumorzellen stehen, nicht in der Lage sind neue Perforin-Moleküle zu synthetisieren. Dies müsste durch Experimente mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Tumorzellen überprüft werden.

Für eine weitere Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen wurde die Zytokinfreisetzung der TIL analysiert. Diese zeigte erhebliche Schwankungen in der Produktion von IL-10 und IFN- γ zwischen den verschiedenen TIL-Populationen. Im Mittel wurden beide Zytokine von TIL stärker produziert als von peripheren T-Zellpopulationen. Allerdings war innerhalb peripherer T-Zellpopulationen die Expression von IL-10 und IFN- γ etwa gleich stark während von TIL eine deutlich höhere Menge an IL-10 als IFN- γ produziert wurde. IL-10 kann beispielsweise die Expression von IFN- γ , IL-12 und IL-2 durch aktivierte Makrophagen, DC oder T-Zellen inhibieren und somit die Herabregulierung einer inflammatorischen Antwort begünstigen. Allerdings scheint das

Zytokin auch gegenteilige Effekte zu erzielen. So wurde unter anderem gezeigt, dass NK-Zellen durch IL-10 aktiviert werden können und dass die systemische Gabe von IL-10 in Mäusen sogar eine bessere Abstoßung von Tumorzellen bewirkt [203,212]. Die Rolle des IL-10 bei der funktionellen Inaktivierung der TIL ist demnach nicht geklärt. Allerdings ist bekannt, dass durch die Anwesenheit hoher Mengen an IL-10 bestimmte Populationen regulatorischer T-Zellen entstehen können, die eine Immunantwort unterdrücken können. Die Identifizierung dieser regulatorischen Zellen in Lymphozytenpopulationen gestaltete sich als schwierig, da bisher keine spezifischen Oberflächenmoleküle bekannt sind, über die eine direkte Analyse der Zellen möglich wäre. Allerdings wurden einige Hinweise auf die Anwesenheit dieser Zellpopulation im Tumor gefunden. Zum einen konnten im Tumor CD4⁺CD25⁺ T-Zellen gefunden werden, die in ihrer Anzahl etwa mit der periphereren Lymphozyten vergleichbar war. Innerhalb der peripheren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen befindet sich auch eine Subpopulation regulatorischer T-Zellen, so dass es möglich wäre, dass diese Zellen auch im Tumor regulatorische Eigenschaften besitzen. Zum anderen könnte das relativ hohe Aufkommen an IL-10 im Tumormilieu die Entstehung regulatorischer T-Zellen begünstigen, die selbst ebenfalls IL-10 produzieren und so zu einer weiteren Erhöhung der IL-10-Expression beitragen. Außerdem konnte eine deutliche Expression des Transkriptionsfaktors Scurfin (Foxp3) festgestellt werden. Dieses Protein scheint ausschließlich von T_{reg}-Zellen produziert zu werden [149], womit die Anwesenheit regulatorischer Zellen im Tumorgewebe bestätigt wäre. Die Expression des Integrins CD103 war dagegen nicht geeignet die T_{reg}-Zellen innerhalb der TIL zu identifizieren, da das Protein in einigen Fällen von annähernd sämtlichen TIL exprimiert wurde und nicht auf die Population der T-Zellen beschränkt blieb. Die Expression des Integrins auf diesen Zellen bestätigte jedoch, dass eine spezifische Population infiltrierender T-Zellen isoliert wurde, die sich von der peripheren Population der T-Zellen unterschied.

Aufgrund der limitierten Zahl direkt isolierter TIL konnten keine geeigneten funktionellen Versuche durchgeführt werden, um die suppressiven Eigenschaften von TIL-Populationen zu untersuchen, so dass letztlich nicht bestätigt werden konnte, dass solche Zellen innerhalb der TIL tatsächlich für die funktionelle Inaktivierung der infiltrierenden Lymphozyten verantwortlich sein könnten.

6. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom ist die häufigste neoplastische Erkrankung der Niere und stellt das siebthäufigste Malignom beim Mann dar, an der in Deutschland jedes Jahr mehr als 11 000 Menschen erkranken. Bei Erstdiagnose sind etwa 13 % der Karzinome bereits metastasiert. Die 1-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten beträgt bei rein operativer Behandlung lediglich 15 %. Da das Nierenzellkarzinom keine Strahlensensitivität zeigt und gegenüber gängigen Chemotherapeutika refraktär ist, wird seit langem nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Hierbei wird berücksichtigt, dass das Karzinom zu der relativ kleinen Gruppe immunogener Tumoren gezählt wird, da es möglich ist *in vitro* eine Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren. Zudem zeigen einige Patienten Remissionen von Primärtumoren oder Metastasen nach systemischer Gabe von IL-2, so dass scheinbar auch *in vivo* eine Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst werden kann. Die Tumorgewebe weisen in den meisten Fällen außerdem eine sehr starke Infiltration von Lymphozyten auf, unter denen beispielsweise bereits Tumorspezifische T-Zellen identifiziert werden konnten. Die Lymphozyten scheinen im Tumorgewebe allerdings inaktiv zu sein, da sie das Wachstum des Tumors *in vivo* nicht verhindern können. Die Erkennung und Bekämpfung der Ursachen für diese funktionelle Inaktivität der Lymphozyten könnte zu einer Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellen innerhalb der infiltrierenden Lymphozyten tatsächlich in einem funktionell inaktivierten Zustand vorliegen. Sie sind nicht in der Lage Zellen zu lysieren, selbst wenn diese keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren und deshalb von allen NK-Zellen erkannt werden sollten. Durch die direkte *ex vivo*-Isolierung der Lymphozyten konnte allerdings gezeigt werden, dass die infiltrierenden NK-Zellen durchaus eine maßgebliche Effektorpopulation bei der Eliminierung der Tumorzellen darstellen können. Ihre Zytotoxizität gegen Tumorzellen konnte bereits über eine Kurzzeitkultivierung der Zellen mit IL-2 induziert werden. Die infiltrierenden NK-Zellen waren in der Vergangenheit wenig untersucht worden, da viele Eigenschaften dieser Zellpopulation erst in den letzten Jahren charakterisiert wurden und sowohl Techniken als auch Reagenzien für ihre Beschreibung fehlten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine NK-Zell-Subpopulation, die durch die Expression des inhibitorischen Rezeptorkomplexes CD94/NKG2A charakterisiert ist, verglichen mit autologen peripheren Lymphozyten im Tumorgewebe überrepräsentiert ist.

Die Charakterisierung weiterer phänotypischer und funktioneller Merkmale der infiltrierenden NK-Zellen ließ vermuten, dass sie sowohl durch das Expressionsmuster der inhibitorischen Rezeptoren, als auch durch die Expression bestimmter Zytokine wie IL-10 sowie durch ihre geringe zytotoxische Aktivität *in situ* eine Herabregulierung der Immunantwort im Tumorgewebe verursachen. Dass die NK-Zellen jedoch bereits über eine Kurzzeitstimulierung mit IL-2 aktivierbar waren, könnte erklären, warum die Immuntherapie an Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom über IL-2 auch *in vivo* Wirkung gegen die Tumoren zeigen kann. Die Aktivität der NK-Zellen nach dieser Stimulierung konnte allerdings nur dann festgestellt werden, wenn der Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL hoch lag. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen und ihrer Anzahl im Tumor festgestellt werden. Allerdings lag keine Korrelation mit der Größe und Ausbreitung des Primärtumors vor. Dies scheint nicht verwunderlich, da die NK-Zellen im Tumor funktionell inaktiv sind und den primären Tumor somit nicht bekämpfen können. Es wäre allerdings möglich, dass die Anzahl der NK-Zellen nicht nur mit ihrer Aktivierbarkeit im Tumor selbst in Zusammenhang steht, sondern bei diesen Patienten gleichzeitig eine generell bessere Aktivierbarkeit des Immunsystems gegen den Tumor widerspiegelt. Bei verschiedenen anderen Tumortypen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die Anzahl als auch die Aktivität der NK-Zellen für die klinische Prognose der Patienten entscheidend sein kann. Somit wäre möglich, dass ein hoher Anteil an NK-Zellen im Tumor einen prognostischen Faktor für das Ansprechen der Patienten auf die systemische Immuntherapie mit IL-2 darstellt und könnte helfen solche Patienten zu selektieren, die somit für diese Therapie mit den zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen in Frage kommen. Eine Untersuchung dieses Zusammenhangs ist nun retrospektiv auf einfache Weise möglich, da in dieser Arbeit eine Methode dargestellt werden konnte, die es erlaubt die NK-Zellen erstmals über eine einfarbige immunhistochemische Färbung in asservierten Gewebeproben bereits vor längerer Zeit operierter Patienten spezifisch zu identifizieren und die Korrelation mit deren klinischem Krankheitsverlauf zu untersuchen. Bisher ist nicht geklärt, warum verschiedene Tumoren unterschiedliche Anteile infiltrierender NK-Zellen aufweisen. Neben einer verstärkten Einwanderung von NK-Zellen wäre es möglich, dass NK-Zellen in verschiedenen Tumoren unterschiedlich stark proliferieren können. Diese Tumoren weisen dann möglicherweise eine verminderte Fähigkeit auf, das Immunsystem zu unterdrücken und könnten auch aus diesem Grund eine bessere klinische Prognose für die Patienten darstellen. Die Ursachen für die unterschiedliche Aktivierbarkeit der NK-Zellpopulationen konnten bisher ebenso nicht geklärt werden. Hierfür würde sich anbieten, Unterschiede in der Genexpression zwischen verschiedenen

NK-Zellpopulationen zu suchen, was beispielsweise mithilfe der Array-Technologie bewerkstelligt werden könnte. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der NK-Zellen im Tumor und der Prognose für die Tumorpatienten könnte bestätigen, dass die Population der NK-Zellen *in vivo* eine ausschlaggebende Effektorpopulation bei der Bekämpfung der Tumoren darstellen.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen an infiltrierenden T-Zellen durchgeführt, die vermuten lassen, dass sowohl aktivierte T-Zell-Populationen als auch regulatorische T-Zellen im Tumorgewebe vorhanden sind. Dies konnte durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker und Proteine wie beispielsweise Foxp3, das spezifisch von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, gezeigt werden. Die Anwesenheit verschiedener regulatorischer Zellen könnte einen entscheidenden Beitrag zu einer funktionellen Inaktivierung der Lymphozyten im Tumor und der damit verbundenen Toleranz gegenüber Tumorzellen leisten, da bereits gezeigt wurde, dass regulatorische Zellen beispielsweise die Immunantwort gegen Selbst-Antigene, die auch von Tumorzellen exprimiert werden, unterdrücken können.

Erkenntnisse über die Eigenschaften infiltrierender Lymphozyten tragen entscheidend zu einem besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge im Nierenzellkarzinom bei. Die in dieser Arbeit aufgezeigten Charakteristika der TIL und die Etablierung einer Methode für die spezifische Identifizierung der NK-Zellen im Gewebe könnten in Zukunft eine Grundlage für die Entwicklung neuer Immuntherapien darstellen, die eine gezielte Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor bewirken könnten.

7. Literaturverzeichnis

1. **Oberneder, R., Wagner, H., Siebels, M., Stieber, P., Busch, M., and Weiss, M.** (2003)
Nierenzellkarzinom, in Manual Urogenitale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.
3. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München, Seiten 79-97.
2. **Aydemir, Ü. and Hölzel, D.** (2003)
Inzidenz und Mortalität, prognostische Faktoren und Survival, in Manual Urogenitale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.
3. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München, Seiten 167-180.
3. **Hölzel, D.** (2003)
Tumorregister München, URL: <http://trm.web.med.uni-muenchen.de/>.
4. **Thoenes, W and Storkel, S.** (1991)
Pathologie des benignen und malignen Nierenzellkarzinoms.
Urologe A 30(6):W41-W50.
5. **Storkel, S, Eble, JN, Adlakha, K, Amin, M, Blute, ML, Bostwick, DG, Darson, M, Delahunt, B, and Iczkowski, K.** (1997)
Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC).
Cancer 80(5):987-989.
6. **de Riese, W, Goldenberg, K, Allhoff, E, and Jonas, U.** (1991)
Spontaneous regression of metastatic renal carcinoma with long-term survival.
Br. J. Urol. 68(1):98-100.
7. **Rosenberg, SA, Mule, JJ, Spiess, PJ, Reichert, CM, and Schwarz, SL.** (1985)
Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2.
J. Exp. Med. 161(5):1169-1188.
8. **Atzpodien, J, Korfer, A, Franks, CR, Poliwoda, H, and Kirchner, H.** (1990)
Home therapy with recombinant interleukin-2 and interferon-alpha 2b in advanced human malignancies.
Lancet 335(8704):1509-1512.
9. **Lopez, HE, Kirchner, H, and Atzpodien, J.** (1996)
Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients.
J. Urol. 155(1):19-25.
10. **Motzer, RJ, Bander, NH, and Nanus, DM.** (1996)
Renal-cell carcinoma.
N. Engl. J. Med. 335(12):865-875.

11. **Fishman,M and Antonia,S.** (2003)
Novel therapies for renal cell carcinoma--an update.
Expert. Opin. Investig. Drugs 12(4):593-609.
12. **Pohla,H, Frankenberger,B, Stadlbauer,B, Oberneder,R, Hofstetter,A, Willimsky,G, Pezzutto,A, Dorken,B, Blankenstein,T, and Schendel,DJ.** (2000)
Allogeneic vaccination for renal cell carcinoma: development and monitoring.
Bone Marrow Transplant. 25 Suppl 2S83-S87.
13. **Holti,L, Rieser,C, Papesh,C, Ramoner,R, Herold,M, Klocker,H, Radmayr,C, Stenzl,A, Bartsch,G, and Thurnher,M.** (1999)
Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells.
J. Urol. 161(3):777-782.
14. **Steffens,MG, Boerman,OC, De Mulder,PH, Oyen,WJ, Buijs,WC, Witjes,JA, van den Broek,WJ, Oosterwijk-Wakka,JC, Debruyne,FM, Corstens,FH, and Oosterwijk,E.** (1999)
Phase I radioimmunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with 131I-labeled chimeric monoclonal antibody G250.
Clin. Cancer Res. 5(10 Suppl):3268s-3274s.
15. **Chang,AE, Li,Q, Jiang,G, Sayre,DM, Braun,TM, and Redman,BG.** (2003)
Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer.
J. Clin. Oncol. 21(5):884-890.
16. **Frohn,C, Doehn,C, Durek,C, Bohle,A, Schlenke,P, Jocham,D, and Kirchner,H.** (2000)
Feasibility of the adoptive transfusion of allogenic human leukocyte antigen-matched natural killer cells in patients with renal cell carcinoma.
J. Immunother. 23(4):499-504.
17. **Plautz,GE, Bukowski,RM, Novick,AC, Klein,EA, Kursh,ED, Olencki,TE, Yetman,RJ, Pienkny,A, Sandstrom,K, and Shu,S.** (1999)
T-cell adoptive immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma.
Urology 54(4):617-623.
18. **Topalian,SL, Solomon,D, Avis,FP, Chang,AE, Freerksen,DL, Linehan,WM, Lotze,MT, Robertson,CN, Seipp,CA, Simon,P, and .** (1988)
Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study.
J. Clin. Oncol. 6(5):839-853.
19. **Heinemann,D, Smith,PJ, and Symes,MO.** (1987)
Expression of histocompatibility antigens and characterisation of mononuclear cell infiltrates in human renal cell carcinomas.
Br. J. Cancer 56(4):433-437.

20. **Van den Hove,LE, Van Gool,SW, Van Poppel,H, Baert,L, Coorevits,L, Van Damme,B, and Ceuppens,JL.** (1997)
Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma.
Clin. Exp. Immunol. 109(3):501-509.
21. **Shabtai,M, Ye,H, Frischer,Z, Martin,J, Waltzer,WC, and Malinowski,K.** (2002)
Increased expression of activation markers in renal cell carcinoma infiltrating lymphocytes.
J. Urol. 168(5):2216-2219.
22. **Brasanac,D, Markovic-Lipkovski,J, Hadzi-Djokic,J, Muller,GA, and Muller,CA.** (1999)
Immunohistochemical analysis of HLA class II antigens and tumor infiltrating mononuclear cells in renal cell carcinoma: correlation with clinical and histopathological data.
Neoplasma 46(3):173-178.
23. **Thurnher,M, Radmayr,C, Ramoner,R, Ebner,S, Bock,G, Klocker,H, Romani,N, and Bartsch,G.** (1996)
Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells.
Int. J. Cancer 68(1):1-7.
24. **Schwaab,T, Schned,AR, Heaney,JA, Cole,BF, Atzpodien,J, Wittke,F, and Ernstoff,MS.** (1999)
In vivo description of dendritic cells in human renal cell carcinoma.
J. Urol. 162(2):567-573.
25. **Tomita,Y, Nishiyama,T, Fujiwara,M, and Sato,S.** (1991)
Characterization of tumor-infiltrating mononuclear cells in renal cell cancer: quantitative analysis by immunoperoxidase staining.
Urol. Int. 47(1):1-6.
26. **Nakano,O, Sato,M, Naito,Y, Suzuki,K, Orikasa,S, Aizawa,M, Suzuki,Y, Shintaku,I, Nagura,H, and Ohtani,H.** (2001)
Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity.
Cancer Res. 61(13):5132-5136.
27. **Schendel,DJ, Gansbacher,B, Oberneder,R, Kriegmair,M, Hofstetter,A, Riethmuller,G, and Segurado,OG.** (1993)
Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor- infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines.
J. Immunol. 151(8):4209-4220.
28. **Finke,JH, Rayman,P, Edinger,M, Tubbs,RR, Stanley,J, Klein,E, and Bukowski,R.** (1992)
Characterization of a human renal cell carcinoma specific cytotoxic CD8+ T cell line.
J. Immunother. 11(1):1-11.

29. **Koo,AS, Tso,CL, Shimabukuro,T, Peyret,C, deKernion,JB, and Beldegrun,A.** (1991)
Autologous tumor-specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma.
J. Immunother. 10(5):347-354.
30. **Jantzer,P and Schendel,DJ.** (1998)
Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo.
Cancer Res. 58(14):3078-3086.
31. **Angevin,E, Kremer,F, Gaudin,C, Hercend,T, and Triebel,F.** (1997)
Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity.
Int. J. Cancer 72(3):431-440.
32. **Beldegrun,A, Kasid,A, Uppenkamp,M, and Rosenberg,SA.** (1990)
Lymphokine mRNA profile and functional analysis of a human CD4+ clone with unique antitumor specificity isolated from renal cell carcinoma ascitic fluid.
Cancer Immunol. Immunother. 31(1):1-10.
33. **Rosenberg,SA, Spiess,P, and Lafreniere,R.** (1986)
A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes.
Science 233(4770):1318-1321.
34. **Finke,JH, Zea,AH, Stanley,J, Longo,DL, Mizoguchi,H, Tubbs,RR, Wilttrout,RH, O'Shea,JJ, Kudoh,S, Klein,E, and .** (1993)
Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma.
Cancer Res. 53(23):5613-5616.
35. **Tartour,E, Latour,S, Mathiot,C, Thiounn,N, Mosseri,V, Joyeux,I, D'Enghien,CD, Lee,R, Debre,B, and Fridman,WH.** (1995)
Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function.
Int. J. Cancer 63(2):205-212.
36. **Meyers,JH, Ryu,A, Monney,L, Nguyen,K, Greenfield,EA, Freeman,GJ, and Kuchroo,VK.** (2002)
Cutting Edge: CD94/NKG2 Is Expressed on Th1 But Not Th2 Cells and Costimulates Th1 Effector Functions.
J. Immunol. 169(10):5382-5386.
37. **Catalfamo,M and Henkart,PA.** (2003)
Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway.
Curr. Opin. Immunol. 15(5):522-527.

38. **Kagi,D, Ledermann,B, Burki,K, Seiler,P, Odermatt,B, Olsen,KJ, Podack,ER, Zinkernagel,RM, and Hengartner,H.** (1994)
Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice.
Nature 369(6475):31-37.
39. **van den Broek,MF, Kagi,D, Zinkernagel,RM, and Hengartner,H.** (1995)
Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo.
Eur. J. Immunol. 25(12):3514-3516.
40. **Smyth,MJ, Thia,KY, Cretney,E, Kelly,JM, Snook,MB, Forbes,CA, and Scalzo,AA.** (1999)
Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis.
J. Immunol. 162(11):6658-6662.
41. **Nakanishi,H, Monden,T, Morimoto,H, Kobayashi,T, Shimano,T, and Mori,T.** (1991)
Perforin expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer.
Br. J. Cancer 64(2):239-242.
42. **Qian,QJ, Xue,HB, Qu,ZQ, Fang,SG, Cao,HF, and Wu,MC.** (1999)
In situ detection of tumor infiltrating lymphocytes expressing perforin and fas ligand genes in human HCC.
World J. Gastroenterol. 5(1):12-14.
43. **Kontani,K, Sawai,S, Hanaoka,J, Tezuka,N, Inoue,S, and Fujino,S.** (2001)
Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers.
Eur. J. Surg. Oncol. 27(2):180-186.
44. **Ikeda,H, Lethe,B, Lehmann,F, van Baren,N, Baurain,JF, de Smet,C, Chambost,H, Vitale,M, Moretta,A, Boon,T, and Coulie,PG.** (1997)
Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor.
Immunity. 6(2):199-208.
45. **Speiser,DE, Pittet,MJ, Valmori,D, Dunbar,R, Rimoldi,D, Lienard,D, MacDonald,HR, Cerottini,JC, Cerundolo,V, and Romero,P.** (1999)
In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes.
J. Exp. Med. 190(6):775-782.
46. **Guerra,N, Michel,F, Gati,A, Gaudin,C, Mishal,Z, Escudier,B, Acuto,O, Chouaib,S, and Caignard,A.** (2002)
Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction.
Blood 100(8):2874-2881.

47. **Schendel,DJ, Oberneder,R, Falk,CS, Jantzer,P, Kressenstein,S, Maget,B, Hofstetter,A, Riethmuller,G, and Nossner,E.** (1997)
Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy.
J. Mol. Med. 75(6):400-413.
48. **Maeurer,MJ, Martin,DM, Castelli,C, Elder,E, Leder,G, Storkus,WJ, and Lotze,MT.** (1995)
Host immune response in renal cell cancer: interleukin-4 (IL-4) and IL- 10 mRNA are frequently detected in freshly collected tumor-infiltrating lymphocytes.
Cancer Immunol. Immunother. 41(2):111-121.
49. **Wang,Q, Redovan,C, Tubbs,R, Olencki,T, Klein,E, Kudoh,S, Finke,J, and Bukowski,RM.** (1995)
Selective cytokine gene expression in renal cell carcinoma tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes.
Int. J. Cancer 61(6):780-785.
50. **Elsasser-Beile,U, Rindsfuser,M, Grussenmeyer,T, Schultze-Seemann,W, and Wetterauer,U.** (2000)
Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4(+)or CD8(+)tumour- infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer.
Br. J. Cancer 83(5):637-641.
51. **Elsasser-Beile,U, Grussenmeyer,T, Gierschner,D, Schmoll,B, Schultze-Seemann,W, Wetterauer,U, and Schulte,MJ.** (1999)
Semiquantitative analysis of Th1 and Th2 cytokine expression in CD3+, CD4+, and CD8+ renal-cell-carcinoma-infiltrating lymphocytes.
Cancer Immunol. Immunother. 48(4):204-208.
52. **Filgueira,L, Zuber,M, Merlo,A, Caetano,V, Schultz,E, Harder,F, Spagnoli,GC, and Heberer,M.** (1993)
Cytokine gene transcription in renal cell carcinoma.
Br. J. Surg. 80(10):1322-1325.
53. **Falk,CS, Mach,M, Schendel,DJ, Weiss,EH, Hilgert,I, and Hahn,G.** (2002)
NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation.
J. Immunol. 169(6):3257-3266.
54. **Alcami,A and Koszinowski,UH.** (2000)
Viral mechanisms of immune evasion.
Immunol. Today 21(9):447-455.
55. **Garrido,F, Cabrera,T, Concha,A, Glew,S, Ruiz-Cabello,F, and Stern,PL.** (1993)
Natural history of HLA expression during tumour development.
Immunol. Today 14(10):491-499.

56. **Natali,PG, Nicotra,MR, Bigotti,A, Ventura,I, Marcenaro,L, Giacomini,P, and Russo,C.** (1989)
Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 86(17):6719-6723.
57. **Pantel,K, Schlimok,G, Kutter,D, Schaller,G, Genz,T, Wiebecke,B, Backmann,R, Funke,I, and Riethmuller,G.** (1991)
Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells.
Cancer Res. 51(17):4712-4715.
58. **Brasanac,D, Muller,CA, Muller,GA, Hadzi-Dzokic,J, and Markovic-Lipkovski,J.** (1999)
HLA class I antigens expression in renal cell carcinoma: histopathological and clinical correlation.
J. Exp. Clin. Cancer Res. 18(4):505-510.
59. **Seliger,B, Cabrera,T, Garrido,F, and Ferrone,S.** (2002)
HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells.
Semin. Cancer Biol. 12(1):3-13.
60. **Ibrahim,EC, Guerra,N, Lacombe,MJ, Angevin,E, Chouaib,S, Carosella,ED, Caignard,A, and Paul,P.** (2001)
Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma.
Cancer Res. 61(18):6838-6845.
61. **Bukur,J, Rebmann,V, Grosse-Wilde,H, Luboldt,H, Ruebben,H, Drexler,I, Sutter,G, Huber,C, and Seliger,B.** (2003)
Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma.
Cancer Res. 63(14):4107-4111.
62. **Malinowski,K, Kono,K, Takayama,T, Terashima,T, Tsukuda,K, Waltzer,W, and Rapaport,FT.** (1997)
Inhibition of lymphocyte proliferative responses by renal cell carcinoma extract.
Transplant. Proc. 29(1-2):839-841.
63. **Shabtai,M, Ye,H, Kono,K, Takayam,T, Terashima,K, Tsukuda,K, Frischer,Z, Waltzer,WC, and Malinowski,K.** (2003)
Immune inhibitory effects of renal cell carcinoma extract on lectin and alloantigen-induced peripheral blood and tumor infiltrating lymphocyte blastogenesis.
Urol. Oncol. 21(1):27-32.
64. **Torre-Amione,G, Beauchamp,RD, Koeppen,H, Park,BH, Schreiber,H, Moses,HL, and Rowley,DA.** (1990)
A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 87(4):1486-1490.

65. **Lahn,M, Fisch,P, Kohler,G, Kunzmann,R, Hentrich,I, Jesuiter,H, Behringer,D, Muschal,B, Veelken,H, Kulmburg,P, Ikle, DN, and Lindemann,A.** (1999)
Pro-inflammatory and T cell inhibitory cytokines are secreted at high levels in tumor cell cultures of human renal cell carcinoma.
Eur. Urol. 35(1):70-80.
66. **Nakagomi,H, Pisa,P, Pisa,EK, Yamamoto,Y, Halapi,E, Backlin,K, Juhlin,C, and Kiessling,R.** (1995)
Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL- 10 mRNA in human renal cell carcinoma.
Int. J. Cancer 63(3):366-371.
67. **Ropponen,KM, Eskelinen,MJ, Lipponen,PK, Alhava,E, and Kosma,VM.** (1997)
Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer.
J. Pathol. 182(3):318-324.
68. **Lipponen,PK, Eskelinen,MJ, Jauhiainen,K, Harju,E, and Terho,R.** (1992)
Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer.
Eur. J. Cancer 29A(1):69-75.
69. **Clemente,CG, Mihm,MC, Jr., Bufalino,R, Zurrida,S, Collini,P, and Cascinelli,N.** (1996)
Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma.
Cancer 77(7):1303-1310.
70. **Marrogi,AJ, Munshi,A, Merogi,AJ, Ohadike,Y, El Habashi,A, Marrogi,OL, and Freeman,SM.** (1997)
Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma.
Int. J. Cancer 74(5):492-501.
71. **Yasunaga,M, Tabira,Y, Nakano,K, Iida,S, Ichimaru,N, Nagamoto,N, and Sakaguchi,T.** (2000)
Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma.
Ann. Thorac. Surg. 70(5):1634-1640.
72. **Yin,XY, Lu,MD, Lai,YR, Liang,LJ, and Huang,JF.** (2003)
Prognostic significances of tumor-infiltrating S-100 positive dendritic cells and lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma.
Hepatogastroenterology 50(53):1281-1284.
73. **Kolbeck,PC, Kaveggia,FF, Johansson,SL, Grune,MT, and Taylor,RJ.** (1992)
The relationships among tumor-infiltrating lymphocytes, histopathologic findings, and long-term clinical follow-up in renal cell carcinoma.
Mod. Pathol. 5(4):420-425.

74. **Bromwich,EJ, McArdle,PA, Canna,K, McMillan,DC, McNicol,AM, Brown,M, and Aitchison,M. (2003)**
The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer.
Br. J. Cancer 89(10):1906-1908.
75. **Koda,K, Saito,N, Takiguchi,N, Oda,K, Nunomura,M, and Nakajima,N. (1997)**
Preoperative natural killer cell activity: correlation with distant metastases in curatively resected colorectal carcinomas.
Int. Surg. 82(2):190-193.
76. **Taketomi,A, Shimada,M, Shirabe,K, Kajiyama,K, Gion,T, and Sugimachi,K. (1998)**
Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma: a new prognostic indicator after hepatectomy.
Cancer 83(1):58-63.
77. **Nakamura,H, Kawasaki,N, Hagiwara,M, Saito,M, Konaka,C, and Kato,H. (2000)**
Cellular immunologic parameters related to age, gender, and stage in lung cancer patients.
Lung Cancer 28(2):139-145.
78. **Coca,S, Perez-Piqueras,J, Martinez,D, Colmenarejo,A, Saez,MA, Vallejo,C, Martos,JA, and Moreno,M. (1997)**
The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma.
Cancer 79(12):2320-2328.
79. **Ishigami,S, Natsugoe,S, Tokuda,K, Nakajo,A, Che,X, Iwashige,H, Aridome,K, Hokita,S, and Aikou,T. (2000)**
Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma.
Cancer 88(3):577-583.
80. **Villegas,FR, Coca,S, Villarrubia,VG, Jimenez,R, Chillon,MJ, Jareno,J, Zuñiga,M, and Callol,L. (2002)**
Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer.
Lung Cancer 35(1):23-28.
81. **Liljefors,M, Nilsson,B, Hjelm Skog,AL, Ragnhammar,P, Mellstedt,H, and Frodin,JE. (2003)**
Natural killer (NK) cell function is a strong prognostic factor in colorectal carcinoma patients treated with the monoclonal antibody 17- 1A.
Int. J. Cancer 105(5):717-723.
82. **Kim,S, Iizuka,K, Aguila,HL, Weissman,IL, and Yokoyama,WM. (2000)**
In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell- deficient mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97(6):2731-2736.

83. **Yang,Q, Hokland,ME, Bryant,JL, Zhang,Y, Nannmark,U, Watkins,SC, Goldfarb,RH, Herberman,RB, and Basse,PH.** (2003)
Tumor-localization by adoptively transferred, interleukin-2-activated NK cells leads to destruction of well-established lung metastases.
Int. J. Cancer 105(4):512-519.
84. **Kurosawa,S, Matsuzaki,G, Harada,M, Ando,T, and Nomoto,K.** (1993)
Early appearance and activation of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphoid cells during tumor development.
Eur. J. Immunol. 23(5):1029-1033.
85. **Moretta,L, Bottino,C, Pende,D, Mingari,MC, Biassoni,R, and Moretta,A.** (2002)
Human natural killer cells: their origin, receptors and function.
Eur. J. Immunol. 32(5):1205-1211.
86. **Mocikat,R, Braumuller,H, Gumy,A, Egeter,O, Ziegler,H, Reusch,U, Bubeck,A, Louis,J, Mailhammer,R, Riethmuller,G, Koszinowski,U, and Rocken,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.
87. **Colucci,F, Caligiuri,MA, and Di Santo,JP.** (2003)
What does it take to make a natural killer?
Nat. Rev. Immunol. 3(5):413-425.
88. **Karlhofer,FM, Ribaldo,RK, and Yokoyama,WM.** (1992)
MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells.
Nature 358(6381):66-70.
89. **Ljunggren,HG and Karre,K.** (1990)
In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.
Immunol. Today 11(7):237-244.
90. **Moretta,A, Bottino,C, Vitale,M, Pende,D, Biassoni,R, Mingari,MC, and Moretta,L.** (1996)
Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells.
Annu. Rev. Immunol. 14:619-648.
91. **Lanier,LL.** (1998)
NK cell receptors.
Annu. Rev. Immunol. 16:359-393.
92. **Long,EO.** (1999)
Regulation of immune responses through inhibitory receptors.
Annu. Rev. Immunol. 17:875-904.
93. **Ravetch,JV and Lanier,LL.** (2000)
Immune inhibitory receptors.
Science 290(5489):84-89.

94. **Moretta,A, Bottino,C, Vitale,M, Pende,D, Cantoni,C, Mingari,MC, Biassoni,R, and Moretta,L.** (2001)
Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity.
Annu. Rev. Immunol. 19:197-223.
95. **Sivori,S, Vitale,M, Morelli,L, Sanseverino,L, Augugliaro,R, Bottino,C, Moretta,L, and Moretta,A.** (1997)
p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation.
J. Exp. Med. 186(7):1129-1136.
96. **Pende,D, Parolini,S, Pessino,A, Sivori,S, Augugliaro,R, Morelli,L, Marcenaro,E, Accame,L, Malaspina,A, Biassoni,R, Bottino,C, Moretta,L, and Moretta,A.** (1999)
Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells.
J. Exp. Med. 190(10):1505-1516.
97. **Sivori,S, Pende,D, Bottino,C, Marcenaro,E, Pessino,A, Biassoni,R, Moretta,L, and Moretta,A.** (1999)
NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells.
Eur. J. Immunol. 29(5):1656-1666.
98. **Moretta,A, Biassoni,R, Bottino,C, Mingari,MC, and Moretta,L.** (2000)
Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity.
Immunol. Today 21(5):228-234.
99. **Lazetic,S, Chang,C, Houchins,JP, Lanier,LL, and Phillips,JH.** (1996)
Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits.
J. Immunol. 157(11):4741-4745.
100. **Braud,VM, Allan,DS, O'Callaghan,CA, Soderstrom,K, D'Andrea,A, Ogg,GS, Lazetic,S, Young,NT, Bell,JI, Phillips,JH, Lanier,LL, and McMichael,AJ.** (1998)
HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.
Nature 391(6669):795-799.
101. **Lee,N, Llano,M, Carretero,M, Ishitani,A, Navarro,F, Lopez-Botet,M, and Geraghty,DE.** (1998)
HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95(9):5199-5204.
102. **Lopez-Botet,M, Bellon,T, Llano,M, Navarro,F, Garcia,P, and de Miguel,M.** (2000)
Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules.
Hum. Immunol. 61(1):7-17.
103. **Raulet,DH.** (2003)
Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands.
Nat. Rev. Immunol. 3(10):781-790.

104. **Zompi,S, Hamerman,JA, Ogasawara,K, Schweighoffer,E, Tybulewicz,VL, Di Santo,JP, Lanier,LL, and Colucci,F.** (2003)
NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases.
Nat. Immunol. 4(6):565-572.
105. **Billadeau,DD, Upshaw,JL, Schoon,RA, Dick,CJ, and Leibson,PJ.** (2003)
NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway.
Nat. Immunol. 4(6):557-564.
106. **Lanier,LL, Ruitenberg,JJ, and Phillips,JH.** (1988)
Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes.
J. Immunol. 141(10):3478-3485.
107. **Mingari,MC, Ponte,M, Vitale,C, Bellomo,R, and Moretta,L.** (2000)
Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function.
Hum. Immunol. 61(1):44-50.
108. **Blery,M, Olcese,L, and Vivier,E.** (2000)
Early signaling via inhibitory and activating NK receptors.
Hum. Immunol. 61(1):51-64.
109. **Navarro,F, Llano,M, Bellon,T, Colonna,M, Geraghty,DE, and Lopez-Botet,M.** (1999)
The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells.
Eur. J. Immunol. 29(1):277-283.
110. **Vales-Gomez,M, Reyburn,HT, Erskine,RA, Lopez-Botet,M, and Strominger,JL.** (1999)
Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E.
EMBO J. 18(15):4250-4260.
111. **Augugliaro,R, Parolini,S, Castriconi,R, Marcenaro,E, Cantoni,C, Nanni,M, Moretta,L, Moretta,A, and Bottino,C.** (2003)
Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells.
Eur. J. Immunol. 33(5):1235-1241.
112. **Maier,S, Grzeschik,M, Weiss,EH, and Uibrecht,M.** (2000)
Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells.
Hum. Immunol. 61(11):1059-1065.
113. **Andre,P, Biassoni,R, Colonna,M, Cosman,D, Lanier,LL, Long,EO, Lopez-Botet,M, Moretta,A, Moretta,L, Parham,P, Trowsdale,J, Vivier,E, Wagtmann,N, and Wilson,MJ.** (2001)
New nomenclature for MHC receptors.
Nat. Immunol. 2(8):661-

114. **Winter,CC, Gumperz,JE, Parham,P, Long,EO, and Wagtmann,N.** (1998)
Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.
J. Immunol. 161(2):571-577.
115. **Colonna,M, Moretta,A, Vely,F, and Vivier,E.** (2000)
A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function.
Immunol. Today 21(9):428-431.
116. **Natarajan,K, Dimasi,N, Wang,J, Mariuzza,RA, and Margulies,DH.** (2002)
Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination.
Annu. Rev. Immunol. 20:853-885.
117. **Gumperz,JE, Barber,LD, Valiante,NM, Percival,L, Phillips,JH, Lanier,LL, and Parham,P.** (1997)
Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell- inhibitory receptor.
J. Immunol. 158(11):5237-5241.
118. **Nakajima,H, Samaridis,J, Angman,L, and Colonna,M.** (1999)
Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain.
J. Immunol. 162(1):5-8.
119. **Fanger,NA, Cosman,D, Peterson,L, Braddy,SC, Maliszewski,CR, and Borges,L.** (1998)
The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor- mediated signaling in monocytes.
Eur. J. Immunol. 28(11):3423-3434.
120. **Colonna,M, Navarro,F, Bellon,T, Llano,M, Garcia,P, Samaridis,J, Angman,L, Cella,M, and Lopez-Botet,M.** (1997)
A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.
J. Exp. Med. 186(11):1809-1818.
121. **Le Bouteiller,P and Blaschitz,A.** (1999)
The functionality of HLA-G is emerging.
Immunol. Rev. 167:233-244.
122. **Paul,P, Cabestre,FA, Le Gal,FA, Khalil-Daher,I, Le Danff,C, Schmid,M, Mercier,S, Avril,MF, Dausset,J, Guillet,JG, and Carosella,ED.** (1999)
Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies.
Cancer Res. 59(8):1954-1960.
123. **Lefebvre,S, Antoine,M, Uzan,S, McMaster,M, Dausset,J, Carosella,ED, and Paul,P.** (2002)
Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA- G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer.
J. Pathol. 196(3):266-274.

124. **Jonuleit,H, Schmitt,E, Schuler,G, Knop,J, and Enk,AH.** (2000)
Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells.
J. Exp. Med. 192(9):1213-1222.
125. **Groux,H.** (2003)
Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses.
Transplantation 75(9 Suppl):8S-12S.
126. **Chang,CC, Ciubotariu,R, Manavalan,JS, Yuan,J, Colovai,AI, Piazza,F, Lederman,S, Colonna,M, Cortesini,R, Dalla-Favera,R, and Suci-Foca,N.** (2002)
Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4.
Nat. Immunol. 3(3):237-243.
127. **Wolf,AM, Wolf,D, Steurer,M, Gastl,G, Gunsilius,E, and Grubeck-Loebenstein,B.** (2003)
Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients.
Clin. Cancer Res. 9(2):606-612.
128. **Cooper,MA, Fehniger,TA, Turner,SC, Chen,KS, Ghaheri,BA, Ghayur,T, Carson,WE, and Caligiuri,MA.** (2001)
Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset.
Blood 97(10):3146-3151.
129. **Sakaguchi,S, Sakaguchi,N, Asano,M, Itoh,M, and Toda,M.** (1995)
Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.
J. Immunol. 155(3):1151-1164.
130. **Asano,M, Toda,M, Sakaguchi,N, and Sakaguchi,S.** (1996)
Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.
J. Exp. Med. 184(2):387-396.
131. **Jordan,MS, Boesteanu,A, Reed,AJ, Petrone,AL, Hohenbeck,AE, Lerman,MA, Naji,A, and Caton,AJ.** (2001)
Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide.
Nat. Immunol. 2(4):301-306.
132. **Pacholczyk,R, Kraj,P, and Ignatowicz,L.** (2002)
Peptide specificity of thymic selection of CD4+CD25+ T cells.
J. Immunol. 168(2):613-620.
133. **Apostolou,I, Sarukhan,A, Klein,L, and von Boehmer,H.** (2002)
Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen.
Nat. Immunol. 3(8):756-763.

134. **Waldmann,H and Cobbold,S.** (1998)
How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance?
Annu. Rev. Immunol. 16:619-644.
135. **Dieckmann,D, Bruett,CH, Ploettner,H, Lutz,MB, and Schuler,G.** (2002)
Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected].
J. Exp. Med. 196(2):247-253.
136. **Jonuleit,H, Schmitt,E, Kakirman,H, Stassen,M, Knop,J, and Enk,AH.** (2002)
Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells.
J. Exp. Med. 196(2):255-260.
137. **Taams,LS, Vukmanovic-Stejic,M, Smith,J, Dunne,PJ, Fletcher,JM, Plunkett,FJ, Ebeling,SB, Lombardi,G, Rustin,MH, Bijlsma,JW, Lafeber,FP, Salmon,M, and Akbar,AN.** (2002)
Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells.
Eur. J. Immunol. 32(6):1621-1630.
138. **Jonuleit,H, Schmitt,E, Stassen,M, Tuettenberg,A, Knop,J, and Enk,AH.** (2001)
Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood.
J. Exp. Med. 193(11):1285-1294.
139. **Nakamura,K, Kitani,A, and Strober,W.** (2001)
Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.
J. Exp. Med. 194(5):629-644.
140. **Dieckmann,D, Plottner,H, Berchtold,S, Berger,T, and Schuler,G.** (2001)
Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood.
J. Exp. Med. 193(11):1303-1310.
141. **Shimizu,J, Yamazaki,S, Takahashi,T, Ishida,Y, and Sakaguchi,S.** (2002)
Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance.
Nat. Immunol. 3(2):135-142.
142. **Chambers,CA, Kuhns,MS, Egen,JG, and Allison,JP.** (2001)
CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy.
Annu. Rev. Immunol. 19:565-594.
143. **Olivares-Villagomez,D, Wensky,AK, Wang,Y, and Lafaille,JJ.** (2000)
Repertoire requirements of CD4+ T cells that prevent spontaneous autoimmune encephalomyelitis.
J. Immunol. 164(10):5499-5507.

144. **Thornton,AM and Shevach,EM.** (2000)
Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific.
J. Immunol. 164(1):183-190.
145. **Levings,MK, Sangregorio,R, and Roncarolo,MG.** (2001)
Human cd25(+)/cd4(+) regulatory T cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function.
J. Exp. Med. 193(11):1295-1302.
146. **Shevach,EM.** (2002)
CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers.
Nat. Rev. Immunol. 2(6):389-400.
147. **Piccirillo,CA, Letterio,JJ, Thornton,AM, McHugh,RS, Mamura,M, Mizuhara,H, and Shevach,EM.** (2002)
CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness.
J. Exp. Med. 196(2):237-246.
148. **Takahashi,T, Tagami,T, Yamazaki,S, Uede,T, Shimizu,J, Sakaguchi,N, Sakaguchi,S.** (2000)
Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.
J. Exp. Med. 192(2):303-310.
149. **Hori,S, Nomura,T, and Sakaguchi,S.** (2003)
Control of regulatory T cell development by the transcription factor foxp3.
Science 299(5609):1057-1061.
150. **Fontenot,JD, Gavin,MA, and Rudensky,AY.** (2003)
Foxp3 programs the development and function of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells.
Nat. Immunol. 4(4):330-336.
151. **Ramsdell,F.** (2003)
Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?
Immunity. 19(2):165-168.
152. **Bennett,CL, Brunkow,ME, Ramsdell,F, O'Briant,KC, Zhu,Q, Fuleihan,RL, Shigeoka,AO, Ochs,HD, and Chance,PF.** (2001)
A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome.
Immunogenetics 53(6):435-439.
153. **Bennett,CL, Christie,J, Ramsdell,F, Brunkow,ME, Ferguson,PJ, Whitesell,L, Kelly,TE, Saulsbury,FT, Chance,PF, and Ochs,HD.** (2001)
The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.
Nat. Genet. 27(1):20-21.

154. **Bennett,CL and Ochs,HD.** (2001)
IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena.
Curr. Opin. Pediatr. 13(6):533-538.
155. **Liyanage,UK, Moore,TT, Joo,HG, Tanaka,Y, Herrmann,V, Doherty,G, Drebin,JA, Strasberg,SM, Eberlein,TJ, Goedegebuure,PS, and Linehan,DC.** (2002)
Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma.
J. Immunol. 169(5):2756-2761.
156. **Woo,EY, Yeh,H, Chu,CS, Schlienger,K, Carroll,RG, Riley,JL, Kaiser,LR, and June,CH.** (2002)
Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation.
J. Immunol. 168(9):4272-4276.
157. **Woo,EY, Chu,CS, Goletz,TJ, Schlienger,K, Yeh,H, Coukos,G, Rubin,SC, Kaiser,LR, and June,CH.** (2001)
Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer.
Cancer Res. 61(12):4766-4772.
158. **North,RJ and Awwad,M.** (1990)
Elimination of cycling CD4+ suppressor T cells with an anti-mitotic drug releases non-cycling CD8+ T cells to cause regression of an advanced lymphoma.
Immunology 71(1):90-95.
159. **Shimizu,J, Yamazaki,S, and Sakaguchi,S.** (1999)
Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity.
J. Immunol. 163(10):5211-5218.
160. **Onizuka,S, Tawara,I, Shimizu,J, Sakaguchi,S, Fujita,T, and Nakayama,E.** (1999)
Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody.
Cancer Res. 59(13):3128-3133.
161. **Sutmuller,RP, van Duivenvoorde,LM, van Elsas,A, Schumacher,TN, Wildenberg,ME, Allison,JP, Toes,RE, Offringa,R, and Melief,CJ.** (2001)
Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses.
J. Exp. Med. 194(6):823-832.
162. **Steitz,J, Bruck,J, Lenz,J, Knop,J, and Tuting,T.** (2001)
Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma.
Cancer Res. 61(24):8643-8646.

163. **Guinan,P, Sobin,LH, Algaba,F, Badellino,F, Kameyama,S, MacLennan,G, and Novick,A.** (1997)
TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC).
Cancer 80(5):992-993.
164. **Sobin,LH, Wittekind,C, and International Union,aC.** (1997)
TNM classification of malignant tumours.
5th Edition, John Wiley and Sons, New York, 252p.
165. **Lozzio,CB and Lozzio,BB.** (1975)
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.
Blood 45(3):321-334.
166. **Schleypen,JS, Von Geldern,M, Weiss,EH, Kotzias,N, Rohrmann,K, Schendel,DJ, Falk,CS, and Pohla,H.** (2003)
Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes.
Int. J. Cancer 106(6):905-912.
167. **Schendel,DJ and Gansbacher,B.** (1993)
Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor- infiltrating lymphocytes: modulation of recognition through retroviral transduction of tumor cells with interleukin 2 complementary DNA and exogenous alpha interferon treatment.
Cancer Res. 53(17):4020-4025.
168. **Schendel,DJ, Falk,CS, Nossner,E, Maget,B, Kressenstein,S, Urlinger,S, Tampe,R, and Gansbacher,B.** (2000)
Gene transfer of human interferon gamma complementary DNA into a renal cell carcinoma line enhances MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition but suppresses non-MHC-restricted effector cell activity.
Gene Ther. 7(11):950-959.
169. **Falk,CS, Noessner,E, Weiss,EH, and Schendel,DJ.** (2002)
Retaliation against tumor cells showing aberrant HLA expression using lymphokine activated killer-derived T cells.
Cancer Res. 62(2):480-487.
170. **Robertson,MJ, Cochran,KJ, Cameron,C, Le,JM, Tantravahi,R, and Ritz,J.** (1996)
Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia.
Exp. Hematol. 24(3):406-415.
171. **Ralph,P, Moore,MA, and Nilsson,K.** (1976)
Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines.
J. Exp. Med. 143(6):1528-1533.

172. **Chomczynski,P and Sacchi,N.** (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. 162(1):156-159.
173. **Grabmaier,K, Vissers,JL, De Weijert,MC, Oosterwijk-Wakka,JC, Van Bokhoven,A, Brakenhoff,RH, Noessner,E, Mulders,PA, Merx,G, Figdor,CG, Adema,GJ, and Oosterwijk,E.** (2000)
Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250.
Int. J. Cancer 85(6):865-870.
174. **Oosterwijk,E, Ruiter,DJ, Hoedemaeker,PJ, Pauwels,EK, Jonas,U, Zwartendijk,J, and Warnaar,SO.** (1986)
Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal- cell carcinoma and absent from normal kidney.
Int. J. Cancer 38(4):489-494.
175. **Lubensky,IA, Gnarra,JR, Bertheau,P, Walther,MM, Linehan,WM, and Zhuang,Z.** (1996)
Allelic deletions of the VHL gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients.
Am. J. Pathol. 149(6):2089-2094.
176. **Massaia,M, Attisano,C, Beggiato,E, Bianchi,A, and Pileri,A.** (1994)
Correlation between disease activity and T-cell CD3 zeta chain expression in a B-cell lymphoma.
Br. J. Haematol. 88(4):886-888.
177. **Lehmann,J, Huehn,J, de la,RM, Maszyna,F, Kretschmer,U, Krenn,V, Brunner,M, Scheffold,A, and Hamann,A.** (2002)
Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99(20):13031-13036.
178. **Katagiri,A, Watanabe,R, and Tomita,Y.** (1995)
E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival.
Br. J. Cancer 71(2):376-379.
179. **Fleming,ID, American Joint Committee on Cancer, National Cancer Institute (U.S.), College of American Pathologists, American College of Radiology, American College of Surgeons, American Cancer Society, and American College of Surgeons.** (1997)
AJCC cancer staging manual.
5th Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 320p.
180. **Uhrberg,M, Valiante,NM, Shum,BP, Shilling,HG, Lienert-Weidenbach,K, Corliss,B, Tyan,D, Lanier,LL, and Parham,P.** (1997)
Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes.
Immunity. 7(6):753-763.

181. **Tafuro,S, Meier,UC, Dunbar,PR, Jones,EY, Layton,GT, Hunter,MG, Bell,JI, and McMichael,AJ.** (2001)
Reconstitution of antigen presentation in HLA class I-negative cancer cells with peptide-beta2m fusion molecules.
Eur. J. Immunol. 31(2):440-449.
182. **Falk,CS and Schendel,DJ.** (2002)
Allogeneic MHC class I ligands and their role in positive and negative regulation of human cytotoxic effector cells.
Hum. Immunol. 63(1):8-19.
183. **Groh,V, Wu,J, Yee,C, and Spies,T.** (2002)
Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T- cell activation.
Nature 419(6908):734-738.
184. **Cooper,MA, Fehniger,TA, and Caligiuri,MA.** (2001)
The biology of human natural killer-cell subsets.
Trends Immunol. 22(11):633-640.
185. **Schmielau,J and Finn,OJ.** (2001)
Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients.
Cancer Res. 61(12):4756-4760.
186. **Allez,M, Brimnes,J, Dotan,I, and Mayer,L.** (2002)
Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells.
Gastroenterology 123(5):1516-1526.
187. **Tommasini,A, Ferrari,S, Moratto,D, Badolato,R, Boniotto,M, Pirulli,D, Notarangelo,LD, and Andolina,M.** (2002)
X-chromosome inactivation analysis in a female carrier of FOXP3 mutation.
Clin. Exp. Immunol. 130(1):127-130.
188. **Vaquero,J, Coca,S, Magallon,R, Ponton,P, and Martinez,R.** (1990)
Immunohistochemical study of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphocytes of primary intracranial germinomas.
J. Neurosurg. 72(4):616-618.
189. **Zeromski,J, Dworacki,G, Kruk-Zagajewska,A, Szymeja,Z, Jezewska,E, and Kostecka,J.** (1993)
Assessment of immunophenotype of potentially cytotoxic tumor infiltrating cells in laryngeal carcinoma.
Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 41(1):57-62.
190. **Schon,MP, Arya,A, Murphy,EA, Adams,CM, Strauch,UG, Agace,WW, Marsal,J, Donohue,JP, Her,H, Beier,DR, Olson,S, Lefrancois,L, Brenner,MB, Grusby,MJ, and Parker,CM.** (1999)
Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice.
J. Immunol. 162(11):6641-6649.

191. **Cresswell,J, Robertson,H, Neal,DE, Griffiths,TR, and Kirby,JA.** (2001)
Distribution of lymphocytes of the alpha(E)beta(7) phenotype and E-cadherin in normal human urothelium and bladder carcinomas.
Clin. Exp. Immunol. 126(3):397-402.
192. **Ebert,MP, Ademmer,K, Muller-Ostermeyer,F, Friess,H, Buchler,MW, Schubert,W, and Malfertheiner,P.** (1998)
CD8+CD103+ T cells analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis.
Am. J. Gastroenterol. 93(11):2141-2147.
193. **Pauls,K, Schon,M, Kubitza,RC, Homey,B, Wiesenborn,A, Lehmann,P, Ruzicka,T, Parker,CM, and Schon,MP.** (2001)
Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes.
J. Invest Dermatol. 117(3):569-575.
194. **Wong,WK, Robertson,H, Carroll,HP, Ali,S, and Kirby,JA.** (2003)
Tubulitis in renal allograft rejection: role of transforming growth factor-beta and interleukin-15 in development and maintenance of CD103+ intraepithelial T cells.
Transplantation 75(4):505-514.
195. **Schon,MP, Schon,M, Warren,HB, Donohue,JP, and Parker,CM.** (2000)
Cutaneous inflammatory disorder in integrin alphaE (CD103)-deficient mice.
J. Immunol. 165(11):6583-6589.
196. **Cepek,KL, Shaw,SK, Parker,CM, Russell,GJ, Morrow,JS, Rimm,DL, and Brenner,MB.** (1994)
Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin.
Nature 372(6502):190-193.
197. **Richmond,PJ, Karayiannakis,AJ, Nagafuchi,A, Kaisary,AV, and Pignatelli,M.** (1997)
Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival.
Cancer Res. 57(15):3189-3193.
198. **Slaton,JW, Inoue,K, Perrotte,P, El Naggari,AK, Swanson,DA, Fidler,IJ, and Dinney,CP.** (2001)
Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma.
Am. J. Pathol. 158(2):735-743.
199. **Nojima,D, Nakajima,K, Li,LC, Franks,J, Ribeiro-Filho,L, Ishii,N, and Dahiya,R.** (2001)
CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma.
Mol. Carcinog. 32(1):19-27.

200. **Shimazui,T, Oosterwijk-Wakka,J, Akaza,H, Bringuier,PP, Ruijter,E, Debruyne,FM, Schalken,JA, and Oosterwijk,E.** (2000)
Alterations in expression of cadherin-6 and E-cadherin during kidney development and in renal cell carcinoma.
Eur. Urol. 38(3):331-338.
201. **Storkel,S and van den,BE.** (1995)
Morphological classification of renal cancer.
World J. Urol. 13(3):153-158.
202. **Yoshida,SO, Imam,A, Olson,CA, and Taylor,CR.** (1986)
Proximal renal tubular surface membrane antigens identified in primary and metastatic renal cell carcinomas.
Arch. Pathol. Lab Med. 110(9):825-832.
203. **Berman,RM, Suzuki,T, Tahara,H, Robbins,PD, Narula,SK, and Lotze,MT.** (1996)
Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice.
J. Immunol. 157(1):231-238.
204. **Seliger,B, Abken,H, and Ferrone,S.** (2003)
HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity.
Trends Immunol. 24(2):82-87.
205. **Yuen,MF and Norris,S.** (2001)
Expression of inhibitory receptors in natural killer (CD3(-)CD56(+)) cells and CD3(+)/CD56(+) cells in the peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma.
Clin. Immunol. 101(3):264-269.
206. **Stanley,AJ, Gough,MJ, Banks,RE, Selby,PJ, and Patel,PM.** (2001)
Renal carcinoma cell lines inhibit natural killer activity via the CD94 receptor molecule.
Cancer Immunol. Immunother. 50(5):260-268.
207. **Koh,CY, Blazar,BR, George,T, Welniak,LA, Capitini,CM, Raziuddin,A, Murphy,WJ, and Bennett,M.** (2001)
Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo.
Blood 97(10):3132-3137.
208. **Bukowski,RM, Rayman,P, Uzzo,R, Bloom,T, Sandstrom,K, Peereboom,D, Olencki,T, Budd,GT, McLain,D, Elson,P, Novick,A, and Finke,JH.** (1998)
Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy.
Clin. Cancer Res. 4(10):2337-2347.
209. **Della Chiesa,M, Vitale,M, Carlomagno,S, Ferlazzo,G, Moretta,L, and Moretta,A.** (2003)
The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors.
Eur. J. Immunol. 33(6):1657-1666.

210. **Ferlazzo,G, Tsang,ML, Moretta,L, Melioli,G, Steinman,RM, and Munz,C.** (2002)
Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells.
J. Exp. Med. 195(3):343-351.
211. **Seki,N, Brooks,AD, Carter,CR, Back,TC, Parsonneault,EM, Smyth,MJ, Wiltrot,RH, and Sayers,TJ.** (2002)
Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin.
J. Immunol. 168(7):3484-3492.
212. **Cai,G, Kastelein,RA, and Hunter,CA.** (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.

8. Verwendete Abkürzungen

ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
AR	Aktivierender Rezeptor
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAIX	Carboanhydrase IX
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNS	komplementäre (<i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
CML	Zell-vermittelte Lyse (<i>cell mediated lysis</i>)
CPB	Cyclophilin B
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen (<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Didesoxy-Nukleotid-tri-Phosphate
EDTA	Ethylendiamino-tetra-Acetat
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Scanner (<i>fluorescence activated cell scanner</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Streulicht (<i>forward scatter</i>)
GITR	Glukokortikoid-induzierter TNF-Rezeptor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ILT	Ig-ähnliches Transkript (<i>Ig-like transcript</i>)
IR	Inhibitorischer Rezeptor
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv (<i>immunoreceptor tyrosin-based activating motif</i>)

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibitorisches Motiv (<i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>)
KIR	<i>Killer immunoglobulin receptor superfamily</i>
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Min.	Minute
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NK-	Natürliche Killer-
NK-TIL	Tumor-infiltrierende NK-Zellen
NN	Normalparenchym der Niere
NT	Nierentumorgewebe
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RCC	Nierenzellkarzinom (<i>renal cell carcinoma</i>)
RCC-TIL	Nierenzellkarzinom-Tumor-infiltrierende Lymphozyten
Sek.	Sekunde
SSC	Seitwärts-Streulicht (<i>side scatter</i>)
Std.	Stunde
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg} -Zelle	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zelle
UICC	<i>Union Internationale Contre Le Cancre</i>
VHL	Von-Hippel-Lindau

9. Danksagung

In erster Linie möchte ich Frau Prof. Dolores Schendel danken, die mir dieses spannende Projekt anvertraut hat. Sie hat mir ermöglicht, diese Arbeit sehr selbstständig durchzuführen, hatte für alle Probleme jederzeit ein offenes Ohr und hat sich für Besprechungen, Fragen und Korrekturen jedes Mal sehr viel Zeit genommen.

Bei Herrn Prof. Thomas Cremer möchte ich mich sehr herzlich für die Betreuung dieser Arbeit auf Seiten der Hochschule bedanken. Mir ist bewusst, dass dies für ihn viel zusätzliche Arbeit bedeutet und ich freue mich sehr, dass er seine Zusage für meine Betreuung trotzdem sofort gegeben hat.

Ganz besonders möchte ich meiner Betreuerin Heike Pohla danken, die mir einerseits ermöglicht hat seit Beginn der Arbeit sämtliche Entscheidungen selbst zu treffen und trotzdem bei jedem auftauchenden Problem zur Stelle war. Ihr Vertrauen in meine Arbeit hat mich angespornt und motiviert. Die Arbeit mit ihr und unserer gesamten Gruppe hat mir unglaublich viel Spaß gemacht, nicht zuletzt weil mir jeder einzelne Mitarbeiter sowie alle weiteren Mitarbeiter des Labors für Tumorimmunologie in den letzten drei Jahren sehr ans Herz gewachsen sind. Ihnen habe ich es zu verdanken, dass ich jeden Tag mit Freude in die Arbeit gekommen bin. Für die direkte Hilfe bei dieser Arbeit muss einigen Personen natürlich namentlich gedankt werden. Alle technischen Probleme, Neuerungen und Verbesserungen wurden mir sehr aufopfernd von Alex Buchner erklärt, der eine unglaubliche Hilfsbereitschaft an den Tag legt. Nicht nur die Immunhistochemie und deren optimale Darstellung und Beurteilung habe ich von Rainer Riesenberg und von Roswitha Fischer gelernt. Bei theoretischen Fragen und Diskussionen war mir Robert Kammerer immer eine sehr große Hilfe. Birgit Stadlbauer, Birgit Konkol und Roswitha Fischer haben mir sehr viele Techniken beigebracht; ohne ihre Hilfe würde kein einziger Tag im Labor funktionieren. Leider hat uns Silke Raffegerst vor einiger Zeit wegen höherer Ziele verlassen. Sie hat entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen, wofür ich mich sehr bei ihr bedanken möchte.

Im Institut für Anthropologie und Humangenetik möchte ich Frau Prof. E. Weiß und Nicole Kotzias danken, die mir die K562-Transfektanten für die Untersuchung der NK-Zellen zur Verfügung gestellt haben. Frau Prof. Weiß hat sich zudem dazu bereit erklärt, das Gutachten für meine Dissertation zu übernehmen, wofür ich mich sehr bedanken möchte.

Besonderer Dank gilt weiterhin Karl Rohrmann und Michael Siebels im Klinikum Großhadern für ihre Geduld und stetige Hilfe. Ich bin ihnen mit meinen zahlreichen Anrufen auf der Suche nach Blut und Tumorgewebe sicherlich oft auf die Nerven gegangen. Selbstverständlich möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Patienten und weiteren freiwilligen Blutspendern bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu meinem Glück durfte ich nicht nur im Labor für Tumorimmunologie arbeiten, sondern auch im Institut für Molekulare Immunologie an der GSF. Ich habe mich dort genauso wohl gefühlt wie im Haus nebenan. In erster Linie habe ich das Chris Falk zu verdanken. Sie hat mich in einer frustrierenden Phase über die Maßen unterstützt und in ein neues Projekt sehr viel Zeit investiert. Ich möchte mich auch sehr für die zusätzliche Korrektur der Arbeit bei ihr bedanken und vor allem für die unglaubliche Hilfe bei der Anfertigung unserer Publikation. Auch die Hilfe von Barbara Mosetter und Marion von Geldern habe ich oft in Anspruch genommen, die für beide jederzeit selbstverständlich war. Elfriede Nößner war mir ebenfalls oftmals eine sehr große Hilfe. Ich konnte jederzeit zu ihr kommen und habe von unseren Diskussionen und ihren Anregungen sehr profitiert. Besonders danken möchte ich auch David Anz, der die immunhistochemischen Färbungen von Perforin und CD3 ζ durchgeführt hat, die in dieser Arbeit gezeigt sind, und auch bei Nicole Baur, die mir die intrazelluläre Färbung beider Moleküle beigebracht hat.

DANKSAGUNG

Neben der direkten Hilfe bei dieser Arbeit möchte ich meine Freundinnen besonders hervorheben, die mir die ganze Zeit über nicht nur in der Arbeit sehr wichtig geworden sind, sondern vor allem bei allen täglichen Problemen unverzichtbar waren und es noch immer sind. Mit Birgit, Birte, Sybille, Silke und Malu habe ich nicht nur sehr viel Spaß gehabt, sie haben sich auch unendlich oft um mich gekümmert und oft Aufbau-Arbeit geleistet. Es war ein großes Glück mein ganzes Studium über meine Freundin Malu in meiner Nähe zu haben. Ich hoffe, sie verzeiht mir, dass ihr Spitzname dank mir noch immer weit verbreitet ist.

Selbstverständlich haben auch Menschen außerhalb des Labors einen entscheidenden Anteil an dieser Arbeit. Chrissie, Nina, Helena und Nicola haben mir immer wieder sehr geduldig viele Ratschläge gegeben, mich aufgemuntert und es so irgendwie immer geschafft, mich noch mehr für meine Arbeit zu begeistern.

Den größten Anteil außerhalb der eigentlichen praktischen Arbeit hatten sicherlich Ralph und Peter und müssen an dieser Stelle gemeinsam erwähnt werden. Sie haben beide im Zusammenhang mit meiner Arbeit sehr viel ertragen und mich vor allem ganz selbstverständlich bei sämtlichen Problemen verstanden und unterstützt.

Peter hat unermüdlich die letzte Korrektur meiner Arbeit übernommen und mir durch seine Anwesenheit die nötige Ruhe und durch seine Ratschläge die nötige Hilfe vermittelt, diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Diese Danksagung mag den allgemein üblichen Rahmen sprengen. Für mich wird es allerdings die einzige Dissertation und zum Abschluss meiner so langen Ausbildung auch die einzige Möglichkeit bleiben mich wenigstens bei den wichtigsten Personen zu bedanken. (Und es gibt noch viele weitere, die aufgezählt werden müssten!)

Nicht zuletzt möchte ich vor allem meiner Familie danken. Die tatsächliche Durchführung und Vollendung dieser Dissertation muss meinen Eltern zugeschrieben werden. Ich möchte ihnen für ihren unverhältnismäßigen Glauben an meine Fähigkeiten und für alles was sie mir mein ganzes Leben ermöglicht haben von ganzem Herzen danken.

Ich widme ihnen diese Arbeit, weil sie nur in Verbindung mit ihnen gesehen werden darf.

10. Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Sophie Schleypen
Geburtstag/-ort	31.07.1976, in München
Adresse	Geyerstraße 50, 80469 München
Email	julia@schleypen.de
Eltern	Vera Schleypen-Leonhardt, Ernährungsberaterin und Klaus Schleypen, Arzt
Geschwister	Mischa, Anna, Martin
Familienstand	ledig

Ausbildung

Abitur	1995 am Städtischen Luisengymnasium in München, Leistungskurse Englisch und Biologie, Durchschnittsnote 1,7
Studium	1995-2000 Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abschlussnote 1,2
	Hauptfach Humangenetik
	Nebenfächer Genetik, Mikrobiologie, Immunologie
	Diplomarbeit Institut für Anthropologie und Humangenetik (Prof. Dr. T. Cremer), <i>„Ansätze für eine allel- spezifische Fluoreszenz-in situ Hybridisierung aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster zweier Allele“</i> , Note 1,1
Promotion	seit 01.01.2001 an der <i>GSF- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH</i> (Institut für molekulare Immunologie, Prof. Dr. D. Schendel) und dem <i>Labor für Tumorimmunologie</i> der Urologischen Abteilung am Klinikum Großhadern (Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. A. Hofstetter) im Rahmen der Klinischen Kooperationsgruppe „Immuntherapie bei Urologischen Tumoren“ (Dr. H. Pohla)
	Thema der Dissertation <i>„Mechanismen der funktionellen Inaktivierung tumor- infiltrierender Lymphozyten am Beispiel des Nierenzellkarzinoms“</i> , (Bestandteil des durch den Strategiefond der Helmholtz Gesellschaft geförderten Forschungsverbundes „Immune Therapy and Gene Therapy of Cancer“)
	Vorträge <i>Urologischer Winterworkshop 2003,</i> Maria Alm, Österreich <i>Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie</i> , Berlin 2003

weitere Tätigkeiten	<p>Teilnahme an der <i>FEBS Summer School on Cancer Immunology and Immunotherapy</i>, Ionian Village, Griechenland 2003</p> <p>2001-2003 Betreuung des jährlichen Immunologie-Praktikums für Biologiestudenten am Institut für Immunologie, LMU München</p> <p>2002 Betreuung zweier Abiturienten (Drittplatzierte und Praktikumsgewinner an der GSF im Rahmen des „Jugend forscht“-Wettbewerbes)</p> <p>2003 Betreuung eines Biochemiestudenten im Rahmen seines Praxissemesters an der GSF, Institut für molekulare Immunologie</p>
---------------------	---

Weitere Tätigkeiten

WebDesign	<p>2000 Erstellung einzelner Künstlerseiten im Rahmen des Internetauftrittes für die Virgin Schallplatten GmbH</p> <p>seit 2000 Erstellung und Betreuung des Internetauftrittes einzelner Immobilienfirmen und Privatpersonen</p>
-----------	---

Mitgliedschaften

Mitglied in der *Deutschen Gesellschaft für Immunologie*
 Mitglied im *Verband deutscher Biologen*

Qualifikationen

Sprachen	<p>Englisch, fließend</p> <p>Italienisch, sehr gute Kenntnisse</p> <p>Französisch, Grundkenntnisse</p>						
EDV	<table border="0"> <tr> <td>Programmierung</td> <td>Html, Java, Flash</td> </tr> <tr> <td>Grafik</td> <td>Adobe Photoshop, Corel Photopaint</td> </tr> <tr> <td>weiteres</td> <td>MS Office u.a.</td> </tr> </table>	Programmierung	Html, Java, Flash	Grafik	Adobe Photoshop, Corel Photopaint	weiteres	MS Office u.a.
Programmierung	Html, Java, Flash						
Grafik	Adobe Photoshop, Corel Photopaint						
weiteres	MS Office u.a.						

Veröffentlichungen

Stover CM, Schleypen J, Gronlund J, Speicher MR, Schwäble WJ, und Holmskov U.
 Assignment of CD163B, the gene encoding M160, a novel scavenger receptor, to human chromosome 12p13.3 by in situ hybridisation and somatic cell hybrid analysis
 Cytogenet. Cell Genet. 90:246- 247. (2000)

Schleypen J, von Geldern M, Rohrmann K, Kotzias N, Schendel DJS, Falk CS, und Pohla H.
 Renal cell carcinoma infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes
 Int. J. Cancer 106:905-912. (2003)