

Aus der Medizinischen Poloklinik – Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

komm. direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

und

aus dem Institut für Molekulare Immunologie

Leiterin: Prof. Dolores Schendel

HMGU-München

Die molekulare Quantifizierung von NK-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom  
und die Bedeutung von CCL5 in NK-Zellen und für die Phagozytose

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

vorgelegt von

Judith Hosse

aus Bad Homburg v.d.H.

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Peter Nelson

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr Wolfgang Neuhofer

Prof. Dr. Helmut Diepolder

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. rer. nat. Elfriede Nößner

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2009



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems	1
1.1.1 Natürliche Killer-Zellen	2
1.1.1.1 NK-Zellsubpopulationen	2
1.1.1.2 Regulation der NK-Zellaktivität	4
1.1.1.3 Die Effektormechanismen der NK-Zellen	6
1.1.1.4 Die Bedeutung von NK-Zellen in patho-physiologischen Prozessen	6
1.1.2 Makrophagen	7
1.1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren	8
1.1.3.1 CCL5	9
1.1.3.2 CX3CL1	10
1.2 Das klarzellige Nierenzellkarzinom	11
1.2.1 Charakteristika	11
1.2.2 Therapie	13
1.3 Aufgabenstellung	14

<b>2 Material</b>	<b>16</b>
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien	17
2.3 Zellkultur	18
2.3.1 Zusätze	18
2.3.2 Medien	19
2.3.3 Pufferlösungen	21
2.4 Zelllinien	22
2.5 Antikörper	23
2.5.1 Primärantikörper	23
2.5.2 Sekundärantikörper	24
2.6 Proteinbestimmung	25
2.6.1 Zytokin und Chemokin Bestimmungen	25
2.6.1.1 Puffer	25
2.6.1.2 Reagenziensysteme	25
2.7 Molekularbiologie	26
2.7.1 Primer/Sonden für Taqman-basierte quantitative „real-time“ (echtzeit) PCR (qRT-PCR)	26
2.7.2 Enzyme	27
2.7.3 Reagenziensysteme	28
2.7.4 Sonstige Reagenzien	28

2.8 Immunfluoreszenz	29
2.8.1 Lösungen und Puffer	29
2.9 Immunhistochemie	30
2.9.1 Lösungen und Puffer	30
2.10 Patientenmaterial	31
2.10.1 Tumorgewebe	31
2.10.2 Kontrollgewebe	33
2.11 Blutproben	34
<b>3 Methoden</b>	<b>35</b>
3.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur	35
3.1.1 Allgemeine Bemerkungen	35
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	35
3.1.3 Einfrieren von Zellen	35
3.1.4 Auftauen von Zellen	36
3.1.5 Kultivierung von adhärennten Zelllinien	36
3.1.6 Kultivierung von Suspensionszelllinien	36
3.1.7 Isolation von PBMCs aus Vollblut	37
3.1.8 Isolierung von Natürlichen Killerzellen aus PBMC	37
3.1.9 Kultivierung von T-Zellen	38
3.2 Bestimmung des Zytokingehalts in Zellkulturüberständen und Lysaten	40
3.2.1 Nachweis von Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA	40
3.3 Stimulation von NK-Zellen	42

3.4	Durchflusszytometrie	43
3.4.1	Allgemeines	43
3.4.2	Unterscheidung von lebenden und toten Zellen	45
3.4.3	Färbung von Markern auf der Zelloberfläche	46
3.4.4	Nachweis intrazellulärer Proteine	46
3.4.5	Auswertung der Färbungen am Durchflusszytometer	47
3.5	Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen	48
3.5.1	Färbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	48
3.5.2	Induktion der Apoptose in CHO-Zellen	48
3.5.3	Phagozytose apoptotischer Zellen	49
3.5.4	Bestimmung der Phagozytoseaktivität	49
3.6	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	51
3.6.1	Allgemeine Bemerkungen	51
3.6.2	Anfertigung von Kryoschnitten	51
3.6.3	Immunhistochemische Färbung mittels der APAAP-Methode	51
3.6.4	Auswertung	53
3.7	Immunfluoreszenzfärbung von aufgetropften Zellen	54
3.7.1	Allgemeines	54
3.7.2	Immunfluoreszenzfärbung	54
3.7.3	Auswertung mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie	55

3.8 Molekularbiologie	56
3.8.1 Isolierung von mRNA aus Gewebe	56
3.8.1.1 Messung des RNA-Gehalts	56
3.8.2 cDNA-Synthese	57
3.8.3 Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)	58
3.8.3.1 Allgemeine Grundlagen	58
3.8.3.2 Die quantitative Echtzeit („real-time“) reverse Transkriptase (RT)-PCR	58
3.8.3.3 Durchführung	59
3.8.3.4 Quantifizierung	60
3.8.3.5 Comperative Ct-Methode	61
3.9 Statistische Auswertung	62
3.9.1 Verwendete Programme	62
3.9.2 Verwendete statistische Testverfahren	62
3.9.2.1 Mann-Whitney-U Test	62
3.9.2.2 „Receiver Operator-Characteristic“ Analyse	63
3.9.2.3 Korrelationsanalyse nach Spearman	64
3.9.2.4 Kontingenzanalyse	64
3.9.2.5 Überlebensanalyse	65

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>66</b>
4.1 Das Chemokin CCL5 in NK-Zellen	66
4.1.1 Die Proteinmenge des Chemokins CCL5 in NK-Zellen	66
4.1.2 Die Proteinstabilität des Chemokins CCL5 in NK-Zellen	70
4.1.3 Die Bedeutung der Transkription für die Proteinmenge des Chemokins CCL5	72
4.1.4 Die Regulation der konstitutiven Transkription von CCL5 in primären NK-Zellen	73
4.1.5 Die Sekretion von CCL5 durch NK-Zellen	74
4.1.6 Die intrazelluläre Lokalisation von CCL5 in NK-Zellen	79
4.2 Die Rolle des Chemokins CCL5 bei der Phagozytose apoptotischer Zellen	87
4.2.1 Vorarbeiten	87
4.2.2 Einfluss von CCL5 auf die Phagozytose durch Maus-Makrophagen	87
4.3 NK-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom	91
4.3.1 Das molekulare Profil des Tumormilieus	92
4.3.1.1 Die Transkriptmenge von Lymphozytenmarkern in Normalnierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe	92
4.3.1.2 Die Transkriptmenge verschiedener Chemokine in Normalnierengeweben und Nierenzellkarzinomen	94
4.3.1.3 Die Transkriptmenge verschiedener Zytokine in Normalnierengeweben und Nierenzellkarzinomen	96

4.4 Bestimmung des Anteils der NK-Zellen am Lymphozyteninfiltrat im Gewebe	97
4.4.1 NKp46, CD56 und Perforin als molekulare Marker zur Quantifizierung der Häufigkeit von NK-Zellen in einer gemischten Lymphozytenpopulation	97
4.4.2 Einfluss von Indolamin-2,3-dioxygenase und TGF- $\beta$ auf die Transkriptmenge von NKp46, Perforin und CD56	99
4.4.3 Diskriminierung von NK <sup>high</sup> und NK <sup>low</sup> Tumoren mittels der Transkriptmenge von NKp46, CD56 und Perforin	103
4.4.4 Diskriminierung von NK <sup>high</sup> und NK <sup>low</sup> Tumoren mittels der Transkriptmenge von Chemokinen	108
4.4.5 Diskriminierung von NK <sup>high</sup> und NK <sup>low</sup> Tumoren mittels der Transkriptmenge von Zytokinen	112
4.4.6 Multivariate Datenanalyse	114
4.5 Immunhistologische Quantifizierung des Immuninfiltrates in Nierenzellkarzinomgewebe	117
4.6 Zusammenhang zwischen dem prozentualen Gehalt an NK-Zellen im Lymphozyteninfiltrat bzw. dem molekularen Profil und Überleben von RCC-Patienten	120
4.6.1 Einfluss von klinischen und pathologischen Parametern auf das Überleben von RCC-Patienten	120
4.6.2 Einfluss des prozentualen NK-Zellgehalts am Lymphozyteninfiltrat auf das Überleben von RCC-Patienten	121
4.6.3 Einfluss des molekularen Profils auf das Überleben der RCC-Patienten	122
4.6.3.1 Einteilung der Patienten nach dem Medianen der Transkriptmenge	122
4.6.3.2 Einteilung der Patienten basierend auf den Cut-off-Werten der ROC-Analyse	123

<b>5 Diskussion</b>	<b>125</b>
5.1 CCL5 ist konstitutiv exprimiert in ruhenden NK-Zellen und kolokalisiert mit Rab5	125
5.2 Die Rolle des Chemokins CCL5 für die Phagozytose von Makrophagen	128
5.3 Das klarzellige Nierenzellkarzinom zeigt ein komplexes Profil an Zytokinen, Chemokinen und Lymphozytenmarker	129
5.4 Der Anteil an NK-Zellen im Immunzellinfiltrat des Nierenzellkarzinoms lässt sich an Hand der Transkriptmenge von NKp46, Perforin, CX3CL1 und CX3CR1 quantifizieren	131
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>135</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>137</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>144</b>
8.1 JNK MAPK Pathway Regulates Constitutive Transcription of CCL5 by Human NK Cells through SP-1	144
<b>9 Abkürzungen</b>	<b>145</b>
<b>10 Danksagung</b>	<b>147</b>
<b>11 Lebenslauf</b>	<b>148</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems

Das menschliche Immunsystem gliedert sich in zwei engverbundene Teile, das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem erkennt körperfremde Strukturen über allgemeine keimbahnkodierte Struktur-Erkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRR), die konservierte Strukturen erkennen, die auf zahlreichen Pathogenen zu finden sind (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), besitzt aber keine Antigen-spezifischen Mechanismen und führt zu keiner klassischen Gedächtnisfunktion. Diese letztgenannten Eigenschaften unterscheidet die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems von denen des erworbenen Immunsystems.

Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem ist das angeborene Immunsystem in der Lage ohne oder mit nur sehr kurzer Vorlaufzeit auf Infektionen zu reagieren. Es stellt also eine erste Barriere dar, um die Ausbreitung von Pathogenen zu verhindern, und falls dies scheitert die Infektion solange in Schach zu halten bis das angeborene Immunsystem zum Einsatz bereit ist. Weiterhin ist das angeborene Immunsystems an der Abschaltung der Immunantwort und der Beseitigung von abgetöteten Pathogenen und Körperzellen beteiligt.

Seine Aufgaben erfüllt das angeborene Immunsystem auf vielschichtige Weise. So stellt schon die Epithelschicht des Körpers eine mechanische Barriere dar, die durch den festen Verbund der Zellen und dem kontinuierlichen Strom von Flüssigkeiten oder Luft über das Epithelium ein Eindringen von Krankheitserregern verhindert. Auf der Oberfläche der Epithelien verhindern Enzyme und antibakterielle Peptide neben dem sauren pH-Wert das Wachstum von Bakterien auf chemische Weise. Aber auch die körpereigene bakterielle Flora, verhindert dass sich Pathogene auf Epithelien vermehren, indem sie mit ihnen um Nährstoffe und „Platz“ konkurrieren. Dringen trotzdem Pathogen ein, treffen sie in den Geweben auf eine Reihe von Effektorzellen und --moleküle. Phagozyten, wie Makrophagen, können Pathogene schnell erkennen, aufnehmen und verdauen. Durch die Ausschüttung von Chemokinen locken sie weitere Phagozyten, die polymorphkernigen Neutrophilen an und erleichtern ihnen über Zytokine den Eintritt in das Gewebe. Für den Fall, dass sich ein Pathogen im Blut befindet, kann das Komplementsystem über ein System von löslichen und membranhaftenden Faktoren

Krankheitserreger für die Effektorzellen des Immunsystems markieren, Effektorzellen anlocken und aktivieren. Sollte es nicht möglich sein das Pathogen über die Mechanismen des angeborenen Immunsystems zu eliminieren, so wird das angeborene Immunsystem aktiviert.

Dies erfolgt vor allem durch die Dendritischen Zellen aber auch Makrophagen, die Pathogen aufnehmen und zu Antigenpeptiden prozessieren können, welche sie nach Abwandern vom Gewebe in den Lymphknoten über MHC-Moleküle den T- und B-Zellen präsentieren und sie so aktivieren. Dendritischen Zellen aktivieren auch die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), die auch dem angeborenen Immunsystem angehören. Nachdem ein Pathogen erfolgreich eliminiert wurde, ist es Aufgabe der Phagozyten Überreste der Krankheitserreger und abgestorbene Körperzellen zu beseitigen und durch die Ausschüttung von Zytokinen zu signalisieren, dass eine weitere Aktivierung des Immunsystems nicht mehr erforderlich ist [1].

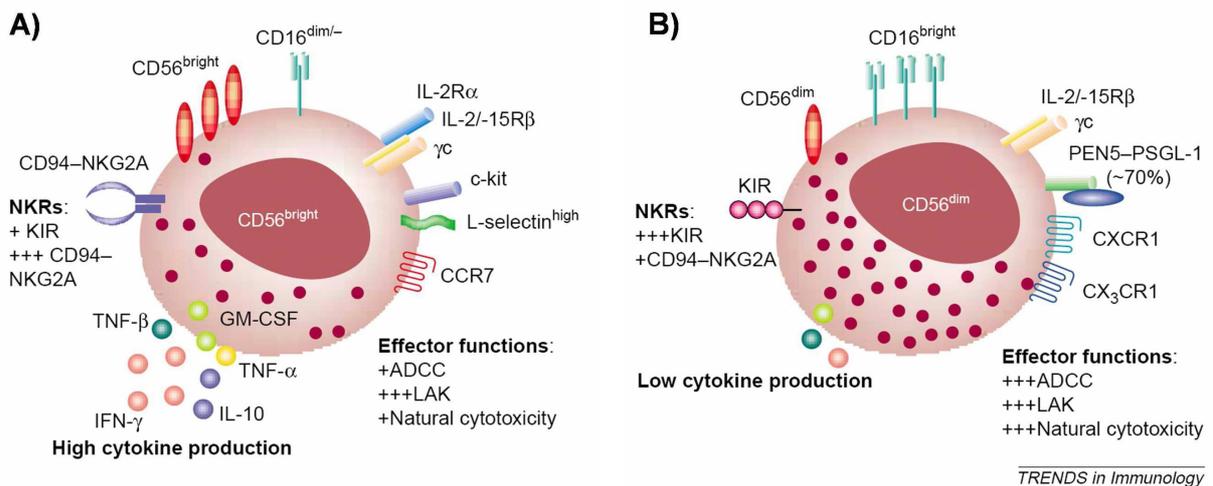
### 1.1.1 Natürliche Killer-Zellen

NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten des angeborenen Immunsystems und machen ca. 15% der zirkulierenden Lymphozyten im Blut aus. Ihre Hauptfunktion ist das Abtöten von infizierten Zellen oder Tumorzellen mittels zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforin, Granzym A und B. oder mittels FAS-Signalwegen. Über die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, nehmen sie auch Einfluss auf das angeborene Immunsystem und den Verlauf einer Immunantwort.[2]

#### 1.1.1.1 NK-Zellsubpopulationen

Es gibt ca. 48 unterschiedliche NK-Zellsubtypen, deren Gemeinsamkeit die fehlende Expression von CD3 bei gleichzeitiger Expression von CD16 und/oder CD56 ist [3]. Außerdem zeichnen NK-Zellen sich zusätzlich durch die Expression des natürlichen Zytotoxizitätsrezeptor NKp46 (NCR1) aus [4]. Über die Stärke der CD16, CD56 und NKp46 Expression werden NK-Zellen in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Die CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> werden klassischer Weise als zytotoxische NK-Zellen bezeichnet, mit niedriger Dichte an CD56 (CD56<sup>dim</sup>) und NKp46 (NKp46<sup>low</sup>) und hoher Dichte an CD16 (CD16<sup>bright</sup>) und die

zytokinproduzierenden NK-Zellen die eine hohe Dichte an CD56 und NKp46 aber nur eine geringe Dichte an CD16 haben (Abb. 1.1.1.1). Im peripheren Blut stellen die CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen 95% aller NK-Zellen, während die CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen die Hauptpopulation in den sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten bilden [2;4;5]. Man geht davon aus, dass NK-Zellen in den sekundären Lymphorganen differenzieren und deswegen die CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>NKp46<sup>bright</sup> Population die Ausgangspopulation der NK darstellt, die im Lymphknoten wartet bis ein Makrophage oder eine reife Dendritische Zelle in den Lymphknoten einwandert und sie dort aktiviert. Entscheidend für eine NK-Zellaktivierung ist das Zytokine IL-12, dass zusammenwirken kann mit den Zytokinen IL-1, IL-2, IL-15 oder IL-18 oder Rezeptoren wie CD16 (FcγRIIIa) oder NKG2D [5]. Die Aktivierung führt zu einer schnellen Expansion und einer Anhäufung von NK-Zellen in den ableitenden Lymphknoten. NK-Zellen sind eine der ersten Quellen für Zytokine wie IFN-γ und TNF-α. Über die Sekretion von IFN-γ können NK-Zellen den Verlauf einer Immunantwort dahingehend beeinflussen, dass CD4 T-Zellen zu inflammatorischen Th1 Zellen differenzieren. Über IFN-α und IFN-β inhibieren NK-Zellen die virale Replikation in infizierten Zellen und ihren Nachbarzellen. Auch können sie T-Zellen und B Zellen über CD40-Ligand bzw. OX40-Ligand kostimulieren [3]. NK-Zellen produzieren auch zahlreiche Chemokine wie CCL3, CCL4 und CCL5, und fördern so den Einstrom weiterer Immunzellen [6].



**Abbildung 1.1.1.1:** Eigenschaften der A) CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> und B) CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellpopulation. Modifiziert nach Cooper et al. [2].

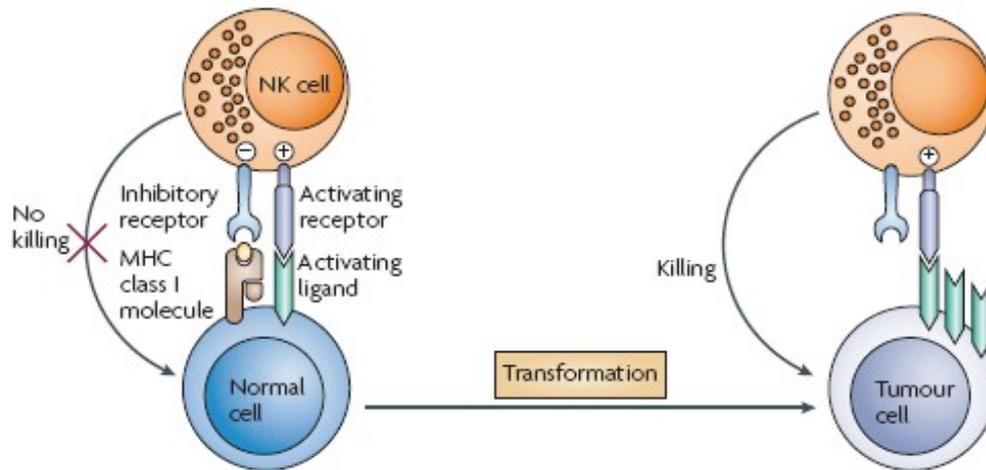
### 1.1.1.2 Regulation der NK-Zellaktivität

NK-Zellen besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren, um ihre Zielzelle zu erkennen. Sie unterscheiden gesunde körpereigene Zellen von körperfremden oder infizierten bzw. entarteten körpereigenen Zellen über ein System aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, die mit MHC-I-Molekülen und anderen Oberflächenmolekülen auf der Zielzelle interagieren (Tabelle 1.1.1.1).

- inhibierende Rezeptoren -		- aktivierende Rezeptoren -	
Rezeptor	Ligand	Rezeptor	Ligand
KIR2DL1	HLA-Cw2, 4, 5, 6	KIR2DS1	HLA-Cw2, 4, 5, 6
KIR2DL2	HLA-Cw1, 3, 7, 8	KIR2DS2	HLA-Cw1, 3, 7, 8
KIR3DL1	HLA-Bw4	NKG2D	ULBPs, MICA, MICB
KIR3DL4	HLA-G	NKp30	BAT-3
NKG2A/CD94	HLA-E	NKp44	virales Haemagglutinin
LIR1/ILT2	HLA-G	NKp46	virales Haemagglutinin
LIR2/ILT4	HLA-F	2B4	CD48
LAIR1	Collagen	CD16	IgG

**Tabelle 1.1.1.1: Eine Auswahl an inhibierenden und aktivierenden NK-Rezeptoren und ihrer Liganden**

MHC-Klasse I-Moleküle inhibieren die NK-Zellaktivität, indem sie durch Interaktion mit Rezeptoren auf NK-Zellen einen inhibitorischen Signalweg auslösen. Im Umkehrfall, also beim Fehlen von MHC-Klasse I-Molekülen werden NK-Zellen nicht inhibiert und können die Zellen ohne MHC-Klasse I-Moleküle abtöten. Dieses Prinzip ist als „*Missing-self-Hypothesis*“ der NK-Zellaktivierung beschrieben [7]. In der Regel dominiert das inhibierende Signal über das aktivierende Signal um Autoimmunreaktionen zu verhindern. Viele Viren und Tumore regulieren MHC-Moleküle von der Oberfläche ab, um so einer Erkennung durch das adaptive Immunsystem zu entgehen, werden gleichzeitig aber sensitiv gegenüber einer NK-Zellenerkennung (Abb. 1.1.1.2).



**Abbildung 1.1.1.2: „Missing-self“-Hypothese bei der Erkennung von Tumorzellen.** Auf der linken Seite ist die Erkennung einer gesunden Körperzelle durch NK-Zellen dargestellt. Durch die Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle wird die NK-Zelle inhibiert. Nach Transformation der Zelle zur einer Tumorzelle (rechts) fehlt das inhibierende Signal durch das MHC-Klasse I Molekül und die NK-Zelle kann durch aktivierende Liganden zum Abtöten der Tumorzelle aktiviert werden. [7]

Die Interaktion zwischen NK-Zelle und MHC-Klasse I Molekül erfolgt über Rezeptoren auf der NK-Zelle, die in mehrere Hauptfamilien unterteilt werden. Die erste Familie ist die *killer cell Ig-like* Rezeptor Superfamilie (KIR), deren Rezeptoren vor allem HLA-A, -B, -C Moleküle erkennen. KIR-Rezeptoren kommen in zwei verschiedenen Formen vor: die inhibierende Form, welche durch einen langen zytoplasmatischen Anteil gekennzeichnet ist, der ein *immunreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) enthält, und die aktivierende Form, die nur einen kurzen zytoplasmatischen Anteil besitzen über den sie mit dem Adaptermolekül DAP12 interagiert. DAP12 enthält ein ITAM (*immunreceptor tyrosine-based activating motife*), so dass diese KIR-Rezeptoren aktivierend wirken. Dieser Unterschied schlägt sich in der Nomenklatur der KIR-Rezeptoren wieder, wobei die inhibierenden Rezeptoren ein L für „long“ (KIR2DL1) und die aktivierenden Rezeptoren ein S für „short“ im Namen enthalten (KIR2DS1) [3]. Die zweite Familie der NK-Rezeptoren gehört zur C-Typ-Lectin Superfamilie. Ein Mitglieder ist NKG2A, das mit CD94 ein Heterodimer bildet und bei Erkennung des MHC-Klasse-Ib Molekül HLA-E einen inhibitorischen Signalweg auslöst. Ein weiteres Mitglied ist NKG2D, ein aktivierender Rezeptor, welcher sein Signal mit Hilfe des Adaptermoleküls DAP10 auslöst und die stressinduzierten Proteine MICA und MICB erkennt [8]

Die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR) sind eine weitere Familie von aktivierenden NK Rezeptoren. Zu dieser Familie gehören die Rezeptoren NKp30 (NCR3), NKp44 (NCR2) und NKp46 (NCR1) deren zelluläre Liganden weitest gehend unbekannt sind. Man weiß aber das sowohl NKp44 als auch NKp46 virales Hämagglutinin erkennen und NKp30 lösliches BAT-3 bindet [9]. NKp30 und NKp46 werden auf allen NK-Zellen exprimiert während NKp44 nur auf aktivierten NK-Zellen nachweisbar ist [10].

Außerdem gibt es noch die Familie der „*Ig-like transcript*“ (ILT)-Rezeptoren, die HLA-G und -F Moleküle erkennen und zu den inhibierenden Rezeptoren gehören. Weitere wichtige aktivierende Rezeptoren sind das 2B4-Molekül und der CD16-Rezeptor [8;10].

### 1.1.1.3 Die Effektormechanismen der NK-Zellen

Zu den Effektormechanismen, die von NK-Zellen benützt werden um eine Zielzelle zu lysieren, gehört die Lyse durch gespeicherte Zytotoxine Perforin und die Serinproteasen Granzym A und Granzym B. Diese werden über einen synaptischen Kontakt in die Zielzelle übertragen [1]. Die über CD16 vermittelte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ist ein weiterer Mechanismus der NK-Zellzytotoxizität, welcher möglicherweise für die antitumoralen Effekte von therapeutischen Antikörpern (Retuximab und Trastuzumab) verantwortlich sein könnte [5]. Die Fas-vermittelten Effektormechanismen spielen dagegen eine eher untergeordnete Rolle in der NK-Zellzytotoxizität [3].

### 1.1.1.4 Die Bedeutung von NK-Zellen in patho-physiologischen Prozessen

Der den NK-Zellen eigene Regulationsmechanismus der Inhibition über MHC-Klasse I Moleküle verhindert eine Erkennung körpereigener Zellen und ermöglicht die Erkennung von Zellen mit aberranter MHC-I Expression sollten diese gleichzeitig aktivierende Liganden, wie z.B. MICA exprimieren. Viren und Tumorzellen versuchen durch Abregulation von MHC-Klasse I-Molekülen der T-Zell vermittelten Erkennung zu entgehen, werden aber gleichzeitig vulnerabel gegenüber NK-Zellen. In der Tat gibt es korrelative Hinweise, dass eine höhere Anzahl an intratumoralen NK-Zellen im Magenkarzinom mit einer besseren Prognose und

weniger Metastasen im Lymphknoten korreliert [11;12]. Weiter Beispiele für Tumoren in denen die Menge der NK Zellen mit der Prognose korreliert sind das kleinzellige Bronchialkarzinom und das Colorektal Karzinom [12-14].

Bei Viruserkrankungen wie z.B. HIV (humanes Immundefizienzvirus), wurde eine Korrelation zwischen geringer Anzahl an NK-Zellen und schnellem Progress beschrieben [3;15;16] und bei Infektionen mit dem Hepatitis-C Virus (HCV) scheint ein hoher Gehalt an NK-Zellen die rasche Beseitigung des Virus zu unterstützen [3;17].

In der Desidua von Schwangeren stellen NK-Zellen 70% der Lymphozyten. Sie gehören dem Subtyp der zytokinproduzierenden NK-Zellen an und haben regulatorische Eigenschaften, indem sie die antigenpräsentierenden Eigenschaften von Dendritischen Zellen unterdrücken. Eine Störung dieser regulatorischen Mechanismen könnte eine Ursache für Preeklampsien und wiederholte Fehlgeburten sein [3;18;19].

Fehlgesteuerte NK-Zellreaktionen gegen normale Gewebszellen können eine Ursache für Autoimmunerkrankungen sein. Bei Multipler Sklerose korreliert die Zytokinproduktion von NK-Zellen mit dem remittierenden Krankheitsverlauf, wobei IFN- $\gamma$  Produktion bei aktivem Verlauf, IL-5 Produktion hingegen bei Remission beobachtet wird[3]. Dabei könnte IFN- $\gamma$  mit der Gewebeerstörung im zentralen Nervensystem zusammenhängen[20]. Bei Psoriasis findet man vermehrt CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen in den Hautläsionen, möglicherweise als Reaktion auf die Produktion von CXCL10 und CCL5 durch die psoriatischen Keratinocyten. Durch IFN- $\gamma$  Produktion können die NK-Zellen die Entzündung der Haut verstärken[21].

### 1.1.2 Makrophagen

Makrophagen sind phagozytierende Immunzellen. Sie entwickeln sich im Gewebe aus Monozyten, die aus dem Blut einwandern[22]. Diese Entwicklung wird durch Faktoren wie *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) gefördert. Ausdifferenzierte Makrophagen erkennen Pathogene über Rezeptoren, die an konservierte Strukturen auf der Oberfläche der Pathogen binden, z.B. wird LPS über Toll-like Rezeptor-4 und CD14 erkannt. Pathogene, aber auch apoptotische und nekrotische Zellen werden über Phagozytose in endosomale Vesikel, den so genannten Phagosomen aufgenommen. Phagosomen reifen durch Absinken des pH-Werts auf 3,5 bis 4,0, und Fusion mit speziellen Vesikeln, den Lysosomen, zum Phagolysosom. Das Lysosom enthält

antimikrobielle Peptide, wie Defensine, reaktive Sauerstoffprodukte wie  $O_2^-$  Radikale,  $H_2O_2$  und NO und Enzyme (Lysozyme und Hydrolasen), so dass das Phagolysosom in der Lage ist die enthaltene Pathogene abzutöten und zu verdauen.

Makrophagen sind eine erste Quelle an Zytokinen und Chemokinen. Die Art und Menge der freigesetzten Mediatoren beeinflusst den Verlauf und die Richtung der Immunantwort. Durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  Freisetzung wird das lokale Endothel aktiviert und die Durchlässigkeit des Gewebes für Komplementfaktoren, Antikörper und Immunzellen erhöht.

Ausgeschüttete Chemokine führen zur Rekrutierung von weiteren Immunzellen, vor allem Neutrophilen, an den Infektionsherd. Auch können Makrophagen NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen aktivieren [1;22].

### 1.1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die in der frühen Phase der Immunantwort vom Gewebe und gewebeständigen Immunzellen, vor allem Makrophagen und Dendritische Zellen, sezerniert werden. Chemokine sind kleine Proteine mit einer Molaren Masse von 8 bis 14 kDa und einer Länge zwischen 75 und 150 Aminosäuren. Besonderes Merkmal der Chemokinstruktur sind konservative Cysteine. Über die Lage und Anzahl der Cysteine werden die Chemokine in vier Hauptgruppen (CC, CXC, CX3C und C) unterteilt und nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert. Die CC-Familie, mit den wichtigen Vertretern CCL3, CCL4 und CCL5 besitzt zwei benachbarte Cysteinreste. Die CXC-Familie besitzt zwei Cysteine, die durch eine Aminosäure getrennt sind. Zu dieser Familie gehören Chemokine wie CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1) und CXCL16. Die CX3C-Familie besitzt zwei Cysteine die jedoch durch drei Aminosäuren getrennt sind. Einziges Mitglied dieser Familie ist CX3CL1 (Fractalkine). Die letzte Gruppe der Chemokine, die C-Familie, besitzt nur einen einzigen Cysteinrest, über den Sulfidbrücken ausgebaut werden können. Diese Gruppe besteht aus XCL1 und XCL2 [1;23].

Neben ihrer Hauptfunktion, der Induktion von Migration, können Chemokine noch zahlreiche andere Funktionen ausführen. So spielen Chemokine eine Rolle bei der Aktivierung von Immunzellen, bei der Homöostase und bei der Induktion von Adhäsion. Mit Ausnahme von CX3CL1 und CXCL16, die auch membranständig vorkommen, liegen Chemokine in löslicher Form vor.

Chemokine-Rezeptoren sind Rezeptoren, mit sieben Transmembranregionen. Sie sind über G-Proteine an Signalwege gebunden. Die Nomenklatur der Rezeptoren folgt der der Chemokine. Die Rezeptoren CCR1 bis CCR10 binden Chemokine der CC-Familie, die Rezeptoren CXCR1 bis CXCR7 die der CXC-Familie, und die Rezeptoren CX3CR1 und XCR1 die Chemokine CX3CL1 bzw. XCL1 und XCL2. Bedeutsam ist, dass es eine gewisse Redundanz bei den Chemokinen und ihren Rezeptoren gibt, so dass mehrere Chemokine einen Rezeptor bzw. ein Chemokin an mehrere Rezeptoren binden kann [1;23].

### 1.1.3.1 CCL5

CCL5 oder RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) ist ein Chemokin, das von T-Zellen und aktiviertem Endothel gebildet wird und über die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 auf T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Dendritische Zellen bindet. CCL5 kann sowohl als Monomer als auch als Multimer ausgeschüttet werden. Man geht davon aus, dass nur das Monomer eine chemotaktische Funktion hat, während das Multimer aktivierende Funktionen hat [24]. Die meisten Untersuchungen über CCL5 wurden mit T-Zellen und Makrophagen gemacht.

CCL5 Freisetzung führt zu einer Aktivierung von T-Zellen, die wiederum das in Vesikeln gespeicherte CCL5 zusammen mit den lytischen Vesikeln in die immunologische Synapse transportieren, wo die Ausschüttung erfolgt. Naive T-Zellen haben weder CCL5-Protein noch mRNA gespeichert. CCL5 wird erst mit der T-Zellaktivierung parallel zu den Zytotoxinen Perforin, Granzym A und B induziert [25;26]. In Gedächtnis-T-Zellen kann CCL5-mRNA nachgewiesen werden, welche bei Stimulation schnell translatiert wird [26;27]. Für NK-Zellen konnte neben der chemotaktischen Funktion gezeigt werden, dass CCL5 ein Stimulus für die Ausschüttung der lytischen Vesikel ist und, dass es die Zytotoxizität von CD56-positiven NK-Zellen erhöhen kann [6].

### 1.1.3.2 CX3CL1

CX3CL1 (Fractelkine oder Neurotactin) wird von aktivierten Endothelzellen und in geringem Maße auch von Monozyten gebildet. CX3CL1 bindet nur an einen einzigen Rezeptor, CX3CR1, der vor allem auf NK-Zellen, zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup> Th1-T-Zellen und Monozyten exprimiert wird und deswegen auch als Marker für zytotoxische Lymphozyten gilt [28].

CX3CL1 kann in einer löslichen und einer membranständigen Form vorkommen, wobei jede Form eine spezifische Funktion inne hat. Lösliches CX3CL1 führt zur Migration von NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen zum entzündeten Gewebe. Als membranständige Form ist an die Chemokindomäne des CX3CL1 eine Mucindomäne fusioniert, die die Verankerung in der Zytoplasmamembran bewirkt. Membranständiges CX3CL1 hat hauptsächlich Adhäsionsfunktion und erleichtert den Austritt von NK-Zellen, T-Zellen und Dendritische Zellen aus dem Blutstrom [28]. Außerdem wird eine Bedeutung in der Bildung der Synapse zwischen Dendritische Zellen und NK-Zelle und der daraus resultierenden Aktivierung der NK-Zelle diskutiert [28;29]. ADAM10 (A Disintegrin and A Metalloproteinase 10) ist für die konstitutive Abspaltung von CX3CL1 verantwortlich. Weiterhin konnte durch PMA (Phorbol- 12- Myristat- 13- Acetat) die Abspaltung induziert werden, wobei dafür ADAM17 verantwortlich ist [30].

CX3CL1 spielt eine Rolle in der NK-zellvermittelten antitumoralen Immunantwort. CX3CL1-transfizierte Tumorzellen locken NK-Zellen verstärkt an und können NK-Zellen stärker aktivieren als nicht transfizierte Tumorzellen. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen *in vivo* das Wachstum von CX3CL1-transfizierten Tumoren unterdrücken [31].

## 1.2 Das klarzellige Nierenzellkarzinom

### 1.2.1 Charakteristika

Das Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) ist ein epithelialer Tumor, der vom proximalen Tubulusepithel der Niere ausgeht. Es stellt die häufigste neoplastische Erkrankung der Niere dar. Mit einem Anteil von 3% aller bösartigen Tumore gehört das Nierenzellkarzinom aber zu den seltenen Tumoren. Männer erkranken zwei bis drei Mal häufiger als Frauen. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnose ist 65 Jahre [32]. Im „Heidelberger Workshop“ wurden fünf Haupttypen der Nierenzellkarzinome klassifiziert: das klarzellige, das chromophobe und das papilläre Nierenzellkarzinom sowie das Sammelrohr-Karzinom und unklassifizierte Nierenzellkarzinome. Das klarzellige Nierenzellkarzinom stellt mit einem Anteil von 70% aller Nierenzellkarzinome den häufigsten Typ dar [33]. Die Klassifikation und die Stadieneinteilung, sowie der histologisch beurteilte Grad der Tumordifferenzierung für das klarzellige Nierenzellkarzinom sind in Tabelle 1.2 nach den Richtlinien des Union International Contre le Cancre (UICC) zusammengefasst.

Kennzeichen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ist das Fehlen von Symptomen im frühen Stadium der Erkrankung. Dies führt dazu, dass die meisten Tumore entweder zufällig im Rahmen anderer Untersuchungen oder erst im späten Stadium diagnostiziert werden. Entscheidend für die Prognose ist das Ausmaß der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate in Stadium I noch 90 bis 100%, in Stadium IV lediglich noch 15 bis 30%. Vor allem das Vorhandensein von Metastasen gilt als ungünstiger prognostischer Faktor. Nach Feststellung der Metastasierung liegt das mediane Überleben zwischen 6 bis 10 Monaten und das 2-Jahres-Überleben bei unter 20% [33].

Ein Merkmal des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ist, dass man bei einigen wenigen Patienten spontane Remissionen beobachtet. Dies und die Beobachtung, dass das klarzellige Nierenzellkarzinom einen vergleichsweise hohen Anteil an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) aufweist und auf Immuntherapien anspricht, sieht man als Anhaltspunkt, dass das Immunsystem eine Rolle bei der Kontrolle des Tumorwachstums haben könnte [32;34].

<b>Primärtumor</b>			
T0	Kein Anhalt für Primärtumor		
T1	Tumor 7 cm oder weniger in maximaler Ausdehnung, begrenzt auf die Niere (neu seit 1997) <i>(Tumor 2,5 cm oder weniger in maximaler Ausdehnung, begrenzt auf die Niere [bis 1997])</i>		
T2	Tumor mehr als 7 cm in maximaler Ausdehnung, begrenzt auf die Niere (neu seit 1997) <i>(Tumor mehr als 2,5 cm in maximaler Ausdehnung, begrenzt auf die Niere bis [1997])</i>		
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Fettgewebe, jedoch nicht über die Gerotafaszie hinaus		
T4	Tumor infiltriert über die Gerotafaszie hinaus		
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
<b>Regionale Lymphknoten</b>			
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen		
N1	Metastase(n) in einem regionalen Lymphknoten		
N2	Metastase(n) in mehr als einem regionalen Lymphknoten		
(N3	<i>Metastasen in Lymphknoten, mehr als 5 cm in maximaler Ausdehnung [bis 1997])</i>		
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
<b>Fernmetastasen</b>			
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen		
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden		
<b>Stadiengruppierung</b>			
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1,2,3	N1	M0
Stadium IV	T4	N0,N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1
<b>Histologisches Grading</b>			
G1	gut differenziert		
G2	mäßig differenziert		
G3/4	schlecht differenziert/undifferenziert		

**Tabelle 1.2.1.1: Stadieneinteilung und TNM Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach den Richtlinien der Union International Contre le Cancer (UICC), Stand 2003. [33]**

### 1.2.2 Therapie

Die primäre Therapie des Nierenzellkarzinom ist die operative Beseitigung des Tumors, die im nicht-metastasierenden Stadium faktisch eine Heilung bedeutet. Die Therapieoptionen des metastasierenden Nierenzellkarzinoms sind jedoch limitiert durch die weitgehende Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemo- und Strahlungstherapien. Therapeutische Optionen sind die Immuntherapie und neuerdings auch die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren. Zu den Immuntherapien gehört die Therapie mit Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  und IL-2. Unter TNF- $\alpha$ -Behandlung konnte ein bis zu 12 % besseres Überleben, durch systemische Gabe von IL-2 kann ein 10 bis 15% besseres 5-Jahres-Überlebensrate erreicht werden. IL-2 wird meist in Kombination mit IFN- $\alpha$  und 5-Fluorouracil (5-FU) verabreicht, mit Ansprechraten von 31%. Die IL-2 Therapie ist bis heute die einzige Therapie, bei der es zu einer kompletten Heilung kommen kann. Nachteil dieser Therapie ist, dass bei hoher Toxizität und signifikanter Mortalität die Therapie nur bei einem kleinen Teil der Patienten anspricht [33;35]. Die Indikation für eine Immuntherapie liegt derzeit bei 5% und ist nur für Patienten mit einem guten Allgemeinzustand und lokalisierten Metastasen empfohlen [33].

Die Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren gehört mit zu den neueren therapeutischen Ansätzen. Die gezielte Inhibition des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) spielt dabei eine wichtige Rolle. Dabei haben sich zwei Hauptrichtungen der VEGF-Therapie entwickelt. Einmal die Blockade des Liganden durch monoklonale Antikörper, wie Bevacizumab und die Blockade des VEGF-Rezeptors durch kleine Moleküle (*small molecule inhibitors*), die die Tyrosinkinase inhibieren. Beispiel sind Sunitinib und Sofarenib. Die Therapieerfolge sind viel versprechend, die Therapie mit Sunitinib erreichte mit einem Ansprechen bei über 31% der Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom bessere Effekte als die IFN- $\alpha$  Therapie mit einer Ansprechrates von 6% [36].

Allerdings zeigte sich bis jetzt noch keine vollständigen Heilung durch VEGF-Therapie und bei Absetzen der Therapie kommt es zu schneller Wiederkehr des Tumors. Daher zeichnen sich mittlerweile Vorteile einer IL-2 Therapie gegenüber einer Tyrosinkinase-Therapie ab [35]. Da aber nur eine Subgruppe der Patienten auf IL-2 Therapie anspricht, gilt es nach wie vor als zentrales Ziel Marker zu identifizieren, welche die Identifikation von Therapieansprechern erlauben.

### 1.3 Aufgabenstellung

Die systemische Gabe des Zytokin IL-2 ist eine anerkannte Therapie bei Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom und führt bei einigen Patienten zu langanhaltender Tumorregression und Langzeitüberleben [37]. Da nur eine Subgruppe von Patienten ein Ansprechen zeigt und gleichzeitig die Nebenwirkungen hoch sind, ist es erstrebenswert Therapieansprecher von Nicht-Ansprechern zu unterscheiden, um den Nicht-Ansprechern die Beeinträchtigung der Lebensqualität zu ersparen und ihnen frühzeitig andere Therapieoptionen zu kommen zu lassen.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass sich RCC-Tumore in zwei Gruppen anhand des NK-Anteils am Lymphozyteninfiltrat einteilen lassen: Die eine Gruppe hat einen hohen NK-Anteil ( $\geq 20\%$ ) und die andere einen geringen NK-Anteil ( $< 20\%$ ) [38]. Die Klassifizierung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung der aus Gewebe isolierten Lymphozyten. Die NK-Zellen beider Tumorgruppen unterschieden sich auch in ihrer funktionellen Qualität, da insbesondere die NK-Zellen aus Tumoren mit einem hohen NK-Anteil ihre zytolytische Aktivität durch Kurzzeit-Inkubation mit niedrig dosiertem IL-2 wiedererlangen konnten. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an NK-Zellen in den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) und dem Ansprechen auf IL-2-basierte Therapien bestehen könnte. Für andere Tumorhistologien wurde bereits ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von NK-Zellen und Tumorprogression postuliert [11-14]. Um diese Hypothese zu testen, muss eine große Patientenkohorte, inklusive Patienten mit IL-2 Therapie, untersucht werden. Die jetzige Methode zur Unterscheidung von Tumoren mit hohem und niedrigem NK-Anteil beruht auf der durchflusszytometrischen Analyse von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL), die aus frischem post-operativem Gewebe isoliert wurden und ist deshalb ungeeignet zur Analyse von archiviertem Patientenmaterial.

Ziel dieser Arbeit war es ein molekulares Profil zu erarbeiten, welches die Quantifizierung des NK-Zellinfiltrats im Gewebe erlaubt, die der durchflusszytometrischen Quantifizierung der NK-Zellen in TIL entspricht, und somit eine retrospektive Analyse von Archivmaterial ermöglichen würde. Als Methode wurde die quantitative RT-PCR gewählt. Als NK-zellrelevante Marker wurden die Lymphozytenmarker CD56, NKp46, Perforin und Granzym B sowie verschiedene Zytokine und Chemokine untersucht, die einerseits für den Aktivierungszustand und andererseits für die Rekrutierung von NK-Zellen ins Gewebe bedeutsam sein könnten. Um möglicherweise RCC-spezifische Milieufaktoren zu erfassen, wurde als Referenzgewebe Normalnierengewebe

aus Tumor-Tragenden Nieren untersucht. Des weiteren sollten auch mögliche Korrelationen von molekularen Markern mit klinischen Daten und dem Überleben überprüft werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung des Chemokins CCL5 bei NK-Zellen untersucht werden. Im Gegensatz zu T-Zellen, wo CCL5 nur bei T-Zellrezeptor vermittelter Stimulation produziert wird ist in NK-Zellen wenig über die Sekretion und die Regulation bekannt. Zusätzlich sollte auch die Lokalisation von CCL5 in den NK-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht werden. Des weiteren sollte eine mögliche Funktion von NK-zellsezerniertem CCL5 in der Kommunikation von NK-Zellen und Makrophagen in einem *in vitro* Modellsystem nachgewiesen werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: <sup>137</sup> Caesium)	GammaCell 40, Ottawa, Kanada
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Dynal MPC-50	Dynal
ELISA-Lesegerät SLT SPECTRA	SLT Instruments, Altdorf, Österreich
Fluoreszenzzytometer, LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Kryostat	Leica Jung CM 3000
Laserscanning System TCS SP2	Leica Microsystems, Heidelberg
Leica DM IRBE Mikroskop	Leica Microsystems, Heidelberg
Lichtmikroskope ( Zeiss Axioskop)	Zeiss, Jena
Lichtmikroskope (Leica DMLS)	Leica Microsystems, Heidelberg
MACS-Seperator	Miltenyi, Biotec, Bergisch Glattbach
Mehrkanalpipette 300 µl	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
pH-Meter 766 Calimetric	Knick, Berlin
Pipetten 10µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Qubit Messgerät	Invitrogen, Karlsruhe
Sterilbank	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
Stickstofftank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer Griesheim, Krefeld
Thermocycler Taqman 7700	Applied Biosciences
Wasserbad U3	Julabo
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Hanau

## 2.2 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
1 N Salzsäure	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
7-Amino-Actinomycin D (7AAD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
BDOptEIA™ TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences Pharmingen San Diego
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAKO® Target Retrieval Solution (10x)	DAKO, Hamburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Humanserum	Cambrex Corporation
Immersionsöl	Leica Microsystems, Wetzlar
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Naphtol AS Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Orthophosphorsäure	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Pulver zum Lösen	Biochrom AG, Berlin
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau	ICN Biomedicals GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vectashield	VECTOR Laboratories
Vybrant™ DiD	Invitrogen, Karlsruhe
Vybrant™ DiO	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Zusätze

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
96-Loch-Flachbodenplatten	Nunc, Wiesbaden
Accutase®	PAA Laboratories, Cölbe
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AIMV	Invitrogen, Karlsruhe
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
EGTA AM	Invitrogen, Karlsruhe
Einbettmedium für Kyrogewebeschnitte	Natutec
Eindeckmedium für Immunfluoreszenzfärbungen Vectashield	Vector Laboratories
ERK Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ficoll®	Biochrom, Berlin
Fixogum	Science Services
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
G418 Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin 2500 IE	Essex Pharma GmbH München
HT (Hypoxantin-Thymidin) Supplement 50x	Invitrogen, Karlsruhe
Humanserum (verschiedener gesunder Spender)	IMI, HMGU-München
IMDM	Invitrogen, Karlsruhe
JNK Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
MEMalpha + GlutaMax-1	Invitrogen, Karlsruhe
Natrium-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
NK cell negative-Isolations Kit II	Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway
OPTI-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
p38 Inhibitor SB 203580	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rekombinantes human Interleukin-2 (Proleukin)	Cetus, Emeryville, USA
Rekombinantes human TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Staurosporin	Alomone Labs Ltd, Jerusalem, Israel
Superfrost® Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
T175 Zellkulturflaschen	GreinerBecton Dickinson, Heidelberg
T75 Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
TCGF (T cell Growth Factor)	IMI, HMGU-München
Tris-HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe

---

## 2.3.2 Medien

### RMPI-Basismedium

RPMI 1640  
2mM L-Glutamin  
1mM Natriumpyruvat  
1mM nichtessentielle Aminosäuren

### T-Zell-Medium

RPMI-Basismedium  
7,5% FCS  
7,5% Humanserum  
50U/ml IL-2

### RCC-Medium

RPMI-Basismedium  
12% FCS

### LCL-Medium

RPMI-Basismedium  
10% FCS

### NK92-Medium

RPMI-Basismedium  
10% FCS  
7,5% Humanserum  
100U/ml IL-2

NKL-Medium

RPMI-Basismedium  
15% FCS  
5% TCGF  
100U/ml IL-2

YT-Medium

IMDM-Medium  
15% FCS  
2mM L-Glutamin  
1mM Natriumpyruvat  
1mM nichtessentielle Aminosäuren

CHO-Medium

MEMalpha Medium + GlutaMax-1  
10% dialysiertes FCS  
2% HT-Supplement

CHO-Rapi-Medium

MEMalpha Medium + GlutaMax-1  
10% dialysiertes FCS

CML-Medium

RPMI-Basismedium  
15% FCS  
1x Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium

20% DMSO in RPMI-Basismedium

Maus-Makrophagen Medium (erhalten von B. Luckoff; Poliklinik LMU München)

DMEM Medium mit 4,5 g/l Glukose  
15% steril filtrierter Überstand von L929 Zellen (enthält M-CSF und FGF)  
10% FCS  
5% Pferdeserum  
1% Benzylpenicillin-Procaïn /Dihydrostreptomycin  
50µM 2-β-Mercaptoethanol

### 2.3.3 Pufferlösungen

#### MACS-Puffer

0,5% Humanserum  
0,5 mM EDTA (in PBS)

#### NK-Isolationspuffer

0,1% FCS in PBS

#### Trypsin-EDTA-Lösung

2x Stocklösung Trypsin-EDTA

#### FACS-Puffer

2% Humanserum  
200 mM EDTA (in PBS)  
0,1% Natriumazid (in PBS)

#### FACS-Puffer mit Saponin

2% Humanserum  
0,1% bzw. 0,35% Saponin (in PBS)

#### Paraformaldehyd-Lösungen

1% bzw. 4% Paraformaldehyd (in PBS)

#### Stopp-Puffer für Phagozytoseassay

01% Natriumazid in PBS  
200 mM EDTA in PBS

## 2.4 Zelllinien

Bezeichnung	Charakteristika	Kulturmedium	Quelle
humane NK-Zellen	isoliert aus Vollblut von gesunden Spendern	NK92-Medium	IMI, HMGU-München
Maus WT-Makrophagen	Balb/c Wildtyp-Mausmakrophagen	Maus-Makrophagen Medium	B. Luckoff Poliklinik, LMU
Maus CCR5 <sup>-/-</sup> -Makrophagen	Balb/c Hintergrund, stabiler CCR5 <sup>-/-</sup> Knockout	Maus-Makrophagen Medium	B. Luckoff Poliklinik, LMU
NK-92	CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>++</sup> zytotoxische NK Zelllinie	NK92-Medium	[39]
NKL	CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>dim</sup> NK Zelllinie	NKL Medium	[40]
PBL-Pool	Gemisch von peripheren Blut-Leukozyten aus vier gesunden Spendern	T-Zell-Medium	IMI, HMGU-München
RCC26	humane Nierenzellkarzinomzelllinie	RCC-Medium	IMI, HMGU-München
YT	EBV positive NK Zelllinie, IL-2 unabhängig	YT-Medium	[41]
B-LCL LAZ388	EBV transformierte B Zelllinie	LCL-Medium	Freiburg
CHO	chinese ovarian hamster cancer Zelllinie	CHO-Medium	P. Nelson Poliklinik, LMU
CHO-Rapi	chinese hamster ovarian cancer Zelllinie mit stabiler Transfektion von GPI verankerten CCL5-Konstrukt	CHO-Rapi-Medium	P. Nelson Poliklinik, LMU
CHO-mRapi	chinese hamster ovarian cancer Zelllinie mit stabiler Transfektion mit GPI verankertem CCL5-Konstrukt mit einer Methylgruppe am N-Terminus	CHO-Rapi-Medium	P. Nelson Poliklinik, LMU
CTL Klon JB4	humane klonale CTL-Linie, HLA-A2-alloreaktiv	T-Zell-Medium	IMI, HMGU-München

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Primärantikörper

Spezifität	Markierung	Spezies/Isotyp	Klon	Konzentration	Verwendung	Vertreiber
CD107a	FITC	Maus IgG1	H4 B4	1: 25	IF, FACS	BD Bioscience
CD107b	FITC	Maus IgG1	H4 A3	1: 25	IF, FACS	BD Bioscience
CD2	APC	Maus IgG2a	S5.2	1: 50	IHC, FACS	BD Bioscience
CD3	unmarkiert	Maus IgG1	UCHT 1	1: 1000	IHC	DAKO
CD3	PB	Maus IgG1	CD3	1: 33	FACS	DAKO
CD56	APC	Maus IgG1	N901	1: 33	FACS	Beckman/Coulter
CD57	FITC	Maus IgM	NC1	1: 10	IHC	EuroBioSciences
CD8	unmarkiert	Kaninchen	SP16	1: 50	IF, IHC	Thermo Scientific
CX3CL1	unmarkiert	Kaninchen	polyklonal	1: 100	IHC	eBioscience
CX3CR1	unmarkiert	Kaninchen	polyklonal	1: 100	IHC	eBioscience
CX3CR1	unmarkiert	Maus Ig2	unbekannt	1: 100	FACS	Sigma-Aldrich
EEA-1	unmarkiert	Maus IgG1	14	1: 100	IF	BD Bioscience
Granzym A	FITC	Maus IgG1	CB9	1: 20	IF, FACS	BD Bioscience
Granzym B	unmarkiert	Maus IgG1	GB11	1: 100	IF, FACS	Serotec
Granzym B	PE	Maus IgG1	GB11	1: 100	FACS	Serotec
Isotyp-Kontrolle	FITC	Maus IgG1	MOPC21	1: 20	FACS	BD Bioscience
Isotyp-Kontrolle	PE	Maus IgG1	W3125	1: 100	FACS	Serotec
NKp46	unmarkiert	Maus IgG1	9,00E+002	1: 10	IF, IHC	BD Bioscience
NKp46	PE	Maus IgG1	9 E2	1: 10	FACS	BD Bioscience
Perforin	unmarkiert	Maus IgG2b	δG9	02:40:00	IF, IHC, FACS	BD Bioscience
Rab5	unmarkiert	Kaninchen	unbekannt	1: 100	IF	Cell Signalling
Rab5	unmarkiert	Maus IgG2a	1/Rab5	1: 100	IF	BD Bioscience

## Material

Spezifität	Markierung	Spezies/Isotyp	Klon	Konzentration	Verwendung	Vertreiber
CCL5	unmarkiert	Maus IgG2b	VL-2	1: 2	IF	P. Nelson Poliklinik LMU
CCL5	unmarkiert	Maus IgG2b	VL-1	1: 2	FACS	P. Nelson Poliklinik LMU

**Tabelle 2.5.1.1: Verwendete Primäreantikörper für die Durchflusszytometrie (FACS) und immunhistochemische (IHC) oder Immunfluoreszenzfärbungen (IF).**

### 2.5.2 Sekundärantikörper

Spezifität	Markierung	Spezies	Klon	Konzentration	Verwendung	Vertreiber
Maus	APAAP	Maus	DO651	1:40	IHC	DAKO
Maus	unmarkiert	Kaninchen	ZO259	1:20	IHC	DAKO
Kaninchen	AP	Ziege		1:50	IHC	Dianova
Kaninchen	AP	Ziege		1:50	IHC	Dianova
Maus-IgG2b	AlexaFluor 488	Ziege		1:500	IF, FACS	Invitrogen
Maus-IgG2a	AlexaFluor 488	Ziege		1:500	IF, FACS	Invitrogen
Maus-IgG2a	AlexaFluor 568	Ziege		1:500	IF, FACS	Invitrogen
Maus-IgG1	AlexaFluor 488	Ziege		1:500	IF, FACS	Invitrogen
Maus-IgG1	AlexaFluor 568	Ziege		1:500	IF, FACS	Invitrogen
Maus-IgG2b	AlexaFluor 647	Ziege		1:500	IF, FACS	Invitrogen
Kaninchen	Cy5	Ziege		1:100	IF	Dianova
Ratte	Cy3	Maus		1:200	IF	Dianova
Kaninchen	RRX	Esel		1:250	IF	Dianova

**Tabelle 2.5.2.1: Verwendete Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie (FACS), immunhistochemische (IHC) oder Immunfluoreszenz-Färbungen (IF).**

## 2.6 Proteinbestimmung

### 2.6.1 Zytokin und Chemokin Bestimmungen

#### 2.6.1.1 Puffer

##### Lysepuffer

20mM Tris-HCL (pH 7,5)  
1mM EDTA (pH 8)  
1mM EGTA (pH 8)  
1% Triton X-100  
2,5mM Natrium-Pyrophosphat  
1mM PMSF  
in aqua at injectabile

##### ELISA-Coating-Puffer

0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5

##### ELISA-Waschpuffer

0,05% Tween20 in PBS

##### ELISA-Blockierungspuffer (IFN- $\gamma$ )

1 % Magermilchpulver (in PBS)

##### ELISA-Blockierungspuffer (RANTES)

1 % FCS (in PBS)

#### 2.6.1.2 Reagenziensysteme

DuoSet human RANTES (CCL5)

R&D Systems

BDOptEIA™ human IFN- $\gamma$  ELISA Set

BD Biosciences

## 2.7 Molekularbiologie

### 2.7.1 Primer/Sonden für Taqman-basierte quantitative „*real-time*“ (echtzeit) PCR (qRT-PCR)

Spezifität	Primer	
	Orientierung	Sequenz
18SrRNA		Unbekannt
CD2	ContextSequenz	GGAGAAATGATGAGGAGCTGGAGAC
CD3	ContextSequenz	CTCGCAAGTGAGCCCCCTCAAGATA
Perforin	Forward	CACCAGGACCAGTACAGCTTCAG
	Reverse	CCGATGATCTCCCCTGCAT
	Sonde	TGGCCTTCCTCCTGCTGCCCA
Granzym B	Forward	TGCAACCAATCCTGCTTCTG
	Reverse	CCGATGATCTCCCCTGCAT
	Sonde	TGGCCTTCCTCCTGCTGCCCA
IL-2	ContextSequenz	TGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAA
IL-4	Forward	CGATATCACCTTACAGGAGATCATCA
	Reverse	GTGTTCTTGGAGGCAGCAAAG
	Sonde	TCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGA
IL-10	Forward	GATTTGTGCAGCTGTTTCAGTGCAG
IL-12 p40	ContextSequenz	Unbekannt
IL-15	ContextSequenz	Unbekannt
TNF- $\alpha$	ContextSequenz	Unbekannt
TGF- $\beta$	ContextSequenz	Unbekannt
IFN- $\gamma$	ContextSequenz	Unbekannt
CCL5	ContextSequenz	Unbekannt
CXCL8	ContextSequenz	Unbekannt
CXCL10	ContextSequenz	Unbekannt
CXCL12	ContextSequenz	Unbekannt

## Material

Spezifität	Primer	
	Orientierung	Sequenz
CXCL16	ContextSequenz	Unbekannt
CX3CL1	Forward	Unbekannt
	Reverse	Unbekannt
	Sonde	Unbekannt
CX3CR1	Forward	Unbekannt
	Reverse	Unbekannt
	Sonde	Unbekannt
CD56	ContextSequenz	Unbekannt
NKp30	ContextSequenz	Unbekannt
NKp44	ContextSequenz	Unbekannt
NKp46	ContextSequenz	Unbekannt

### 2.7.2 Enzyme

Reverse Transcriptase Super Script II

Gibco

RNase-free DNase Set

Quiagen

### 2.7.3 Reagenziensysteme

Qiagen RNeasy Mini Kit zur RNA-Isolierung	Quiagen
Qubit-iT RNA Assay Kit	Invitrogen
AOD ( <i>assay of demand</i> ) Primer/Sonden Mix:	Applied Biosystems
Haushaltsgen: 18S rRNA	
Lymphozyten-Marker: CD2, CD3, CD56, NKp30, NKp44, NKp46	
Zytotoxine: Perforin, Granzym B	
Zytokine: IL-2, IL-4, IL-10, IL12p40, IL-15, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$	
Chemokine: CCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL16, CX3CL1	
Chemokinrezeptoren: CX3CR1	

Alle Primer/Sonden Kits waren von Applied Biosystems und wurden vom Hersteller auf Spezifität geprüft.

### 2.7.4 Sonstige Reagenzien

#### Mischung für Reverse Transkriptase

5x Puffer	Invitrogen
25mM dNTP	Amersham Pharmacia
0,1M DTT	Invitrogen
40U/ $\mu$ l RNaseOut™ Ribonuclease	Invitrogen
15 $\mu$ g/ml lineares Acrylamid	Ambion
Hexanukleotide	Roche
Wasser, PCR-grade	Roche

## 2.8 Immunfluoreszenz

### 2.8.1 Lösungen und Puffer

#### 20x SSC-Puffer

0,3M Natriumcitrat 2H<sub>2</sub>O (8,82 g)  
3M Natriumchlorid (17,83 g)  
ad Aqua ad iniectabilia (100 ml)  
→ pH-Wert 7,0 (mit 1N Salzsäure)

#### DAPI-Stocklösung

5mgDAPI /ml in Aqua ad iniectabilia

#### DAPI-Gebrauchslösung

150µg/ml DAPI (3 µl Stocklösung)  
2x SSC-Puffer (10 ml)  
ad Aqua ad iniectabilia (90 ml)

#### Paraformaldehyd-Lösungen

1% bzw. 4% Paraformaldehyd (in PBS)

#### Blockierungslösung

2%BSA in PBS

#### Antikörperverdünnungslösung

12,5% Humanserum in PBS

## 2.9 Immunhistochemie

### 2.9.1 Lösungen und Puffer

#### TBS- Waschpuffer:

6,05g Trishydroxy(methyl-)aminomethan (Merck) (0,01M)  
43,90g Natriumchlorid (Merck) (0,15M)  
in 4,6 L Braunwasser lösen  
pH-Wert auf 7,4-7,6 einstellen  
auf 5L auffüllen

#### Citrat-Puffer:

4,20g Citronensäure-Monohydrat (Merck)  
in 1,7L Braunwasser lösen  
pH Wert auf 6,0 einstellen  
auf 2L auffüllen

#### AP-Puffer für die Entwicklerlösung:

12,1g Trishydroxy(methyl-)aminomethan (0,1 M)  
5,85g Natriumchlorid (0,1 M)  
in 1L Braunwasser lösen

#### Entwicklungspuffer für die Entwicklerlösung:

1,21g Trishydroxy(methyl-)aminomethan (0,01M)  
5,85g Natriumchlorid (0.1M)  
in 1L Braunwasser lösen

#### Neufuchsin Lösung:

5g Neufuchsin Pulver (Merck) in 100ml 2N HCL lösen

## 2.10 Patientenmaterial

## 2.10.1 Tumorgewebe

Patient-ID	Geschlecht	Alter (Jahre)	TNM Status	Tumorstadium	Nachverfolgungszeitraum (Monate)
hoher prozentualer NK-Anteil, NKhigh [ $>20\%$ der Tumor TIL]					
RCC-1	m	67	T1b N0 M0 G2	I	A (37)
RCC-2	f	31	T2 N0 M0 G2	II	A (40)
RCC-3	f	61	T1a N0 M0 G2	I	A (42)
RCC-4	f	66	T1b N0 M0 G2	I	A (43)
RCC-5	m	52	T1 N0 M0 G3	I	A (62)
RCC-6	m	47	T2 N0 M0 Gx	II	n.d
RCC-7	m	68	T3b Nx M0 G2	III	A (70)
RCC-8	m	68	T3b N0 M0 G2	III	DOD (34)
RCC-9	f	76	T3b N0 M0 G2	III	A-DF (43)
RCC-10	f	67	T3b N0 M0 G2	III	A (67)
RCC-11	f	74	T3a Nx M0 G3	III	n.d
RCC-12	m	59	T3b Nx M0 G2	III	A (37)
RCC-13	m	77	T3 Nx M0 G2	III	D (12)
RCC-14	m	49	T2 N0 M0 G2	II	n.d
RCC-15	m	53	T3b N0 M0 G2	II	n.d

**Tabelle 2.10.1.1: Tabelle NK<sup>high</sup> Tumore.** Klassifizierung nach UICC. Geschlecht: m: männlich; f: weiblich. A (alive/lebend); DOD (dead of disease/ tot auf Grund der Krankheit); A-DF (alive-disease free/ lebend, frei von Krankheit); D (dead/tot); n.d not determined/nicht bestimmbar.

Material

Patient-ID	Geschlecht	Alter (Jahre)	TNM status	Tumor stadium	Follow-up (Monate)
low NK content [ $<20\%$ of TIL]					
RCC-16	m	34	T2 N0 M0 G2	II	A-DF (14)
RCC-17	m	47	T1b N0 M0 G2	I	DOD (35)
RCC-18	m	57	T2 N0 M0 G3	II	A (62)
RCC-19	f	69	T1 Nx Mx G2	I	A-DF (42)
RCC-20	m	68	T1 N0 Mx G2	I	A-DF (42)
RCC-21	m	83	T2 N0 M0 G2	II	A (68)
RCC-22	m	61	T3 N0 M0 G3	III	D (38)
RCC-23	f	74	T3b N0 M1 G3	IV	A (40)
RCC-24	m	53	T3b N0 M0 G2	III	A-DF (17)
RCC-25	f	74	T3b N0 M0 G2	III	D (36)
RCC-26	f	80	T3b N2 M0 G2	IV	A (70)
RCC-27	m	61	T3b N2 M1 G3	IV	DOD (12)
RCC-28	f	35	T4 N0 M0 Gx	IV	A-PR (15)
RCC-29	m	73	T3c N0 M1 G2	IV	DOD (27)
RCC-30	m	68	T3b N0 M1 G2	IV	DOD (48)
RCC-31	f	80	T1 N0 M1 G3	IV	A (59)
RCC-32	m	67	T3b N0 M0 G3	III	n.d
RCC-33	m	58	T3b N0 M0 G2	III	n.d
RCC-34	f	65	T3b N2 M0 G3-4	IV	n.d
RCC-35	m	60	T2 Nx M0 G3	III	n.d
RCC-36	f	57	T2 Nx M1 G3	IV	n.d
RCC-37	f	72	T3b N0 M0 G3	III	n.d

**Tabelle 2.10.1.2: Tabelle NK<sup>low</sup>Tumore.** Klassifizierung nach UICC. Geschlecht: m: männlich; f: weiblich. A (alive/lebend); DOD (dead of disease/ tot auf Grund der Krankheit); A-DF (alive-disease free/ lebend frei von Krankheit); D (dead/tot); n.d not determined/nicht bestimmbar.

Die in dieser Arbeit untersuchten Nierengewebe wurden von der urologischen Abteilung des Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Alle Tumore waren Nierenzellkarzinome des klarzelligen Typs

## 2.10.2 Kontrollgewebe

Gewebe	Geschlecht	Alter	Besonderheiten
NKC-1	m	83	aus tumortragenden Niere (RCC-21)
NKC-2	f	69	aus tumortragenden Niere (RCC-19)
NKC-3	f	80	aus tumortragenden Niere (RCC-26)
NKC-4	m	68	aus tumortragenden Niere (RCC-20)
NKC-5	m	68	aus tumortragenden Niere (RCC-30)
NKC-6	m	57	aus tumortragenden Niere (RCC-18)
NKC-7	m	47	aus tumortragenden Niere (RCC-17)
NKC-8	f	76	aus tumortragenden Niere (RCC-9)
NKC-9	m	73	aus tumortragenden Niere (RCC-29)
NKC-10	m	61	aus tumortragenden Niere (RCC-22)
NKC-11	f	74	aus tumortragenden Niere (RCC-23)
NKC-12	f	74	aus tumortragenden Niere (RCC-11)
NKC-13	f	66	aus tumortragenden Niere (RCC-4)
NKC-14	f	61	aus tumortragenden Niere (RCC-3)
NKC-15	m	68	aus tumortragenden Niere (RCC-7)
NKC-16	f	31	aus tumortragenden Niere (RCC-2)
NKC-17	m	68	aus tumortragenden Niere (RCC-8)
NKC-18	f	67	aus tumortragenden Niere (RCC-10)

**Tabelle 2.10.2.1: Normalnierengewebe (NKC; normal kidney cortex).** Das Areal stammte aus aus einem Bereich, der möglichst weit entfernt vom Tumorareal lag.

## 2.11 Blutproben

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vollblutproben wurden von gesunden Spendern zur Verfügung gestellt. Die Abnahme erfolgte von einem zur Blutabnahme berechtigten Mediziner. Die Zustimmung der Spender und der lokalen Ethikkommission lag vor.

## 3 Methoden

### 3.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

#### 3.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Um eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte mit lebenden Zellen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

#### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension entnommen und mit dem selben Volumen Trypanblaulösung versetzt.

Trypanblau wird nur von toten Zellen aufgenommen und ist deshalb geeignet, um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden. Es wurden die lebenden Zellen, d.h. die Trypanblau-negativen Zellen, von zwei Großquadraten ausgezählt und die Werte gemittelt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert aus zwei Großquadraten} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10000$$

#### 3.1.3 Einfrieren von Zellen

Um Zellen in flüssigem Stickstoff zu lagern, muss dem Medium 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben werden. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, die zum Platzen der Zellen führen würden, ist aber für stoffwechselaktive Zellen hochtoxisch. Daher wurden alle Arbeitsschritte möglichst schnell auf Eis durchgeführt. Die abzentrifugierten Zellen wurden in kaltem FCS resuspendiert und 1:2 mit kalter 20%iger DMSO-Mediumlösung gemischt. Jeweils 1,8ml der Lösung wurden auf Einfrierröhrchen verteilt, in Zellstoff verpackt

und für 24h bei -80°C eingefroren. Danach wurden die Zellen bis zur Wiederverwendung über flüssigem Stickstoff (-196 °C) im Stickstofftank gelagert.

### 3.1.4 Auftauen von Zellen

Die Einfrierröhrchen wurden nach Entnahme aus dem Stickstofftank in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt bis die Zellsuspension zu 3/4 aufgetaut war. Die Suspension wurde in FCS aufgenommen und die nun vollständig aufgetaute Suspension sofort abzentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium resuspendiert.

### 3.1.5 Kultivierung von adhärennten Zelllinien

Die Kultivierung von adhärennten Zellen wird in dem für die jeweiligen Zellen optimalen Medium durchgeführt. Das Mediumvolumen in der T75-Kulturflasche (Ø75 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche) betrug 15 ml, in der T175-Kulturflasche (Ø175 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche) 30 ml. Alle drei Tage wurde das Medium zur Hälfte durch frisches Medium ersetzt. Bei dichtem Zellrasen (90-100% zugewachsene Fläche) wurde das Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS gespült und für 2min mit 2ml Trypsin-EDTA (1x) (bei großen Kulturflaschen) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden auf zwei Kulturflaschen verteilt und mit dem zellspezifischen Medium versetzt.

### 3.1.6 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die Suspensionszellen wurden in stehenden T75-Kulturflaschen mit 20ml Medium kultiviert. Alle 3 Tage wurde die Zellsuspension bis zur Hälfte abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

### 3.1.7 Isolation von PBMCs aus Vollblut

Die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut gesunder Spender erfolgte durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Abnahme des Vollblutes erfolgte in Spritzen, die 100µl Heparin enthielten, um ein Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das heparinisierte Vollblut wurde anschließend mit RPMI-Medium 1:2 verdünnt und auf 15ml Ficoll-Lösung in 50ml-Röhrchen vorsichtig überschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 2000rpm über 20min ohne Bremse werden die Bestandteile des Blutes durch die Zentrifugalkraft entsprechend ihrer Dichte voneinander getrennt. So können die PMBC von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt werden. Die PBMC bildeten eine weiße Grenzschicht zwischen dem Plasma und der Ficoll-Lösung, wohingegen die Erythrozyten und Granulozyten im Sediment zu finden sind. Nach der Zentrifugation wurden die PBMC in ein neues Röhrchen überführt, die PBMC-Suspension mit RPMI-Medium 1:2 verdünnt und bei 1900rpm für 12min mit Bremse zentrifugiert, um noch vorhandenes Ficoll wegzuwaschen. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und die PMBC in 20ml MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde über eine 0,4µm Filtermembran gegeben, um größere Zellklumpen zu entfernen und die Zellen anschließend gezählt. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

### 3.1.8 Isolierung von Natürlichen Killerzellen aus PBMC

NK-Zellen wurden aus PBMC über negative Isolierung angereichert. Bei der negativen Isolierung werden, im Gegensatz zur positiven Isolierung, nicht die gewünschten Zellen über Antikörper an magnetische Beads gebunden sondern alle zu entfernenden Zellen. Der Vorteil darin besteht, dass keine Beads an den Zellen, die für das Experiment benötigt werden, kleben und eine mögliche Aktivierung der Zellen durch das Binden der Antikörper verhindert wird. Wichtig bei der Isolation der NK-Zellen war, dass aus den PBMCs vorhandene Thrombozyten entfernt wurden, da sie die Reinheit der Isolation negativ beeinflussten. Deswegen wurden die PBMC-Suspension zweimal für 12min bei 1000rpm abzentrifugiert und mit NK-Isolationspuffer gewaschen. Danach wurden die Zellsuspension auf eine Konzentration von  $1,0 \times 10^7$  Zellen/100µl in NK-Isolationspuffer eingestellt und pro  $1,0 \times 10^7$  Zellen 20µl FSC und

20µl Antikörper-Mix ( $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD14,  $\alpha$ CD36,  $\alpha$ CDw-HLA II DR/DP) zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 10min bei 4°C auf einem Rotor. Danach wurde mit 1ml/  $1,0 \times 10^7$  Zellen NK-Isolationspuffer gewaschen und bei 1700rpm für 8min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 0,95ml NK-Isolationspuffer/  $1,0 \times 10^7$  Zellen aufgenommen und mit 50µl beads/  $1,0 \times 10^7$  Zellen für 10min bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem auf- und abpipettieren, um entstandene Beadrosetten aufzulösen, wurde das Röhrchen für mindestens 2min an den Magneten gehängt. Der Überstand, der die NK-Zellen enthält wird in ein neues Röhrchen überführt und nochmal mit 50µl beads versetzt, wie vorher inkubiert und ein zweites Mal an den Magneten gehängt. Vom finalen Überstand wird ein Aliquot für die Zellzahlbestimmung abgenommen und der restliche Überstand für 5min mit 1500rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in NK-92 Medium aufgenommen. Es folgt eine Reinheitsbestimmung mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurde über eine CD3/CD56-Doppelfärbung bestimmt, wieviel CD3-positive Zellen noch vorhanden waren. Brauchbar waren Aufreinigungen mit einem NK-Gehalt von über 90%.

### 3.1.9 Kultivierung von T-Zellen

Die T-Zellen wurden in 24-Lochplatten in T-Zellmedium unter Zugabe von IL-2 kultiviert. Alle 3 Tage wurde entweder die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt oder die Zellen, die sich auf dem Boden der Platte abgesetzt hatten, mit einer Pipette resuspendiert und auf zwei Vertiefungen verteilt. Die so „gesplitteten“ Zellen wurden mit frischem Medium versetzt.

Für das Überleben von T-Zellen ist es wichtig, dass durch einen äußeren Reiz ihre Proliferation ausgelöst wird. Dies kann über die Verwendung spezifischer Antikörper ( $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 Immunglobulin) erfolgen oder, wie in diesem Fall, mittels Tumorzellen, die den für den T-Zell-Rezeptor geeigneten Peptid-MHC-Liganden (pMHC) exprimieren. Zusätzlich wurden „Feeder“-Zellen (siehe Tabelle 3.1.9.1) zum Restimulationsansatz gegeben, die die Zelldichte erhöhen und für ein günstiges Zellmilieu sorgen. Die Restimulation erfolgte alle 14-16 Tage. Um die Proliferation der Restimulationszellen zu unterbinden, wurden sie in einer Bestrahlungsanlage mit einer Cäsiumquelle (GammaCell) bestrahlt. Wie aus der Tabelle 3.1.9.1 ersichtlich, werden die Zellen unterschiedlich lang bestrahlt und in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Pro Ansatz werden  $5 \times 10^5$  T-Zellen eingesetzt. Für die Restimulation wurde einer der vier PBL-Gemische abwechselnd verwendet, um zu verhindern,

dass TCR-Spezifitäten angezüchtet werden. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen abzentrifugiert (1500rpm, 5min, bei Raumtemperatur, RT) und in T-Zellmedium mit 50 U/ml IL-2 resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen wurden die Zellen in der angegebenen Zelldichte vermischt, so dass ein Endvolumen von 1,5ml / Ansatz resultierte. Der Ansatz wurde dann auf eine 24-Lochplatte pipettiert und für vier Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am Tag 4 nach Restimulation wurde das Medium zur Hälfte gegen T-Zellmedium mit 100 U/ml IL-2 ausgetauscht oder, falls die Zelldichte war wie unter 3.2.7 beschrieben, gesplittet. Von Tag 7 bis Tag 11 konnten die Zellen für einen Versuchsansatz verwendet werden.

Restimulationszellen	Zelllinie	Zelldichte (pro Vertiefung einer 24-Lochplatte in 1,5ml)	Bestrahlungsintensität
Zielzelle	RCC 26	60000 Zellen	10000 rad
Feederzelle	PBL-Gemisch aus 3 Spendern	1 x 10 <sup>6</sup> Zellen	5000 rad
Feederzelle	B-LCL-LAZ388	1 x 10 <sup>5</sup> Zellen	15000 rad

**Tabelle 3.1.9.1: Verwendete Stimulationszellen und Bedingungen zur Restimulation des zytotoxischen T-Zellklons JB4.**

### 3.2 Bestimmung des Zytokingehalts in Zellkulturüberständen und Lysaten

Um den Zytokingehalt in Zellkulturüberständen zu messen, wurden der Überstand in ein dem Volumen angepasstes Reaktionsgefäß gegeben und dann über Zentrifugation bei 12000rpm für 5min eventuell vorhandene Zellen entfernt. Die gewonnenen Überstände wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Zur Herstellung von Lysaten wurden die Zellen über Zentrifugation bei 1500rpm für 5min von ihrem Medium getrennt. Das entstandene Zellpellet wurde in Lysepuffer aufgenommen und für 1min auf den Vortexer gestellt und dann noch für weitere 15min bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Danach wurde das Lysat bei 12000rpm für 30min zentrifugiert, so dass der Zellschrott absedimentierte, vorhandene Proteine aber im Überstand blieben. Der entstandene Überstand wurde in ein dem Volumen angepasstes Reaktionsgefäß überführt. In dieser Lösung wurde nun der Gehalt an Gesamtprotein über Fluoreszenzfärbung nach dem Qubit-Proteinmessungsprotokoll bestimmt. Dafür wurde mit Hilfe des im Kit enthaltenen Puffers und Fluoreszenzfarbstoffs die Reaktionslösung hergestellt. Dann wurden 10µl der beiden im Kit enthaltenen Standardproben und 1-10µl des Lysatüberstands mit 190µl bis 199µl Reaktionslösung für 15min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zuerst mit den Standardproben das Gerät kalibriert und dann die Proben gemessen.

Über die Formel  $Messwert * \left( \frac{200}{Probevolumen} \right)$  wurde dann der genaue Gehalt an Protein in µg/ml der jeweiligen Probe berechnet. Die restliche Überstände wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.2.1 Nachweis von Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA

In dieser Arbeit sollte die Konzentration von CCL5 und IFN-γ im Überstand von Zellsuspensionen oder in Lysaten von Zellen nachgewiesen werden. Dies wurde über einen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Hierfür wurde eine 96-Loch-Flachbodenplatte mit einem für das jeweilige Zytokin spezifischen Antikörper beschichtet und für mindestens 12h bei 4°C (IFN-γ) oder bei Raumtemperatur (CCL5) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde nichtgebundener Antikörper mit Waschpuffer entfernt und mit einem

Blockierungspuffer unspezifische Bindungsstellen für mindestens 1 Stunde blockiert. Auch der Blockierungspuffer wurde durch Waschen mit dem Waschpuffer entfernt. Dann erfolgte eine Inkubation mit den Proben für die Standardkurve und den zu untersuchenden Proben jeweils im Duplikat für 1h im Fall des IFN- $\gamma$  ELISA und 2h für den CCL5-ELISA. Danach wurde nicht gebundene Probe weg gewaschen und dann mit einem Biotin-makierten spezifischen Zweitantikörper (Detektionsantikörper) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Avidin, das Meerrettich-Peroxidase gebunden hat, zugegeben. Avidin bindet an das Biotin des Detektionsantikörpers. Im nächsten Schritt wurde nach Wegwaschen des überschüssigen Avidins eine Substratlösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zugegeben. Diese Substratlösung wird durch die Meerrettich-Peroxidase in ein farbiges Produkt umgesetzt. Durch Zugabe von 0,1M Phosphorsäure (Stopplösung) wurde die Reaktion beendet. Die Farbintensität des umgesetzten Produkts konnte dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen werden. Dabei war die umgesetzte Substratmenge direkt proportional zur gemessenen Farbintensität und zur Menge an gebundenem Zytokin. Über die Farbintensität der Proben der Standardverdünnungen, die eine bekannte Menge des untersuchten Zytokins enthielten, konnte dann die Proteinmenge der unbekannt Proben berechnet werden. Dafür wurde mit den gemessenen Extinktionswerten der Standardproben an Hand der bekannten Konzentrationen in der Auswertesoftware über eine fünfparametrische Gleichung eine Standardkurve erstellt. Aus dieser Standardkurve konnten dann die Werte der unbekannt Proben ermittelt werden. Die Standardkurve wurde als valide angesehen, wenn die berechneten Werte um weniger als 30% von den vorgegebenen Werten der Standardproben abwichen.

### 3.3 Stimulation von NK-Zellen

Um zu untersuchen, ob CCL5 in NK-Zellen als Protein oder als mRNA gespeichert wird, wurden Stimulationsversuche mit 13-Phorbol-14-myristat und Ionomycin (PMA/I) unter gleichzeitiger Zugabe von Inhibitoren der Proteinsynthese (Cycloheximid), des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA) und der Transkription (Actinomycin D) durchgeführt. NK-Zelllinien, oder aus PBMC isolierte NK-Zellen, die über Nacht in NK92-Medium (200U IL-2/ml) kultiviert worden waren, wurden auf eine Konzentration von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 5ml Zellsuspension wurden auf Reaktionsgefäße verteilt und mit gestopften Pipettenspitzen  $10\mu\text{g/ml}$  Actinomycin D oder  $10\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid oder  $6\text{nM}$  EGTA versetzt und die Ansätze 30min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurde wiederum mit gestopften Pipettenspitzen  $500\text{ng/ml}$  PMA und  $5\text{ng/ml}$  Ionomycin dazugegeben und die Ansätze gut vermischt und dann bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und für eine durchflusszytometrische Analyse der Gehalt an CCL5, Perforin, Granzym A und Granzym B in den verschiedenen Ansätze und zu den verschiedenen Zeitpunkte bestimmt. Die Überstände wurde zur Messung von sezerniertem CCL5 und IFN- $\gamma$  verwendet.

## 3.4 Durchflusszytometrie

### 3.4.1 Allgemeines

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, Zellen über die Expression mehrerer Oberflächenmoleküle bzw. intrazellulärer Proteine zu charakterisieren. Dazu werden spezifische Antikörper verwendet, die entweder schon markiert sind oder die mit Isotyp- oder Spezies-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern abgegriffen werden.

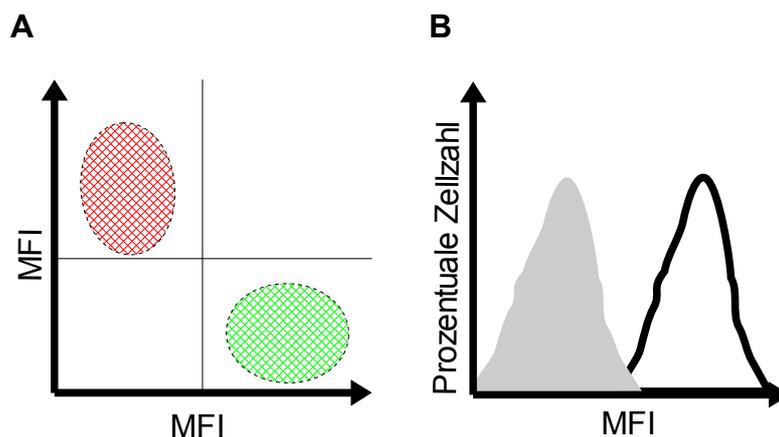
Eine weitere Färbemethode benutzt keine spezifischen Antikörper sondern Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in die Plasmamembran (DIO, DID) einlagern. Auf diese Weise können Zellpopulationen, die mit anderen gemischt werden sollen, vorher angefärbt werden und dann in der Mischung identifiziert werden.

Die Markierung der Zellen durch die Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierte Antikörper erfordert eine Analyse an einem Fluoreszenzzytometer. In der vorliegenden Arbeit wurde das LSR-II Gerät, das mit vier Lasern (Argonlaser, Heliumneonlaser, UV-Laser und violetter Laser) ausgestattet ist, verwendet. Dadurch ist es möglich bis zu 16 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu messen. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit jeweiligen Extinktions- und Emissionsmaxima, sowie die verwendeten Laser und Filter sind in Tabelle 3.5.1 zusammengefasst.

Bei der Messung der Zellen am Fluoreszenzzytometer werden diese über einen Flüssigkeitsstrom durch eine Messküvette aufgenommen und vereinzelt. So wird zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein Ereignis detektiert. Haben fluoreszenzmarkierte Antikörper an eine Zelle gebunden, werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch die vorhandenen Laser, die die entsprechende Extinktionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe simultan emittieren, angeregt. Der angeregte Farbstoff absorbiert die Energie des Laserlichtes und gibt sie in Form eines Photons einer bestimmten Wellenlänge (Emissionswellenlänge) wieder ab. Dabei ist die Wellenlänge der Extinktion kürzer als die der Emission. Mithilfe geeigneter Filter, die einen bestimmten Bereich des emittierten Lichts durchlassen, werden die Photonen durch einen Photodetektor registriert. Die Anzahl der detektierten Photonen ist dabei proportional zu der Anzahl gebundener Fluoreszenzmoleküle und somit zu der Dichte des untersuchten Moleküls. Für die Auswertung ist zu beachten, dass die Fluoreszenzintensität immer nur relativ gesehen werden kann und daher für jeden Fluoreszenzfarbstoff Kontrollansätze zu messen waren. Dies

waren entweder parallele Analysen von Kontrollzellen, die bekanntermaßen die zu untersuchenden Moleküle nicht exprimieren oder es wurde parallel zum spezifischen Antikörper eine sogenannte Isotypenkontrolle gefärbt. Unter einer Isotypenkontrolle versteht man die Färbung mit einem Antikörper, der gegen ein Molekül gerichtet ist, das von der zu untersuchenden Zellpopulation nicht exprimiert wird.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann nicht nur die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe und damit die Expression bestimmter Moleküle und deren Expressionsdichte bestimmt werden, sondern auch über das Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC) die Größe und über das Seitenstreulicht (side scatter, SSC) die Granularität der Zelle. Alle gemessenen Fluoreszenzintensitätswerte eines Zellansatzes lassen sich gegen die Anzahl der Ereignisse (Zellen) als Histogramme darstellen. Alternativ können zwei Fluoreszenzintensitätswerte gegeneinander als Punktediagramm dargestellt werden (Abb. 3.4.1.1)



**Abbildung 3.4.1.1: Darstellungsmöglichkeiten der durchflusszytometrischen Ergebnisse.** A) In der Punktediagrammdarstellung können zwei Fluoreszenzintensitätswerte gegeneinander dargestellt werden. Damit kann man die prozentualen Anteile von Zellen, markiert über zwei Marker (rot/grün); in einem Zellgemisch ermitteln. B) In der Histogrammdarstellung wird eine Fluoreszenzintensität gegen den prozentualen Anteil der Ereignisse dargestellt. Damit lässt sich die Markerexpressionsdichte als MFI gegenüber einem anderen Marker vergleichen. Höhere MFI entspricht dabei höherer Expressionsdichte.

Fluoreszenzfarbstoff	Extinktionsmaximum	Emissionsmaximum	Wellenlänge ( $\lambda$ ) des Lasers	Filter(nm)
FITC	495 nm	525 nm	488 nm	530/30
PE	564 nm	575 nm	488 nm	575/26
PB	404 nm	455 nm	355 nm	450/50
APC	650 nm	660 nm	633 nm	660/20
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	488 nm	530/30
Alexa Fluor 568	579nm	601 nm	488 nm	575/26
Alexa Fluor 647	654 nm	669 nm	633 nm	660/20
DiO	489 nm	507 nm	355 nm	530/30
DiD	644 nm	665 nm	633 nm	660/20
Propidiumjodid	493 nm	619 nm	488 nm	610/20
7-Amino-Actinomycin D	543 nm	655 nm	488 nm	610/20

**Tabelle 3.4.1.1: Fluoreszenzcharakteristika, der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, die Wellenlänge der Laser für die Anregung, sowie die Filter für die Detektion am LSR II-Durchflusszytometer.**

### 3.4.2 Unterscheidung von lebenden und toten Zellen

Tote Zellen haben eine gewisse Eigenfluoreszenz, die unter Umständen fälschlicherweise mit einer spezifischen Antikörper-Färbung verwechselt werden könnte. Außerdem kann es interessant sein, zu wissen, wieviele lebende bzw. tote Zellen bei einer Versuchsanordnung vorhanden sind. In dieser Arbeit wurden zwei Möglichkeiten verwendet, tote Zellen anzufärben.

Die erste Möglichkeit macht sich zu nutze, dass tote Zellen Farbstoffe wie Propidiumjodid aufnehmen und in ihre DNA einlagern, während in intakten lebende Zellen der Zugang zur DNA durch die Plasmamembran verhindert wird.

Propidiumjodid-positive Zellen emittieren Licht bei 670 nm, welches durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Vorteil ist, dass diese Färbung sehr schnell und einfach durchzuführen ist. Vor der Messung wird 1  $\mu$ l der Lösung mit 50  $\mu$ l der zu messenden Probe vermischt. Der Nachteil ist, dass diese Färbung nur anwendbar ist, wenn man eine Färbung der Zelloberfläche durchführt. Da bei der Färbung von Proteinen im Zellinneren die Zellen permeabilisiert werden, würde das Propidiumjodid in alle Zellen eindringen und eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ist nicht mehr möglich.

Bei intrazellulären Färbungen wurde eine zweite Möglichkeit, tote Zellen zu markieren, angewandt. Der Farbstoff 7-AAD lagert sich im Gegensatz zu Propidiumjodid kovalent in die DNA ein. Daher wird es durch die Permeabilisierung nicht ausgewaschen. 7-AAD emittiert Licht bei der selben Wellenlänge wie Propidiumjodid. Nachteil dieser Methode ist, dass sie wesentlich zeitaufwendiger ist. Nach der Oberflächenfärbung der Zellen werden 10µl der 7-AAD Lösung mit 50µl der Probe vermischt und diese für 30min inkubiert. Danach folgen zwei Waschschrte mit PBS bevor mit der intrazellulären Färbung fortgefahren werden kann.

### 3.4.3 Färbung von Markern auf der Zelloberfläche

Für die Färbung von Oberflächenantigenen werden zwischen  $5 \cdot 10^4$  und  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in FACS-Puffer aufgenommen und mit verschiedenen, direkt-markierten Antikörpern 30min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 1µl Propidiumjodid versetzt und sofort gemessen.

### 3.4.4 Nachweis intrazellulärer Proteine

Für die intrazelluläre Färbung von Proteinen, wie Granzym A, Granzym B, Perforin und CCL5 wurden direkt-markierte Antikörper (Granzym A und Granzym B) oder unmarkierte Antikörper (CCL5, Perforin) verwendet wurde. Bei unmarkierten Antikörpern war ein zweiter Inkubationsschritt mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper nötig. Eine indirekte Abgreifmethode kann nur dann in Kombination mit weiteren Antikörpern angewandt werden, wenn der unmarkierte Antikörper entweder von einer anderen Spezies war als die anderen Antikörper, oder wenn keiner der anderen Antikörper dem selben Isotyp angehörte. Im letzten Fall muss mit isotypspezifischen sekundären Antikörpern abgegriffen werden.

Wurde vor der intrazelluläre Färbung noch eine Oberflächenfärbung durchgeführt, so geschah dies vor der 7-AAD Färbung der Zellen. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen nach 7-AAD Färbung mit 500µl einer 1% PFA Lösung für 30min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zur Permeabilisierung mit 500µl einer 0,1% Saponinlösung gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit den spezifischen Antikörpern für 20min in 100µl einer 0,35%

Saponinlösung bei 4°C inkubiert. Danach folgte ein Waschschriff mit einer 0,1% Saponinlösung. Die Färbung mit dem Sekundärantikörper für Perforin wurde auf die selbe Weise wiederholt und nach einem weiteren Waschschriff konnten die Proben gemessen werden. Falls die Probe nicht umgehend gemessen wurde, wurde die Probe für 20min mit 1% PFA Lösung fixiert.

### 3.4.5 Auswertung der Färbungen am Durchflusszytometer

Vor der Messung wurde mit einer ungefärbten Probe die Lage der zu untersuchenden Zellpopulation im FSC/SSC so optimiert, dass sie ungefähr in der Mitte des Punktediagramms lag. Dann wurde mittels der positiven und negativen Kontrollansätze die PMT (Sensoren zur Detektion schwacher Lichtsignale, *Photomultiplier tubes*)-Einstellungen der einzelnen Laser so eingestellt, dass die negative Kontrolle möglichst weit links und die positive Kontrolle möglichst weit rechts im Histogramm lag.

Die Messung der Kontrollansätze ist zudem wichtig, wenn mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, deren Emissionsspektren sich überlappen. Diese Überlappung führt dazu, dass ein Signal nicht nur in einem Fluoreszenzkanal detektiert wird, sondern in einen benachbarten Kanal überstrahlt. Dies führt dazu, dass scheinbar eine Zelle für zwei Fluoreszenzen positiv ist. Diese Überstrahlung muss durch Kompensation der Fluoreszenzintensitäten gegeneinander berichtigt werden. Dazu wird vor der Auswertung der eigentlichen Messungen mittels Fluoreszenzeinzelfärbung über die Software die spektrale Überlappung gemessen und korrigiert. Alle Daten wurden mittels der Software FlowJo (TreeStar Corp.) ausgewertet, indem zuerst das lebend/tot Verhältnis analysiert wurde. Nur die lebenden Zellen (7-AAD oder PI negative Zellen), wurden über eine geeignete Auswahlstrategie („*Gating*“) eingeschlossen. Im nächsten Schritt wurden Zellen, die aneinander klebten, ausgeschlossen so dass nur einzelne Zellen analysiert wurden. Dies ist wichtig, da zwei für zwei verschiedene Fluoreszenzen positive Zellen die aneinander kleben, als ein Ereignis, d.h. als eine doppelt positive Zelle angesehen werden. Dann wurde die zu untersuchende Zellpopulation an Hand ihrer Zellgröße und Granularität (FSC/SSC) ausgewählt. Die ausgewählte Population wurde dann auf die Expression der zu untersuchenden Marker hin analysiert, indem die Fluoreszenz der einzelnen Marker als Histogramm dargestellt wurde. Die mediane Fluoreszenz diente als direktes Maß für die Expressionsdichte des

Markers. Bei Mischpopulationen aus Zellen, die für einen Marker positiv bzw. negativ waren, wurde der prozentuale Anteil der Zellen, die für die Marker positiv waren, im Punktediagramms bestimmt.

### 3.5 Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen

#### 3.5.1 Färbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die verwendeten CHO-, CHO-Rapi- und CHO-mRapi-Zellen wurden drei Tage vor Versuchsbeginn 1:4 gesplittet. Am Vortag des Phagozytoseversuchs wurden die Zellen mit MEM-alpha Medium auf eine Konzentration von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit  $7 \mu\text{l/ml}$  Vybrant<sup>®</sup>DiO für 30min bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Rotor inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fünfmal mit Medium gewaschen und wieder auf  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 3ml der Zellsuspension zur Apoptoseinduktion in T75-Zellkulturflaschen gegeben (siehe 3.5.2). Am Versuchstag wurden die Makrophagen geerntet und auf eine Konzentration von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml mit AIMV-Medium eingestellt und mit 7ml Vybrant<sup>®</sup>DiD für 30min bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Rotor inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Makrophagen fünfmal mit AIMV-Medium gewaschen und auf eine Konzentration von  $0,1 \times 10^6$  Zellen/100 $\mu\text{l}$  eingestellt.

#### 3.5.2 Induktion der Apoptose in CHO-Zellen

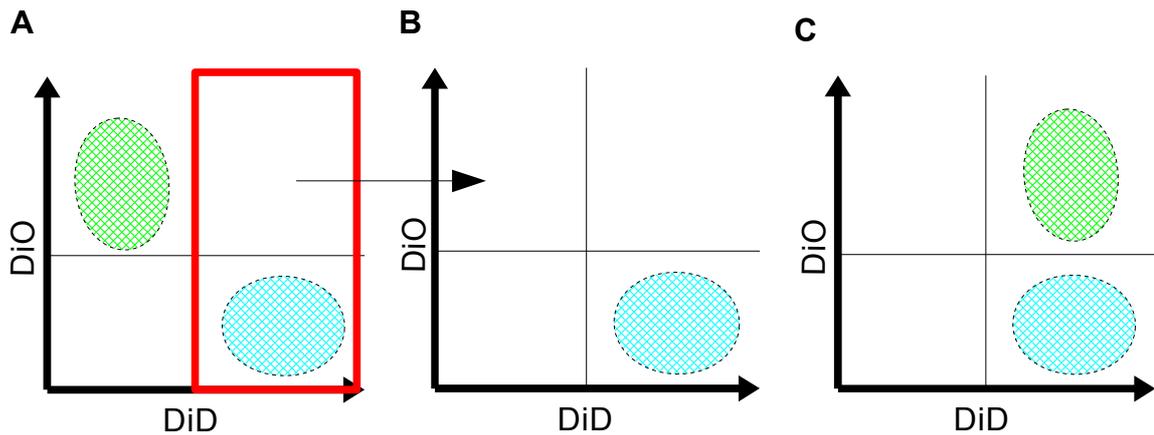
Zur Herstellung apoptotischer Zellen wurden die DiO-markierten CHO-Zellen ( $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml) mit 200nM Staurosporin für 17-21h inkubiert. Ab 17h Inkubationszeit wurden die Zellen regelmäßig mikroskopisch untersucht. Sobald sie bläschenartige Fortsätze aufwiesen, was als Zeichen von Apoptose angesehen wird, wurde die Staurosporininkubation durch Abzentrifugation beendet. Die apoptotischen Zellen wurden auf eine Konzentration von  $0,3 \times 10^6$  Zelläquivalente/100 $\mu\text{l}$  in AIMV Medium eingestellt.

### 3.5.3 Phagozytose apoptotischer Zellen

Die DiD-markierten Makrophagen ( $0,1 \times 10^6$  Zellen/100 $\mu$ l) wurden mit den apoptotischen Zellen ( $0,3 \times 10^6$  Zelläquivalente/100 $\mu$ l) im Verhältnis 1:3 gemischt und für 30 bzw. 60min bei 37°C und 4°C inkubiert. wobei die Röhrchen für den 4°C-Ansatz für den versuch vorgekühlt wurden.. Als Kontrolle wurden Makrophagen alleine bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen wurden 500 $\mu$ l eiskalter FACS-Puffer zugegeben und 5min mit 1500rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und unmittelbar am Durchflusszytometer gemessen.

### 3.5.4 Bestimmung der Phagozytoseaktivität

Die Einstellungen am Durchflusszytometer erfolgten mit Vybrant<sup>®</sup>DiD-Makrophagen mit apoptotische Tumorzellen bzw. mit Vybrant<sup>®</sup>DiD<sup>+</sup>-Makrophagen alleine. Dabei wurden die PMT-Werte und Kompensation so justiert, dass die Makrophagen- und Tumorzellpopulation voneinander im Wolkendiagramm von Vybrant<sup>®</sup>DiD gegen Vybrant<sup>®</sup>DiO eindeutig abgetrennt waren (Abb. 3.5.4.1 A). Die Grenze zwischen DiO-positiven und DiO-negativen Zellen im Makrophagen-Fenster wurde an Hand der DiO<sup>+</sup>-Fluoreszenz im Ansatz „Makrophagen ohne Tumorzellen“ (3.5.4.1 B) ermittelt. In diesem Fenster wurde dann das Vybrant<sup>®</sup>DiO Signal im Ansatz „Makrophagen mit Tumorzellen“ analysiert (3.5.4.1 C).



**Abbildung 3.5.4.1: Auswahlstrategie des Phagozytoseversuchs.** **A)** Die DiD-positive Makrophagen Population und die DiO-positiven CHO-Zellen wurden über die PMT und Kompensationseinstellungen so justiert, dass die Populationswolken im Punktediagramm eindeutig getrennt waren. Dann wurden die Makrophagen über ein Auswahlfenster (rot) ausgewählt. **B)** Über die DiO-Fluoreszenz der Makrophagen ohne apoptotischen Zellen wurden die Grenzen zwischen DiO-negativen und positiven Makrophagen festgelegt. **C)** Im Mischungsansatz von Makrophagen mit DiO-positiven apoptotischen Zellen wurden dann der prozentuale Anteil DiO+ Makrophagen ermittelt. Im Makrophagenfenster wurde das DiO-Signal im Ansatz von Makrophagen mit Tumorzellen analysiert.

Diese Auswahlstrategie erlaubt die Bestimmung des prozentualen Anteils phagozytischer Makrophagen in einem bestimmten Zeitraum. Um zu bestimmen, wieviele apoptotische Zellen von einem Makrophagen in einem bestimmten Zeitraum aufgenommen worden waren, wurde die DiO-Fluoreszenzintensität (DiO-MFI) im DiD+ Makrophagen Fenster bestimmt. Da die verwendeten CHO-Zelllinien nach DiO-Markierung nicht die gleiche Ausgangsfluoreszenzintensität hatten, musste ein Faktor ermittelt werden, der die unterschiedlichen DiO Fluoreszenzintensitäten ausgleicht. Dazu wurden die DiO-Fluoreszenzintensitäten der markierten CHO-Zelllinien alleine bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der Zelllinie mit der höchsten DiO-Fluoreszenzintensität wurde gleich eins gesetzt und die anderen Zelllinien dazu in Relation gesetzt. Mit diesem Faktor ( $K_{FI}$ ) wurde die mediane DiO-Fluoreszenzintensität der Makrophagen multipliziert (normalisierte MFI). Dann wurde die normalisierten MFI-Werte des 4°C Ansatzes von den Werten des 37°C Ansatzes abgezogen, um den Anteil an der Oberfläche gebundenen apoptotischen Zellen zu entfernen. Die Phagozytoseaktivität ergibt sich dann aus folgender Formel:

$$\text{Phagozytoseaktivität} = (\text{DiO MFI der DiD pos. M } \Phi, 37^\circ \text{C} - \text{DiO MFI der DiD pos. M } \Phi, 4^\circ \text{C}) * K_{FI}$$

## 3.6 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

### 3.6.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Immunhistochemie ist eine Methode, bei der Gewebeschnitte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern angefärbt werden. Um eine Signalverstärkung zu erhalten, wurden unmarkierte Primärantikörper verwendet und mit markierten sekundären Antikörpern abgegriffen. Die Detektionsantikörper der Immunhistochemie sind mit Enzymen verbunden, die ein farblose Chromogen in unlösliche, gefärbte Endprodukte umwandelt. Bei jeder Färbung wurde mit einer Negativkontrolle, bei der anstatt des Primärantikörpers PBS verwendet wurde, die Spezifität des Nachweisverfahrens überprüft.

### 3.6.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebe wurden in „Tissue Tec“ eingebettet und am Kryotom bei  $-20^{\circ}\text{C}$   $5\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese Gewebeschnitte wurden auf speziell beschichtete SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen. Von allen Geweben wurden ca. 20 Schnitte in Serie angefertigt, über Nacht luftgetrocknet, und dann für die Färbung verwendet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6.3 Immunhistochemische Färbung mittels der APAAP-Methode

Unter der **APAAP**-Methode versteht man die **Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Methode**. Das Besondere der Färbemethode ist, dass der Primärantikörper über einen Brückenantikörper mit dem Detektionsantikörper verbunden wird. Wenn der Primärantikörper von der Maus stammte, wurde als Brückenantikörper ein polyklonales Gemisch von Kaninchen-Antikörpern verwendet, die verschiedene Epitope auf dem Fab-Arm des Primärantikörpers erkennen. Dadurch können mehrere Moleküle des Detektionsantikörpers, der in diesem Fall wie der Primärantikörper aus der Maus stammte,

von dem Brückenantikörper abgegriffen werden und so das Signal verstärken. Analoge Systeme gibt es auch für Ratten und Kaninchen Primärantikörper. Der Detektionsantikörper hat an jedem seiner beiden Fab-Arme ein alkalische Phosphatase (AP)-Molekül gebunden, was wiederum zu einer Verstärkung des Signals führt. Die AP hydrolysiert Naphtholphosphatester zu Phenol und Phosphat. Die entstandenen Phenole bilden mit dem Chromogen Neufuchsin einen unlöslichen roten Azofarbstoff.

Für die Färbung wurden die Schnitte für 10min in Aceton fixiert, mit PBS gewaschen und kurz getrocknet. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, so dass Färbereagenzien lokal auf den Schnitt begrenzt bleiben und nicht ablaufen. Es wurde eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mittels 2% BSA-Lösung in PBS für 30min durchgeführt. Die Schnitte wurden für 120min mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert, deren optimale Konzentration in Vorversuchen ausgetestet wurden (siehe Tabelle 2.5.1.1) danach 3mal mit PBS gewaschen und für 30min mit dem Brückenantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde für wiederum 30min mit dem Detektionsantikörper inkubiert. Anschließend wurde noch einmal für jeweils 15min sowohl mit dem Brückenantikörper als auch mit dem Detektionsantikörper inkubiert. Zwischen den Schritten wurde 3 mal mit PBS gewaschen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden die Schnitte in einer Küvette unter dem Abzug für 20min im Dunkeln mit der Neufuchsin-Färbelösung inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Schnitte mit PBS gespült und die Zellkerne mit Hämalaunlösung für 30sec gefärbt. Die Hämalaunlösung wurde zuerst mit destilliertem Wasser abgewaschen und die Schnitte dann mit Leitungswasser für mehrere Minuten gespült. Die Ionen aus dem Leitungswasser reagieren dabei mit der Hämalaunlösung, die negativ geladene Moleküle wie DNA bindet, und „bläuen“ die Zellkerne. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckt.

### 3.6.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Für eine qualitative Beurteilung der Färbung wurden mehrere Gesichtsfelder bei einer 400fachen Vergrößerung analysiert und photographiert. Zur Quantifizierung von positiven gefärbten Ereignissen wurden in mindestens 10 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern bei einer 400fachen Vergrößerung die Färbereignisse gezählt. Dabei wurden stark nekrotische Areale ausgelassen und es wurden nur Färbereignisse gezählt, die die für den jeweiligen Marker typischen Eigenschaften zeigten, z.B. oberflächenständige Färbung für CD2 und CD8.

## 3.7 Immunfluoreszenzfärbung von aufgetropften Zellen

### 3.7.1 Allgemeines

Durch die Immunfluoreszenzfärbung kann das Vorhandensein und die Lokalisation mehrerer Marker gleichzeitig innerhalb einer Zelle über die Bindung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern untersucht werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen wurden an einem konfokalen Laser-Rastermikroskop (Laser-Rastermikroskop TCS SP2 von Leica) durchgeführt. Das Mikroskop war mit zwei Heliumneonlasern (633nm bzw. 543nm), einem Diodenlaser (405nm) und einem Argonkryptonlaser (488nm) ausgestattet. Mit dieser Art von Mikroskopie ist es nicht nur möglich bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu analysieren. Ein wesentlicher Vorteil zu einem nicht konfokalen Fluoreszenzmikroskop besteht darin, dass das Fluoreszenzsignal aus einer optischen Ebene gemessen wird und alle Signale aus anderen optischen Ebenen ausgeblendet werden. Dadurch ist es möglich durch das Zusammensetzen mehrerer Schnittebenen ein räumliches Bild zu erzeugen und die Kollokalisierung von Markern zu bestimmen.

### 3.7.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die aufgetropften Zellen wurden 10min mit eiskaltem 100% Aceton fixiert. Dann erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit Blockierungslösung für 20min. Die Schnitte wurden danach 3mal mit PBS gewaschen und dann mit einem Gemisch aus bis zu drei Antikörpern in Antikörperverdünnungslösung für 1h inkubiert. Die Antikörper mussten entweder aus verschiedenen Spezies stammen oder einen unterschiedlichen Isotyp haben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gewebeschnitte 3mal mit PBS gewaschen und nachfolgend 1h mit einer Lösung, die fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper enthielt, für 1h inkubiert. Die sekundären Antikörper mussten dabei für Spezies des primären Antikörpers oder für den Isotyp spezifisch sein. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, wurden die Schnitte im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut gewaschen und für 10min mit einer 4%igen PFA-Lösung fixiert. Zur Anfärbung der Zellkerne

wurden die Objektträger für 1 Minute in eine DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gegeben. Nachdem überschüssige DAPI-Lösung abgewaschen wurde, wurden die Gewebeschnitte mit Vectashield eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Schnitte wurden bis zur Analyse am konfokalen Laser-Rastermikroskop lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

### 3.7.3 Auswertung mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Ölimmersionsobjektivlinse (HCX PL APO 63 x 1,40NA), mit einer resultierenden Gesamtvergrößerung von 630fach. Das Mikroskop war mit zwei Heliumneonlasern (633nm bzw. 543nm), einem Diodenlaser (405nm) und einem Argonkryptonlaser (488nm) ausgestattet. Die Detektion der Emissionen erfolgte über getrennte PMT-Einheiten. Durch Regelung des Wellenlängenbereich, der Aufnahmezeitpunkt wurde das Überstrahlen einer Fluoreszenz in jeweils andere Fluoreszenzkanal ausgeblendet. Zusätzlich wurden die vier verwendeten Fluoreszenzmoleküle im sequentiellen Modus aufgenommen. Um die räumliche Ausdehnung zu erfassen, wurden jeweils mehrere optische Schnittebenen in der z-Dimension (z-Stacks, Abstand 0,3µm) aufgenommen.

Die Intensitäten einzelner Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb einer Zelle wurden in der Bildbearbeitung durch beliebige Farben dargestellt. Wenn zwei Proteine, die durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe markiert wurden, räumlich eng nebeneinander liegen (Kokalisation), kommt es zur Überlagerung der für die Darstellung verwendeten Farbsignale. Die Überlagerung wird durch die Mischfarbe der entsprechenden Farben optisch sichtbar. So entsteht, wenn ein rotes Farbsignal mit einem grünen überlagert, ein gelbes Farbsignal. Die Kokalisation wurde über die Überlagerung der Histogrammprofile mittels Leica konfokal Software LCSLite geprüft. Eine Kokalisation ist nur dann der Fall, wenn zwei Marker in der selben optischen Ebene zusammen auftreten. Dies erfordert die Analyse der einzelnen optischen Schnittebenen (z-Ebenen). Die Bearbeitung der in dieser Arbeit gezeigten Bilder erfolgte nur durch Veränderungen des Kontrast und/oder der Helligkeit des gesamten Bildes mittels Leica Software (Leica konfokal Software LCSLite).

## 3.8 Molekularbiologie

### 3.8.1 Isolierung von mRNA aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA aus Tumorgewebe wurden Gewebeschnitte am Kryotom analysiert. Pro Gewebestück wurden 20 Schnitte mit einer Schichtdicke von 5µm in einem Eppendorfgefäß gesammelt und auf Trockeneis gelagert. Die RNA-Isolierung wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit durchgeführt.

Das Gewebe wurde mit 350µl RLT-Puffer (Lysepuffer) lysiert und danach bei 12500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 350µl 70% Ethanol hinzugegeben. Die 700µl Lösung wurden in die „RNeasy mini column“ überführt und 1min bei 10000rpm zentrifugiert. Nachdem der Durchlauf verworfen wurde, wurden 350µl RW1-Puffer (Waschpuffer) zugegeben und für 15sec bei 10000rpm zentrifugiert. Über DNase-Verdau wurden vorhandene DNasen entfernt und noch einmal mit 350µl RW1-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Dann wurde die RNA mit 30µl RNasen-freiem Wasser eluiert.

#### 3.8.1.1 Messung des RNA-Gehalts

Die isolierte RNA wurde mit dem Qubit System über Fluoreszenzmessung analysiert. Dafür wurde mit Hilfe des im Kit enthaltenen Puffers und Fluoreszenzfarbstoffs die Reaktionslösung hergestellt. Dann wurden 10µl der beiden enthaltenen Standardproben und 1 bis 10µl der isolierten RNA mit 190µl bis 199µl Reaktionslösung für 2min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zuerst mit den Standardproben das Gerät kalibriert und dann die Proben

gemessenen. Über die Formel  $Messwert * \left( \frac{200}{Probevolumen} \right)$  wurde dann der Gehalt an RNA in µg/ml der jeweiligen Probe berechnet.

### 3.8.2 cDNA-Synthese

Unter cDNA versteht man DNA, die zu ihrer RNA komplementär ist. Im Unterschied zur genomischen DNA enthält sie keine Introns mehr. Für die Umschreibung von RNA in cDNA ist das Enzym Reverse Transkriptase notwendig. Als Startpunkt für die Umschreibung wurden Hexanukleotidprimer verwendet, die sich komplementär an die RNA binden.

Pro RNA-Isolat wurden zwei Ansätze benötigt. Ein Ansatz mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT+) und einer als Kontrolle ohne das Enzym (RT-).

Jeder Ansatz enthielt folgende Zusätze:

9,0µl 5x Puffer

1,0µl 25mM dNTP-Mischung

2,0µl 0,1 M DTT

1,0µl RNaseOut (40U/µl)

0,5µl lineares Acrylamid (15 µg/ml)

0,5µl Hexanukleotide

1,0µl Superscript II (RT+) bzw. H<sub>2</sub>O (bei RT-)

-----  
30µl RNA-Lösung mit einem Gehalt von 1µg RNA

Beide Ansätze wurden für 1,5 Stunden bei 42 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und danach bei -20 gelagert.

### 3.8.3 Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)

#### 3.8.3.1 Allgemeine Grundlagen

Über die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wird DNA vervielfältigt, so dass selbst kleinste Mengen an DNA nachweisbar werden. Die PCR setzt sich aus drei Stufen zusammen. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die Temperatur der Probe auf 90 – 94 °C erhöht, so dass sich die beiden Stränge der DNA trennen. Danach wird die Temperatur bis zur optimalen Anlagerungstemperatur der Primer abgesenkt (Anlagerung). Der letzte Schritt dient der Verlängerung der Primer durch die DNA-Polymerase (Verlängerung). Diese drei Schritte werden 20- 40 mal wiederholt. In jedem der Zyklen verdoppelt sich die synthetisierte DNA-Menge, so dass sich eine exponentielle Zunahme des Produkts (Amplifikat) ergibt.

#### 3.8.3.2 Die quantitative Echtzeit („*real-time*“) reverse Transkriptase (RT)-PCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der die Menge an Amplifikat am Ende der Amplifikation bestimmt wird, wird bei der „*Real-time* PCR“ die Menge an Amplifikat während der gesamten Dauer der PCR bestimmt. Möglich machte dies die Entwicklung von fluoreszierenden Sonden. Es gibt derzeit zwei Arten solcher Sonden, zum einen die hier verwendeten Taqman- oder Hydrolysesonden und die Hybridisierungs sonden, die im *LightCycler* System verwendet wird. Die Taqmansonden sind genspezifische Oligonukleotide, die an ihrem 5' Ende einen fluoreszierenden Farbstoff und an ihrem 3' Ende einen sogenannten *Quencher*-Farbstoff enthalten. Die Nachbarschaft von fluoreszierendem Farbstoff und *Quencher*-Farbstoff bewirkt, dass, wenn es zu einer Anregung des fluoreszierenden Farbstoffes kommt, dieser die Energie nicht emittiert, sondern auf den *Quencher*-Farbstoff überträgt. Dieses Prinzip nennt man FRET (fluorescence resonance energy transfer). Die im Taqman System verwendete Taq-Polymerase besitzt 5' --> 3' Nukleaseaktivität und kann, wenn sie während der Primerverlängerung auf die gebundene Sonde trifft, diese spalten. Durch diese Spaltung wird der fluoreszierende Farbstoff vom *Quencher*-Farbstoff getrennt und es gibt kein FRET mehr, so dass der fluoreszierende Farbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren kann. Die Zunahme an Fluoreszenzsignal ist somit proportional zur Zunahme an

Amplifikat. Als Fluoreszenzfarbstoff wird meist FAM (6-carboxyfluorescein) oder VIC, als *Quencher*-Farbstoff wird TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) verwendet. Diese Methode ist nicht nur besonders spezifisch, sondern auch hoch sensitiv, was sie zu einer geeigneten Methode macht, Zielgene mit einem sehr geringen Expressionsspiegel zu analysieren. Die hohe Spezifität resultiert aus der Komplementarität der Primer, der Sonde und der Zielsequenz, denn es entsteht nur ein Signal, wenn die Sonde während der Verlängerung an die Zielsequenz bindet [42].

### 3.8.3.3 Durchführung

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt, um RNase-Aktivität zu verhindern. Für jede Zielsequenz wurde ein Gemisch hergestellt, das aus dem spezifischen Primer-Sonden-Gemisch und dem käuflichen „MasterMix“, der unter anderem die Tag-Polymerase enthält, und Wasser besteht.

Ansatz pro Probe:

10µl MasterMix

1µl Primer/Sonden Gemisch (kommerziell)

7µl Wasser

-----

18µl Gesamt-Gemisch

Um den Pipettierverlust auszugleichen werden mehr Ansätze berechnet als Proben vorhanden waren. Die Anzahl der Ansätze ergibt sich aus der Formel:

$$(Anzahl\ der\ Proben * 2\ (Duplikate) * 20) / 18 = Multiplikator\ für\ die\ Anzahl\ der\ Ansätze$$

Pro Probe wurden 20µl Gesamt-Gemisch und 2,2µl cDNA gemischt und davon 20µl auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Es wurden jeweils Duplikate bestimmt und zu jeder Zielsequenz eine NTC-Probe (non-template control Probe) gemessen, welche keine cDNA enthält.

Nachdem alle Proben aufgetragen waren, wurde die Platte mit einer Folie verschlossen,

abzentrifugiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

Initiale Denaturierung:	2Min bei 50°C, danach 10Min bei 95°C
Aufschmelzung	15sec/Zyklus bei 95°C,
es wurden 40 Zyklen gemessen	
Anlagerung und Verlängerung	1Min bei 60°C

Ein PCR-Lauf hatte eine gesamt Länge von 1:48 Stunden.

### 3.8.3.4 Quantifizierung

Die Taqman-PCR wurde am ABI Prism 7700 Sequence Detection System (SDS) von Applied Biosystems durchgeführt. Die Proben werden dabei auf Mikrotiterplatten aufgetragen und ein Laser induziert an diesem Gerät die Fluoreszenz, die kontinuierlich detektiert wird. Die Computersoftware berechnet dann den  $\Delta R_n$  aus der Gleichung  $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$ , wobei  $R_n^+$  die Fluoreszenzemission des Produkts und  $R_n^-$  die Fluoreszenzemission der Basislinie ist. Der  $\Delta R_n$  drückt also den Abbau der Sonde während der PCR aus. Die Computersoftware trägt den  $\Delta R_n$  gegen die Zyklenzahl in einem sogenannten „Amplification-Plot“ auf. In diesem „Amplification-Plot“ wird ein willkürlicher Grenzwert festgelegt, an dem die  $\Delta R_n$  Werte die Basislinie überschreiten. Unter dem Ct-Wert (Threshold cycle) versteht man die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz den gewählten Grenzwert überschreiten. Der Ct-Wert ist hoch, wenn die Menge an Zielsequenz in der cDNA gering war und niedrig, wenn sie hoch war. Deshalb wird der Ct-Wert zur quantitativen Messung der eingesetzten Menge benutzt. Die Quantifizierung kann einmal über eine Standardkurve (absolute Quantifizierung) oder über die „Comperative Ct-Methode“ (relative Quantifizierung) erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Comperative Ct-Methode durchgeführt.

### 3.8.3.5 Comperative Ct-Methode

Bei dieser Methode werden arithmetische Formeln zur Berechnung des relativen Expressionsniveau benützt. In einem ersten Schritt werden alle Proben zu einem endogenen Haushaltsgen normalisiert:  $Ct$  des Haushaltsgen –  $Ct$  der Probe =  $\Delta Ct$ . Die Menge an Zielgen ergibt sich dann aus der Formel  $2^{\Delta Ct}$ , da die PCR eine exponentielle Amplifikat-Zunahme hat. Der Vorteil der „Comperative Ct-Methode“ ist, dass alle 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte für die Messung von Proben verwendet werden können, da keine Standardkurve nötig ist. Ein Nachteil besteht aber darin, dass sie nur durchgeführt werden kann, wenn ein geeignetes Haushaltsgen zur Verfügung steht. Ein geeignetes Haushaltsgen sollte dieselbe Amplifikationseffizienz haben und in den zu untersuchenden Gewebe konstant exprimiert sein. Kriterien zur Auswahl von Haushaltsgenen können aus folgenden Referenzen: [43;44] entnommen werden. Ob ein bestimmtes Amplifikat als Haushaltsgen zur Normalisierung geeignet ist wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (Normfinder, Multid) evaluiert.

## 3.9 Statistische Auswertung

### 3.9.1 Verwendete Programme

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism in der Version 5.0 für Windows der Firma GraphPad Software (San Diego California USA) verwendet.

### 3.9.2 Verwendete statistische Testverfahren

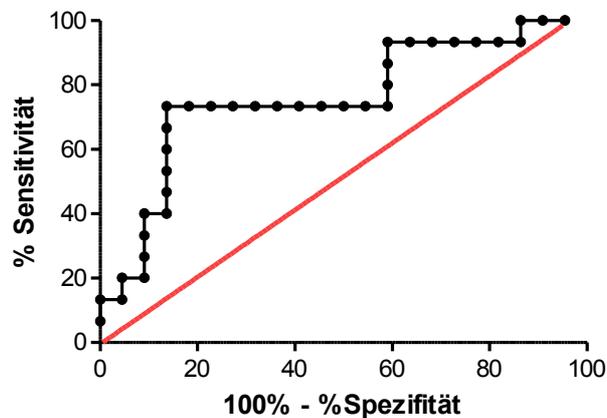
In dieser Arbeit wurden verschiedene statistischen Testverfahren angewandt. Bei allen Testverfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha < 0,05$  angenommen.

#### 3.9.2.1 Mann-Whitney-U Test

Der Mann-Whitney-U Test (äquivalent zum Wilcoxon-Rangsummentest) ist ein nicht parametrisches Testverfahren, das heißt er ist für die statistische Untersuchung von geringen Datenmengen und nicht normalverteilten Daten geeignet. Der Mann-Whitney-U Test untersucht bei einer zweiseitigen Fragestellung, ob sich die Alternativhypothese signifikant von der Nullhypothese unterscheidet, also ob der Mittelwerte einer Gruppe A signifikant unterschiedlich ist zu einem Mittelwert einer Gruppe B. Einseitige Alternativhypothesen, d.h. ist die Alternativhypothese signifikant größer oder niedriger als die Nullhypothese, waren für dieser Arbeit nicht relevant. [45]

### 3.9.2.2 „Receiver Operator-Characteristic“ Analyse

Die Receiver Operator-Characteristic (ROC) Analyse ist ein Verfahren mit dem die Qualität diagnostischer Methoden verglichen wird. In einer Graphik werden die Sensitivität (entspricht der Rate der richtig positiven) und die 1-Spezifität (entspricht der Rate der falsch positiven) in Abhängigkeit von Grenzwerten (cut-off) dargestellt. Verläuft die Kurve in der Diagonalen, so erfolgt keine Unterscheidung der beiden Gruppen. Je weiter links von der Diagonalen die Kurve verläuft desto höher ist die Sensitivität und Spezifität der Einteilung (Abb. 3.9.2.1).



**Abbildung 3.9.2.1: Beispiel einer ROC-Kurve.** Die ROC-Kurve stellt die Sensitivität (%) und die 1-Spezifität (%) in Abhängigkeit von Grenzwerten dar. Verläuft die Kurve als Diagonale (rote Linie), so ist die AUC bei 0,5 und die beiden Gruppen können nicht unterschieden werden. Je weiter links von der Diagonalen die Kurve verläuft (schwarze Linie) desto höher die AUC und desto höher ist die Sensitivität und Spezifität der Einteilung.

Für die Validität der Einteilung ist die Fläche unter der Kurve (area under curve, AUC) entscheidend. Liegt die Kurve auf der Diagonale dann hat die Fläche einen Wert von 0,5. Das bedeutet die Wahrscheinlichkeit, dass mit dem getesteten Parameter eine Einteilung zu einer von zwei Gruppen richtig ist, liegt bei 50%. Jeder Wert über 0,5 bedeutet, dass die Einteilung nicht auf bloßem Zufall beruht. Medizinische relevant sind Werte ab 0,6 [46]. Die Berechnung der AUC Werte beruht auf einem nicht parametrischen Testverfahren und wird mit einem p-Wert angegeben, der unter 0,05 liegen muss, damit die Analyse statistisch verwertbar war. Aus der ROC ergeben sich Grenzwerte, mit denen Datenwerte mit einer bestimmten Sensitivität und Spezifität in zwei Gruppen geordnet werden [45].

### 3.9.2.3 Korrelationsanalyse nach Spearman

Der Zusammenhang zwischen zwei Variablen wird mit einem sogenannten Korrelationskoeffizienten bestimmt. Es wurde der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman für nicht-parametrische Testverfahren verwendet. Im Gegensatz zum Pearson Korrelationskoeffizient für parametrische Daten muss die Beziehung zwischen den Variablen nicht linear sein, wodurch die Analyse robust gegenüber Ausreißern ist. Für jede Korrelation ergibt sich ein Korrelationskoeffizient „Rho“, der positiv ist, wenn es sich um eine direkte Korrelation handelt und negativ ist, wenn die Korrelation invers ist. Zu diesem Korrelationskoeffizient Rho gehört ein p-Wert, der die Signifikanz der Korrelation angibt [45].

### 3.9.2.4 Kontingenztabelle

Durch die Kontingenztabelle werden die Häufigkeiten von nominal (Zahlenwerten) oder ordinal (z.B. krank, gesund) Variablen statistisch mit einander verglichen. Dafür werden die Daten in zwei Gruppen geordnet, im einfachsten Fall in ein 2x2 Quadrat eingetragen (Beispiel Tabelle 3.9.2.1). Es wird bei kleinen Datenmengen meist über einen Test von Fisher ermittelt, ob die Häufigkeiten in den Quadranten signifikant unterschiedlich sind. In Tabelle 3.9.2.1 ist als Beispiel die Analyse der Frage, ob Raucher signifikant häufiger an einer Lungenkrankheit erkranken als Nichtraucher, angegeben. 100 Raucher und Nicht-Raucher wurden der Kategorie krank oder gesund zugeteilt. Cut-off Werte für krank oder gesund können z.B. vorher in einer ROC-Analyse ermittelt werden. Mittels eines Rechenverfahrens wird an Hand der Werte im 2x2 Quadrat berechnet, ob der Zusammenhang Raucher/krank gegenüber Nichtraucher/gesund statistisch signifikant ist. Die Kontingenztabelle ist somit die Anwendung von ROC-Daten und liefert eine Aussage, ob das mittels ROC-Analyse evaluierte Entscheidungskriterium ein sinnvolles Mittel zur Gruppeneinteilung ist. Zusätzlich erhält man einen relativen Risikowert (RR), welcher besagt, um welchen Faktor wahrscheinlicher es ist, dass ein Raucher an einer Lungenkrankheit erkrankt.

	krank	gesund
Raucher	63	17
Nicht-Raucher	17	63

**Tabelle 3.9.2.1:** Beispiel für eine 2x2 Kontingenztabelle

Neben der Häufigkeit und dem relativen Risiko werden über die Kontingenzanalyse auch der positive und negative prediktive Wert der Analyse bestimmt. Der positive prediktive Wert gibt in unserem Beispiel die Zahl der Raucher an, die in die Kategorie „Krank“ eingeteilt wurden und auch wirklich krank waren und nicht falsch eingeteilt wurden, z.B auf Grund von Messfehlern. Der negative prediktive Wert wiederum gibt den Anteil an Rauchern an, die als gesund eingeteilt wurden und es auch tatsächlich waren. Ein weiterer ermittelter Wert ist die Likelihood ratio. Sie gibt an wie wahrscheinlich es z.B. ist das wenn man als Raucher in die „krank“ Gruppe geordnet wurde, dann auch wirklich krank ist. Sie berechnet sich aus der

Formel:  $\frac{\text{Sensitivität}}{1 - \text{Spezifität}}$ . Dieser Wert hat Bedeutung, wenn anzugeben ist, wieviel wahrscheinlicher ein Patient mit positivem Testergebnis wirklich die untersuchte Krankheit hat als ein Patient mit einem negativen Testergebnis [45].

### 3.9.2.5 Überlebensanalyse

Eine Überlebensanalyse sagt aus, ob das mediane Überleben von zwei über einen Parameter eingeteilten Gruppen (z.B. ROC-Grenzwert), signifikant unterschiedlich ist. Dafür werden die Ergebnisse eines Experiments gegen die Zeit bis zum Tod aufgetragen und dann berechnet, ob das mediane Überleben in den beiden Gruppen signifikant unterschiedlich ist. Dazu werden jedem Patienten entweder 0 oder 1 zugeordnet. 1 bedeutet, dass der Patient an der untersuchten Krankheit gestorben, während 0 bedeutet, dass der Patient entweder noch am leben ist, aus der Studie ausgeschieden ist oder an einer anderen Ursache verstorben ist. Die Überlebenskurven werden als Kaplan-Meier Kurven dargestellt und der Unterschied im Kurvenverlauf der beiden Gruppen über den Log-Rank (Mantel-Cox) Test auf Signifikanz getestet [45].

## 4 Ergebnisse

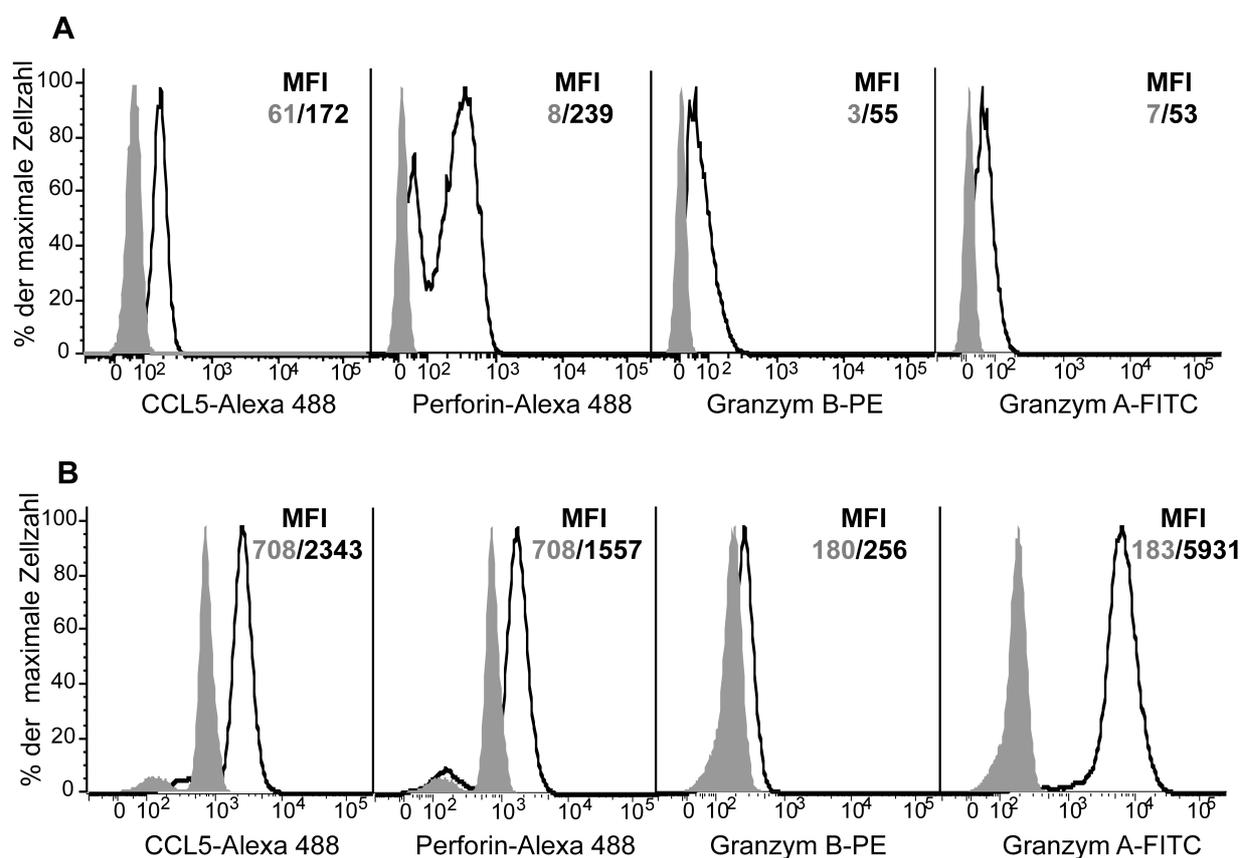
### 4.1 Das Chemokin CCL5 in NK-Zellen

Das Chemokin CCL5 wird von T-Zellen erst bei Einleitung der Differenzierung zu T-Effektorzellen zeitgleich mit Perforin und Granzym A und B induziert. Außerdem besteht eine strikte Kopplung der Expression an das T-Zellrezeptorsignal [47]. NK-Zellen liegen im Blut schon als ausdifferenzierte Effektorzellen vor, die Zytotoxine gespeichert haben und zur spontanen Zytotoxizität fähig sind. Im Gegensatz zu T-Zellen erfolgt die Erkennung einer Zielzelle durch NK-Zellen auch nicht über ein singuläres Rezeptorsignal sondern durch ein Gleichgewicht inhibierender und aktivierender Rezeptorsignale [10]. Ziel dieser Arbeit war es die Expression und mögliche Regulationsmechanismen von CCL5 in NK-Zellen auf zu klären. Desweiteren sollte untersucht werden, welchen Einflüssen die Sekretion von CCL5 in NK-Zellen unterworfen ist und in welchem Kompartiment CCL5 lokalisiert ist.

#### 4.1.1 Die Proteinmenge des Chemokins CCL5 in NK-Zellen

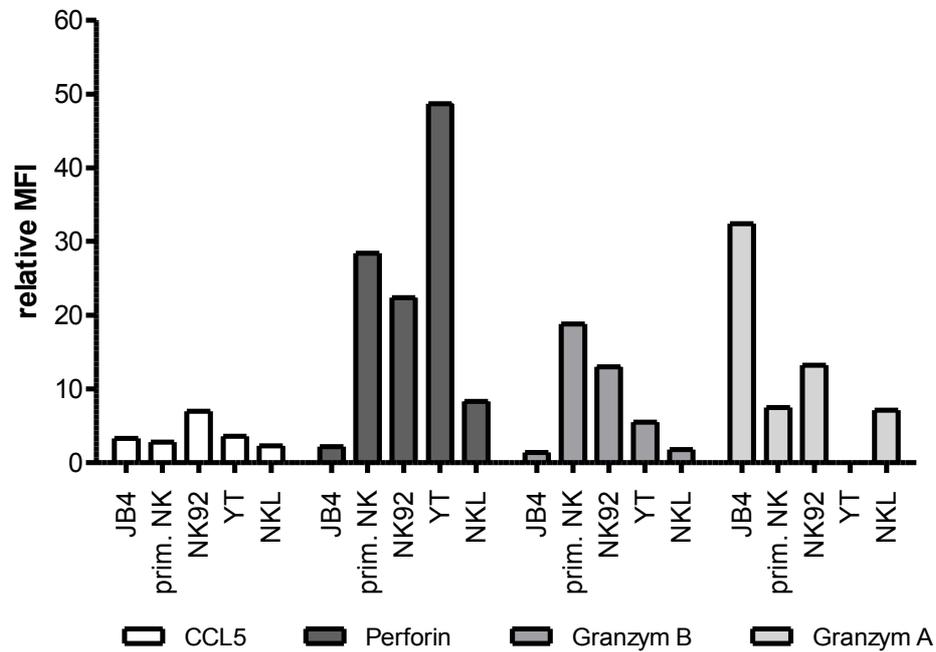
CCL5-Protein wurde in den NK-Zelllinien NK92, YT und NKL, sowie primären humanen NK-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und mit der Expression der Zytotoxine Granzym A, Granzym B und Perforin verglichen. Außerdem wurde zum Vergleich die zytotoxische T Zelllinie (CTL) CTL-JB4 untersucht. Die verschiedenen NK-Zelllinien repräsentieren verschiedene NK-Zelltypen. NK92-Zellen sind CD16-negativ aber stark positiv für CD56 und gelten als Beispiel für eine stark aktivierte NK-Zelle, da sie zu hoher spezifischer Lyse von NK sensitiven Zielzellen wie K562 und Daudi in der Lage sind [39]. NKL hingegen zeigen Charakteristika einer normal aktivierten NK-Zelle mit einer geringen Menge an CD56 auf der Oberfläche und nachweisbarer Antikörper-vermittelter zellulärer Zytotoxizität mittels CD16 [40]. Sowohl NK92 als auch NKL sind in ihrem Wachstum strikt abhängig von IL-2. YT NK-Zellen sind CD56-positiv und CD16-negative im Gegensatz zu NK92- und NKL-Zellen zeigen YT-Zellen keine IL-2 Abhängigkeit, nur schwache Zytotoxizität über Granulaausschüttung und kaum nachweisbare Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität. Eine Besonderheit der YT-Zellen ist das Fehlen von Granzym A [48].

Der Nachweis der CCL5 Proteinmenge erfolgte mittels intrazellulärer FACS-Färbung und Analyse am Durchflusszytometer. CCL5 wurde mit dem Antikörper VL-2 abgegriffen und, wie der Perforinantikörper, sekundär mit einem anti-mIgG2bAlexa 488 Antikörper gefärbt. Granzym A und Granzym B wurden über direktmarkierte Antikörper abgegriffen, die mit FITC bzw. PE markiert waren. Abbildung 4.1.1.1 zeigt die Proteinmenge von CCL5, Perforin, Granzym B und Granzym A in NK-Zellen (A) im Vergleich zu zytotoxischen JB4. Gemessen an der relativen medianen Fluoreszenzintensität (relative MFI; Verhältnis der MFI des spezifischen Markers (schwarze Linie) zum verwendeten Isotyp (graues ausgefülltes Histogramm)) ist die Menge an CCL5 mit einem Verhältnis von 2,8 in NK-Zellen und 3,3 in JB4 vergleichbar. Die Menge an Perforin jedoch ist in primären NK-Zellen mit einer relativen MFI von 28,4 mehr als 10mal so hoch wie in JB4 mit einer relativen MFI von 2,2 und die Menge an Granzym B ist in NK sogar fast 20fach erhöht. Die Menge an Granzym A ist in JB4 4mal höher als in primären NK-Zellen. Perforin zeigt im Histogramm der NK-Zellen zwei Populationen, etwa zwei Drittel der Zellen haben viel Perforin und ein Drittel hat wenig Perforin. Die beiden Populationen entsprechen den CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Populationen der NK in peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMCs). Man kann also sagen, dass CCL5 in primären NK-Zellen konstitutiv vorhanden ist und das in der Menge kein Unterschied zu stimulierten zytotoxischen T-Zellen besteht.



**Abbildung 4.1.1.1: Proteinmenge an CCL5, Perforin und Granzym B in frisch isolierten NK-Zellen und JB4 CTL.** In primären NK-Zellen (A) und in JB4-Zellen (B) wurde CCL5, Perforin, Granzym B und Granzym A intrazellulär gefärbt. Die nicht direktmarkierten Antikörper gegen CCL5 und Perforin wurden zusätzlich mit einem anti-IgG2b-Alexa488 Antikörper abgegriffen. Die Antikörper gegen Granzym A und Granzym B waren mit FITC bzw. PE direkt markiert. Die Färbung wurde am Durchflusszytometer analysiert. In den Histogrammen ist die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) (X-Achse) der spezifischen Färbung (schwarze Linie) und die der zugehörigen Isotypfärbung (grau) gegen den prozentualen Anteil der maximalen Anzahl an Zellen (Y-Achse) aufgetragen. Die MFI-Werte der spezifischen (schwarz) und der Isotypfärbung (grau) sind in jedes Histogramm eingetragen.

In Abbildung 4.1.1.2 ist in einer Übersicht die Menge an CCL5, Perforin, Granzym B und Granzym A in NK92, YT, NKL, primären NK und JB4 zu sehen. Vergleicht man die NK-Zelllinien untereinander so haben alle vergleichbar viel CCL5. Nur in NK92 ist die Menge an CCL5 erhöht. Die Menge an Perforin ist in allen NK-Zellen höher als in JB4, wobei YT-Zellen die höchste Menge an Perforin enthalten gefolgt von den primären NK-Zellen und NK92. Wie in primäre NK-Zellen konnte auch in NK92 und YT-Zellen mehr Granzym B nachgewiesen werden als in JB4. Granzym A ist in NK-Zellen deutlich geringer vorhanden als JB4-CTL.



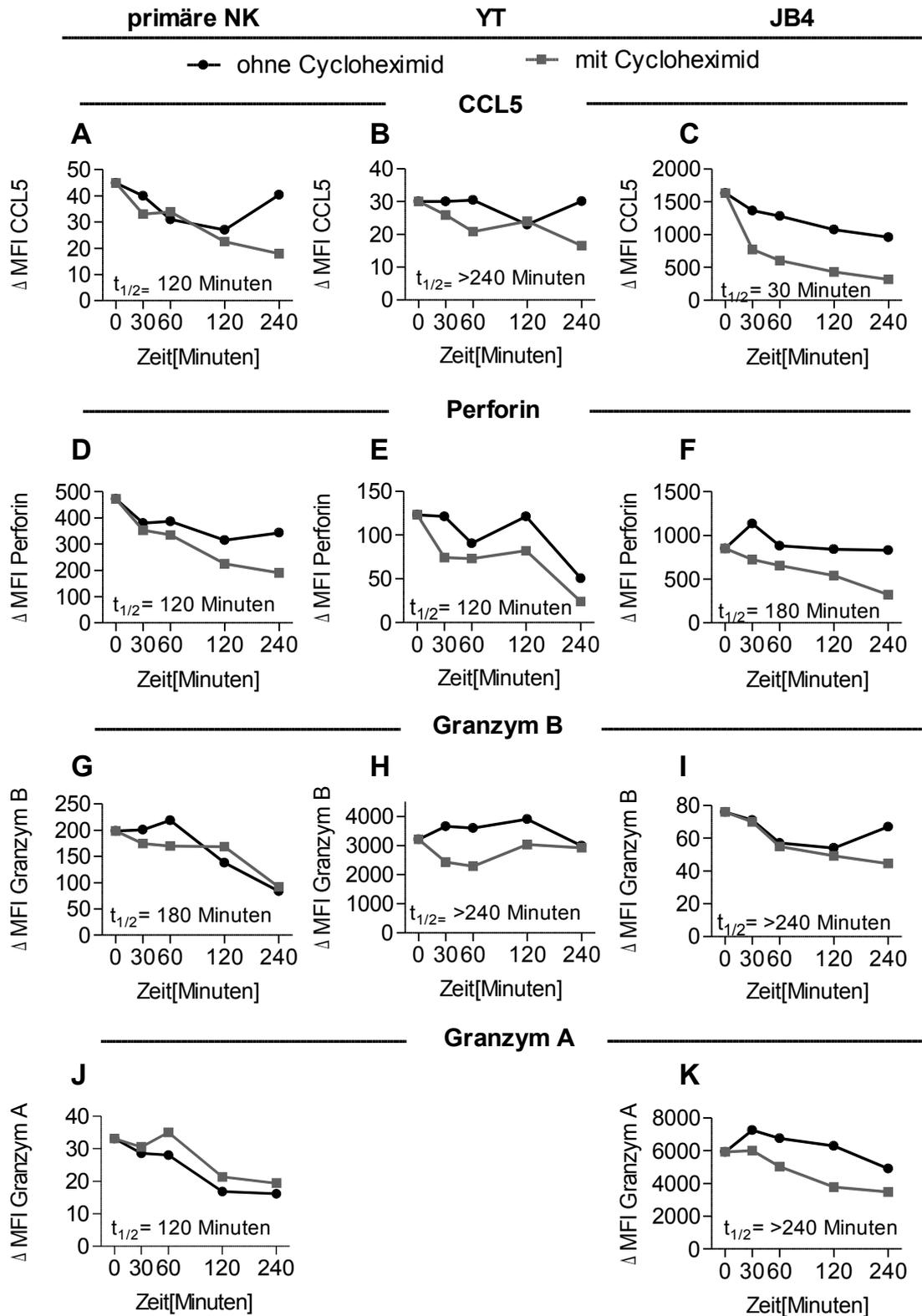
**Abbildung 4.1.1.2: Die Proteinmenge an CCL5, Perforin, Granzym B und Granzym A in primären NK, JB4 CTL, NK92, YT und NKL.** Die Proteinmenge wurde nach Permeabilisierung über intrazelluläre Färbung bestimmt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die relativen MFI-Werte, die aus dem Verhältnis der MFI der spezifischen Färbung und der Isotypfärbung berechnet wurden. Diese MFI-Werte wurden aus dem Histogramm der jeweiligen Färbung ermittelt. CCL5 ist in weiß, Perforin in schwarz, Granzym B in dunkelgrau und Granzym A in hellgrau dargestellt.

#### 4.1.2 Die Proteinstabilität des Chemokins CCL5 in NK-Zellen

Um zu bestimmen, in wieweit konstitutive Translation zum Erhalt der CCL5-Menge in NK-Zellen beiträgt wurde die Proteinmenge bei Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid (10 $\mu$ g/ml) in YT, primäre NK-Zellen und JB4-CTL im zeitlichen Verlauf auf die intrazelluläre Menge an CCL5 durchflusszytometrisch untersucht und mit der Menge der klassischen Speicherproteine Perforin, Granzym B und Granzym A verglichen. Da Cycloheximid die Proteinneusynthese über eine allgemeine Inhibition der Translation hemmt, hängt der Proteingehalt von der Stabilität des Proteins ab. Die Halbwertszeit für jedes Protein ergibt sich aus dem Zeitraum, indem die  $\Delta$ MFI (die Differenz aus der MFI der spezifischen Färbung und der Isotypfärbung) unter Cycloheximidinhibition auf 50% des Ausgangswerts abgesunken ist. In Abbildung 4.1.2.1 ist die Proteinmenge von CCL5, Perforin, Granzym B und Granzym A in primären NK, YT und JB4 im zeitlichen Verlauf graphisch dargestellt.

In primären NK nahm die Menge an CCL5 bis 120min kontinuierlich ab unabhängig ob Cycloheximid anwesend war oder nicht. bei 240min war die CCL5 Menge ohne Cycloheximid höher als mit Cycloheximid. Offensichtlich wird in NK-Zellen die CCL5-Proteinmenge erst ab 240min durch Translation nivelliert. Es ergibt sich eine CCL5-Halbwertszeit von 120min. Bei YT konnte eine Halbwertszeit innerhalb des untersuchten Zeitraums nicht berechnet werden, da die Proteinmenge innerhalb von 240min nicht um 50% abgesunken war. CCL5 scheint also in YT stabiler als in primären NK zu sein aber auch hier wurde ab 240min eine Nivellierung des Proteingehalts festgestellt. In JB4 war die Menge an CCL5 unter Cycloheximidinhibition schon nach 30min stark reduziert ( $t_{1/2}$ = 30min) und auch ohne Translationsinhibition zeigt sich eine stetigen Abnahme. In JB4 hängt die intrazelluläre Menge an CCL5 wesentlich stärker von der Translation ab als in NK-Zellen.

Die Proteinstabilität von CCL5 war in NK-Zellen vergleichbar mit der der Zytotoxine Perforin, Granzym B und Granzym A. In JB4 ist Perforin ( $t_{1/2}$ =180min) stabiler als CCL5 ( $t_{1/2}$ =30min). Die Stabilität von Perforin ist in NK-Zellen und JB4 vergleichbar. Granzym B und Granzym A sind sowohl in JB4 als auch in NK-Zellen sehr stabile Proteine mit einer hohen Halbwertszeit. CCL5 unterscheidet sich in NK-Zellen kaum von den klassischen Speicherproteinen Perforin, Granzym B und Granzym A, während in CTL die CCL5 Proteinmenge deutlich von Translation abhängt und deswegen weniger stabil ist als die Zytotoxine.

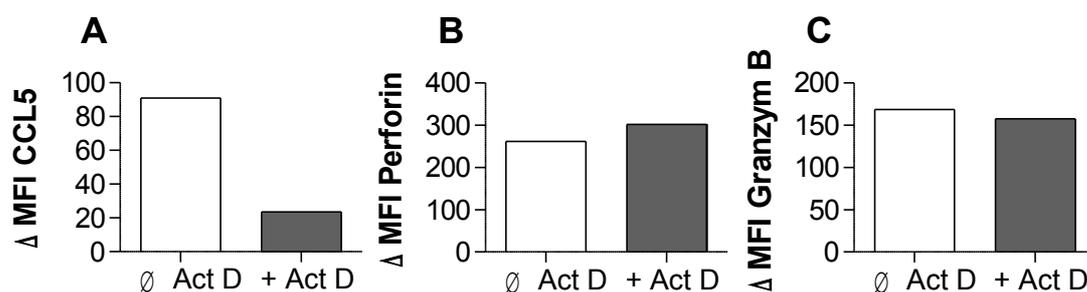


**Abbildung 4.1.2.1: Proteinstabilität von CCL5, Perforin, Granzym B und Granzym A.** Primäre NK (A, D, G, F), YT (B, E, H) und JB4 (C, F, I, J) wurden mit (graue Linie;Quadrat) und ohne (schwarze Linie, Kreis) Cycloheximid (10µg/ml) für 4h inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots an Zellen entnommen und der intrazelluläre Proteingehalt durchflusszytometrisch bestimmt. Aus der Differenz der MFI der spezifischen Färbung und der Isotypfärbung wurde die  $\Delta$ MFI berechnet und graphisch gegen die Zeit [min] dargestellt. Die Halbwertszeit ist als  $t_{1/2}$  [Minuten] angegeben.

### 4.1.3 Die Bedeutung der Transkription für die Proteinmenge des Chemokins CCL5

Um den Einfluss der Transkription auf die Proteinmenge von CCL5 in primären NK zu untersuchen wurden, wurden die aus Blut isolierten NK-Zellen für 12 Stunden mit 10 $\mu$ g/ml Actinomycin D inkubiert. Actinomycin D ist ein allgemeiner Inhibitor der Transkription, so dass die Proteinmenge sollte sie von der Transkription abhängen nur solange konstant bleibt bis die intrazellulären Speicher an mRNA aufgebraucht sind, die durch das Fehlen der Transkription nicht mehr aufgefüllt werden können. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Proben zweigeteilt. Ein Teil wurde zur Bestimmung der Proteinmenge an CCL5, Perforin und Granzym B durchflusszytometrisch untersucht. Der andere Teil wurde zur Messung der Transkriptmenge von CCL5, Perforin und Granzym B mittels quantitativer RT-PCR von unserem Kooperationspartner D. Kumar untersucht (siehe Anhang Kapitel 8 Figure 1 ) [49].

In Abbildung 4.1.3.1 ist der Einfluss der Transkription inhibition auf die intrazelluläre Menge von CCL5, Perforin und Granzym B graphisch über die durchflusszytometrisch bestimmte  $\Delta$ MFI dargestellt. Während die Proteinmenge an CCL5 nach 12 Stunden Inkubation mit Actinomycin D stark verringert war, konnte kein Unterschied in der Proteinmenge von Perforin und Granzym B nachgewiesen werden. Daher kann man schließen, dass die Proteinmenge von CCL5 in primären NK-Zellen über Transkription der mRNA kontrolliert ist.

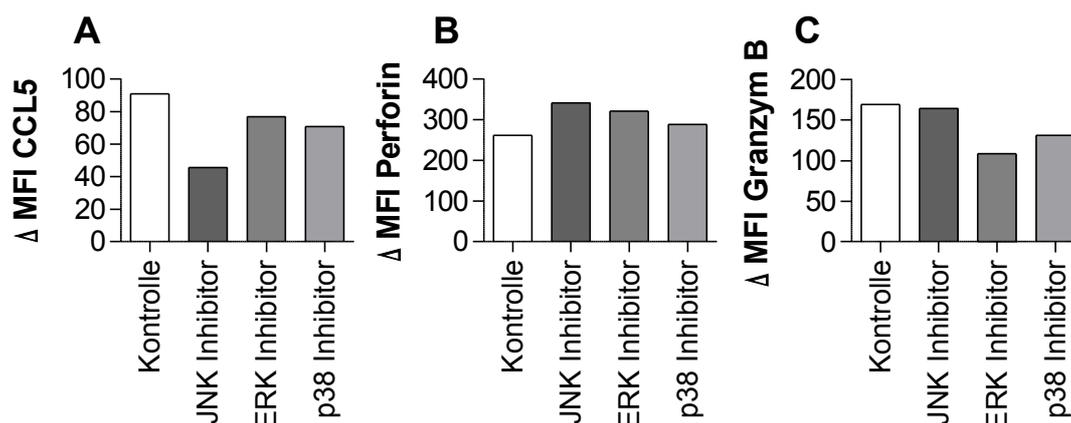


**Abbildung 4.1.3.1: Einfluss der Transkription auf die Proteinmenge von CCL5 (A), Perforin (B) und Granzym B (C) in primären NK-Zellen.** Die aus Blut isolierten NK-Zellen wurden für 12 Stunden mit (+Act D; 10 $\mu$ g/ml; grauer Balken) und ohne Actinomycin D (ØAct D; weißer Balken) inkubiert und die intrazelluläre Menge an CCL5, Perforin und Granzym B durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die  $\Delta$ MFI, berechnet aus der Differenz der MFI der spezifischen Färbung und der MFI der Isotypfärbung.

#### 4.1.4 Die Regulation der konstitutiven Transkription von CCL5 in primären NK-Zellen

Um die Regulation der konstitutiven Expression von CCL5 in NK-Zellen zu untersuchen wurde der Einfluss von Inhibitoren der JNK, ERK und p38 Signalwege auf den intrazellulären Proteingehalt von CCL5 im Vergleich zu Perforin und Granzym B bestimmt. Diese Inhibitoren wurden ausgewählt, da für die JNK und ERK Signalwege, die zur Familie der MAPK Signalwege gehören, beschrieben wurde, dass sie neben den PI3K eine Rolle in der Granulaausschüttung der NK-Zellen spielen und weil p38 und ERK1/2 MAPK die Transkription von CCL5 mRNA in CTL kontrollieren [50-55]. Zur Untersuchung wurden aus Blut isolierte primäre NK-Zellen mit jeweils 50 $\mu$ M JNK bzw. ERK Inhibitor und 20 $\mu$ M p38 Inhibitor für 12 Stunden inkubiert und nach intrazelluläre Färbung von CCL5, Perforin und Granzym B die intrazelluläre Proteinmenge am Durchflusszytometer bestimmt. Als Kontrolle wurden primäre NK-Zellen ohne Inhibitoren untersucht. Im parallelen Ansatz wurde von unserem Kooperationspartner D. Kumar der Einfluss dieser Inhibitoren auf den mRNA-Gehalt von CCL5, Perforin und Granzym B bestimmt ((siehe Anhang Kapitel 8 Figure ).

Abbildung 4.1.4.1 zeigt den Einfluss der JNK, ERK und p38 Inhibitoren auf die intrazelluläre Proteinmenge (dargestellt als  $\Delta$ MFI) von CCL5 (A), Perforin (B) und Granzym B (C) im Vergleich zur nicht inhibierten Kontrolle. Die Proteinmenge von CCL5 wurde durch die Inhibition des JNK Signalwegs stark reduziert. Die Inhibition der ERK und p38 Signalwege kaum zur Reduktion. Die Menge an Perforin hingegen war unbeeinflusst von JNK, ERK und p38 Inhibition. Die Proteinmenge an Granzym B wurde nur durch die ERK-Inhibition beeinflusst.



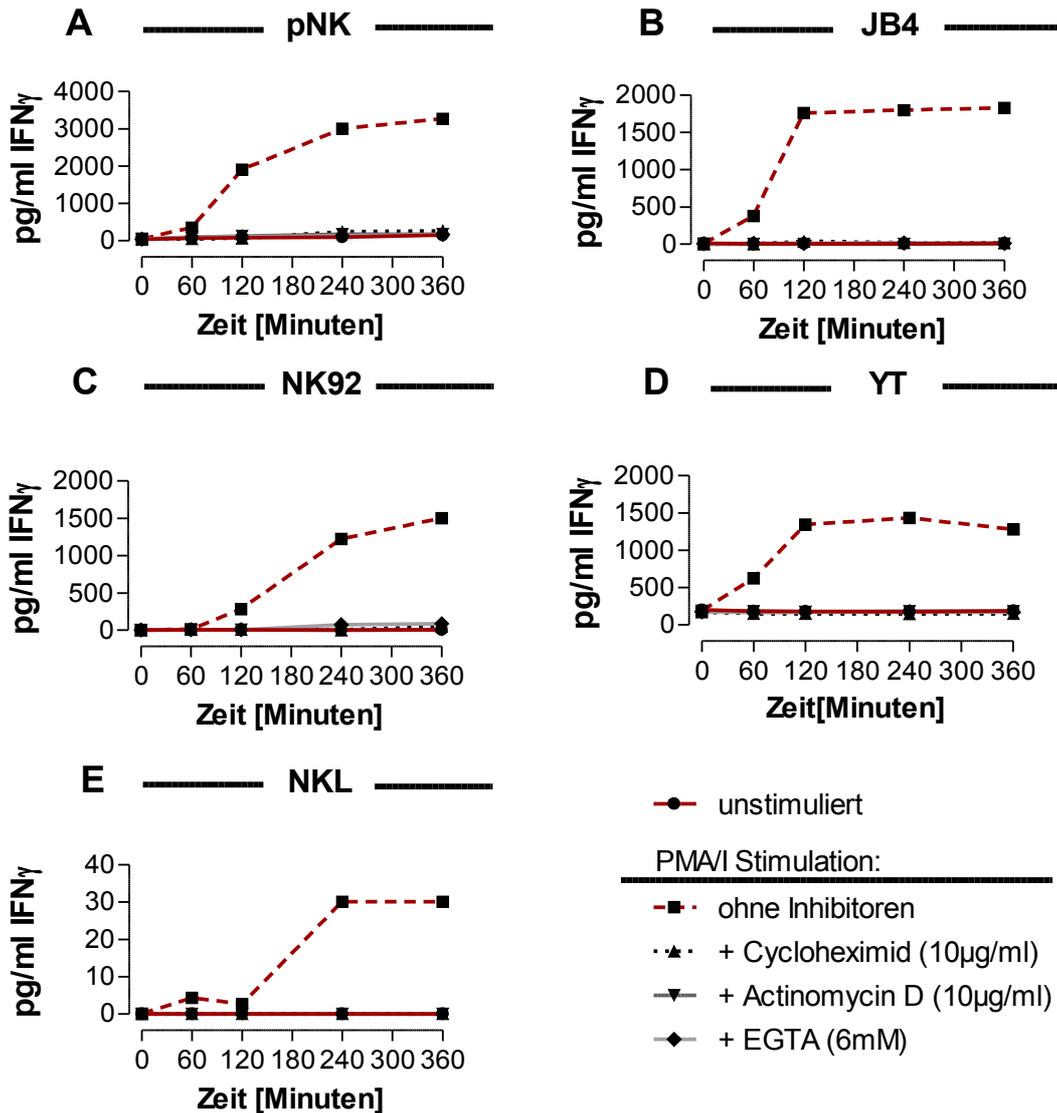
**Abbildung 4.1.4.1: Einfluss des MAPK Signalwegs auf die Regulation der intrazellulären Proteinmenge von CCL5 (A), Perforin (B) und Granzym B (C).** Primäre NK wurden 12 Stunden mit JNK (50 $\mu$ M; dunkelgrauer Balken), ERK (50 $\mu$ M; mittelgrauer Balken) und p38 Inhibitoren (20 $\mu$ M; hellgrauer Balken) inkubiert. Als Kontrolle wurden primäre NK-Zellen ohne Inhibitoren untersucht. Nach Ende der Inkubation wurden CCL5, Perforin und Granzym B mittels intrazelluläre Färbung analysiert und die MFI durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die  $\Delta$ MFI, die sich aus der Differenz der spezifischen Färbung und der Isotypfärbung ergibt.

#### 4.1.5 Die Sekretion von CCL5 durch NK-Zellen

Die stimulierte Sekretion von CCL5 wurde in NK92, YT, NKL, primären NK-Zellen und JB4 T-Zellen untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml 6h mit dem Stimulator PMA/I (Phorbol 12-myristat-13-acetat/ Pronomina; 500ng/5ng pro ml) inkubiert. Um zu erkennen, ob die Proteinfreisetzung Transkriptions oder Translations abhängig ist wurde dem Medium entweder der Translationsinhibitor Cycloheximid (10 $\mu$ g/ml) oder der Transkriptionsinhibitor Actinomycin D (10 $\mu$ g/ml) zugesetzt. Zusätzlich wurde der Einfluss des extrazellulären Calciums auf die stimulierte Sekretion von CCL5 untersucht. Dazu wurde dem Medium der Calciumchelator EGTA (6mM) zugesetzt. Um sicherzustellen, dass die Inhibitoren ihre volle Funktion zum Zeitpunkt des Stimulationsbeginns ausüben wurden die Zellen vor PMA/I 30min mit den jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert. Als Kontrolle wurden ein unstimulierter und ein stimulierter Ansatz ohne Inhibitoren untersucht. Für jeden Zeitpunkten 0h, 60min, 120min, 240min und 360min wurde ein paralleler Ansatz verwendet und zum jeweiligen Zeitpunkt die Zellen vom Überstand durch Zentrifugation getrennt. CCL5 wurde im Überstand mittels ELISA-Messung bestimmt. Um die angemessene Konzentration der Inhibitoren zu ermitteln wurde zunächst die Sekretion von IFN- $\gamma$  im Zellüberstand bestimmt. Da die Produktion von Zytokinen strikt transkriptions- und translationsabhängig ist, darf bei Funktionalität der

Inhibitoren keine IFN- $\gamma$  Sekretion stattfinden. Eine Proteinfreisetzung trotz Inhibitoren erlaubt Rückschlüsse, ob Protein gespeichert vorliegt (Proteinfreisetzung trotz Cycloheximid-Inhibition) oder von stabiler RNA translatiert wird (keine Proteinfreisetzung mit Cycloheximid-Inhibition aber unter Actinomycin D Inhibition)

Abbildung 4.1.5.1 zeigt, dass durch Stimulation mit PMA/I (gestrichelte rote Linie) IFN- $\gamma$  Sekretion in JB4-CTL und NK-Zellen induziert wurde. Im unstimulierten Ansatz und in den stimulierten Ansätzen mit den Inhibitoren Cycloheximid, Actinomycin D und EGTA wurde keine IFN- $\gamma$  Ausschüttung festgestellt werden. Daher kann man davon ausgehen, dass die Konzentration der verwendeten Inhibitoren über die gesamten Inkubationszeit ausreichend ist.



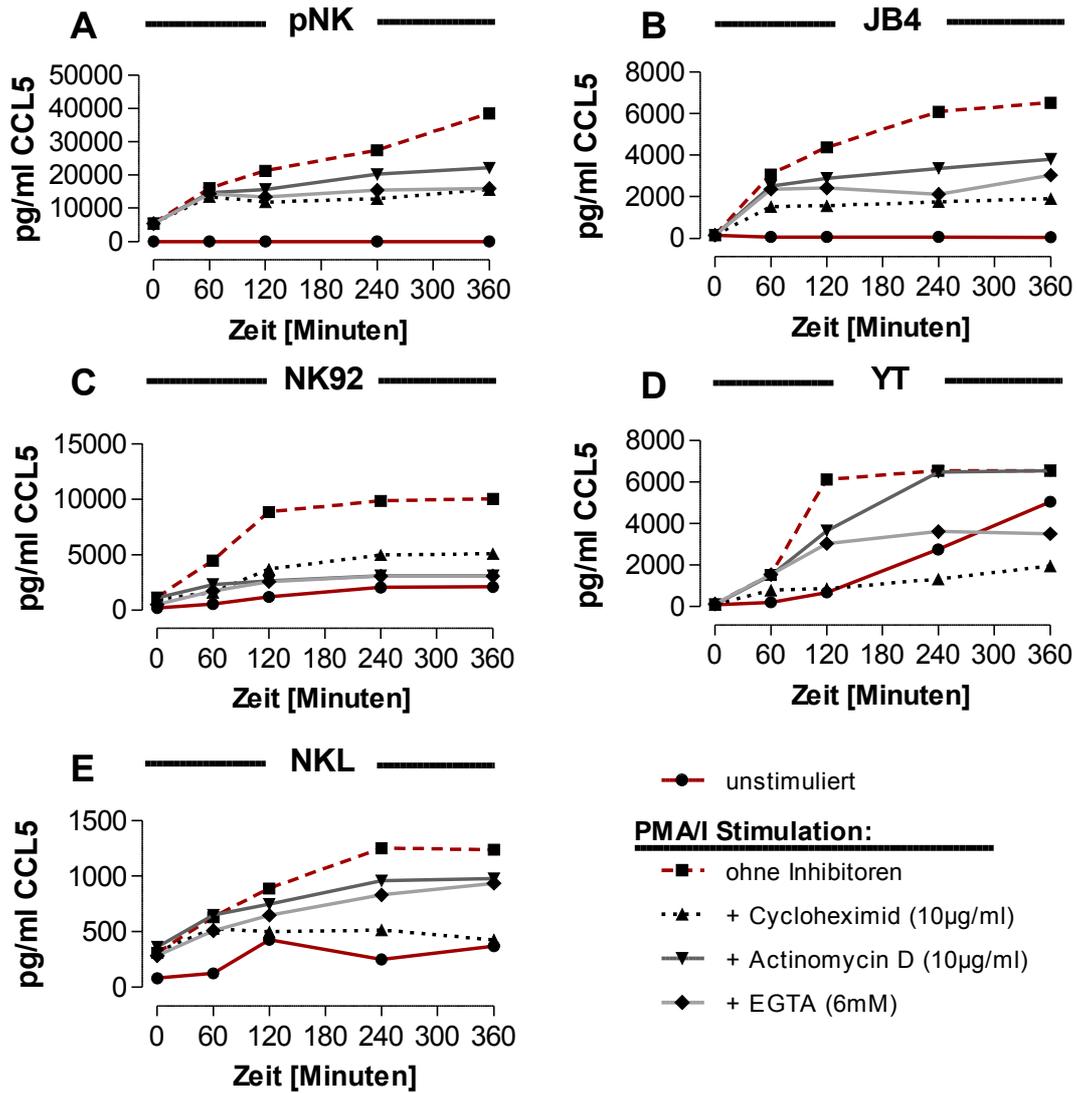
**Abbildung 4.1.5.1: IFN- $\gamma$  Sekretion von NK92 (A), YT (B), NKL (c), primäre NK (D;pNK) und JB4 (E).** Die verwendeten Zellen wurden nach 30min Vorinkubation mit den Inhibitoren Cycloheximid (10 $\mu$ g/ml; gepunktete schwarze Linie, aufrechtes Dreieck) Actinomycin D (10 $\mu$ g/ml; dunkelgraue Linie; umgekehrtes Dreieck) und EGTA (6mM; hellgraue Linie; Raute) mit PMA/I (500ng/5ng pro ml) für 6h stimuliert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne PMA/I Stimulation (rote Linie; Kreis) und ein Ansatz mit PMA/I Stimulation (rote gestrichelte Linie; Quadrat) aber ohne Inhibitoren untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde von jedem Ansatz ein Aliquot entnommen und die Zellen durch Zentrifugation entfernt. Die Menge an IFN- $\gamma$  im Überstand wurde mittels ELISA-Messung bestimmt. Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  in pg/ml gegen die Zeitachse [Minuten].

In Abbildung 4.1.5.2 ist der Einfluss der Inhibitoren Cycloheximid, Actinomycin D und EGTA auf die Sekretion von CCL5 in primären NK (A), JB4 (B), NK92 (C), YT (D) und NKL (E) dargestellt. Primäre NK-Zellen zeigten keine unstimulierte CCL5 Sekretion. PMA/I Stimulation induzierte Sekretion, welche initial bis 60min unabhängig von Translation,

Transkription oder extrazellulären Calciums war. Ab 60min zeigten alle Inhibitoren deutliche Effekte und blockierten weitere CCL5 Freisetzung. Wie primäre NK zeigten unstimulierte JB4-CTL keine unstimulierte CCL5-Sekretion. PMA/I stimulierte Sekretion war innerhalb der ersten 60min von Transkription und extrazellulärem Calcium unabhängig, während Translationsinhibition eine zweifache Reduktion der Sekretion bewirkte. Ab 60min zeigte auch die Transkriptionsinhibition und die Inhibition des extrazellulären Calciums Wirkung.

Alle NK-Zelllinien (NK92, YT und NKL) zeigten bereits unstimuliert eine spontane CCL5-Sekretion. Diese wurde durch PMA/I um das 10fache gesteigert. In NK92 zeigten, anders als in allen anderen NK-Zellen und CTL die verwendeten Inhibitoren sofortige Wirkung. In NKL hingegen war die CCL5 Sekretion wie bei primären NK bis 60min unabhängig von Translation, Transkription und extrazellulärem Calcium. Ab 60min zeigte die Translationsinhibition Wirkung und blockierte jede weitere CCL5-Sekretion, während Actinomycin D und EGTA die weitere Sekretion reduzierten aber nicht vollständig blockierten. Auch in YT war die CCL5-Sekretion in den ersten 60min unabhängig von Transkription und extrazellulärem Calcium. Die Translationsinhibition zeigte sofortige Wirkung. Nach 60min zeigt die Inhibition mit EGTA einen blockierenden Effekt, während die Transkriptionsinhibition keinen Effekt auf die CCL5 Sekretion in YT zu haben scheint.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in NK92 weniger gespeichertes Protein vorliegt, da bei Transkriptions- und Translationsinhibition sofort die induzierte Sekretion ausbleibt. Bei primären NK-Zellen, YT und NKL kam es trotz Translations und Transkriptionsinhibition zu CCL5-Freisetzung, so dass wahrscheinlich gespeichertes Protein ausgeschüttet wird. Da in JB4 Cycloheximid bereits ab Inkubationsbeginn die induzierte CCL5 Sekretion reduziert, ist offensichtlich weniger Protein gespeichert. Da die Menge an CCL5 in Anwesenheit von Transkriptions-Inhibitor sich nicht verringert wird vermutlich von stabiler RNA translatiert.

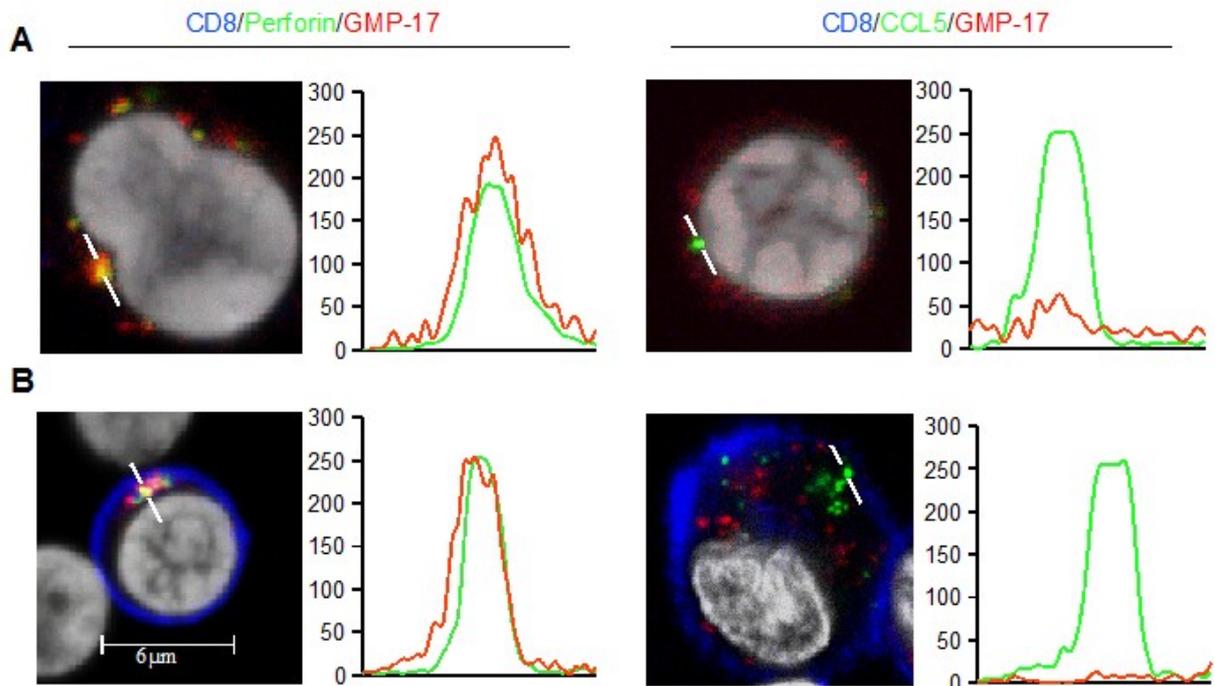


**Abbildung 4.1.5.2: CCL5 Sekretion von NK92 (A), YT (B), NKL (c), primäre NK (D;pNK) und JB4 (E). Zur Untersuchung der CCL5 Sekretion wurden die verwendeten Zelle nach 30min Vorinkubation mit den Inhibitoren Cycloheximid (10mg/ml; gepunktete schwarze Linie, aufrechtes Dreieck) Actinomycin D (10mg/ml; dunkelgraue Linie; umgekehrtes Dreieck) und EGTA(6mM; hellgraue Linie; Raute) mit PMA/I (500ng/5ng pro ml) für 6h stimuliert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne PMA/I Stimulation (rote Linie; Kreis) und ein Ansatz mit PMA/I Stimulation (rote gestrichelte Linie; Quadrat) aber ohne Inhibitoren untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde von jedem Ansatz ein Aliquot entnommen und die Zellen durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde mittels ELISA-Messung untersucht. Dargestellt ist die Konzentration von CCL5 in pg/ml gegen die Zeitachse [Minuten].**

#### 4.1.6 Die intrazelluläre Lokalisation von CCL5 in NK-Zellen

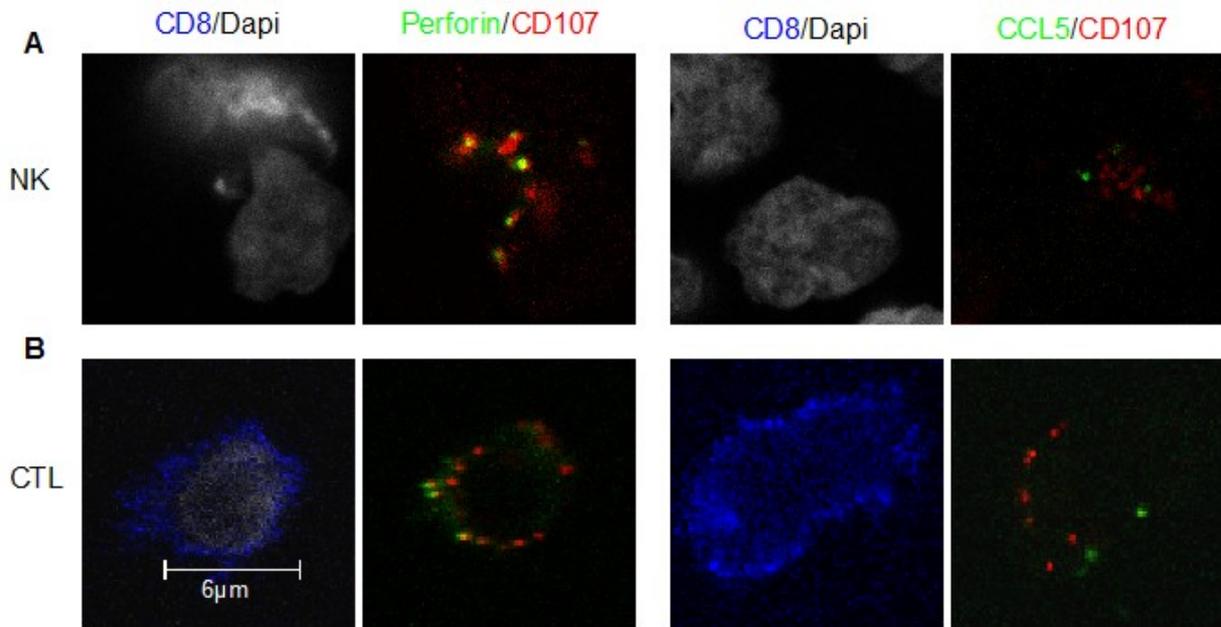
Durchflusszytometrie und Proteinsekretion auch bei Translationsinhibition wiesen darauf hin, dass CCL5 in NK-Zellen konstitutiv produziert wird. Mittels konfokaler Mikroskopie sollte die intrazelluläre Lokalisation gezeigt werden. CCL5 könnte sich in den Kompartimenten des sekretorischen Sezernierungswegs befinden, oder vergleichbar mit den Zytotoxine Perforin, Granzym B und Granzym A in Speichergranula vorliegen. Um die intrazelluläre Lokalisation des CCL5 in NK-Zellen zu definieren, wurde CCL5 in Kombination mit jeweils einem Marker eines intrazellulären Kompartiments oder einem Marker mit bekannter intrazellulärer Lokalisation immunfluoreszenzgefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die untersuchten Kompartimente waren die lytischen Granula, welche für die Marker CD107 und GMP-17 positiv sind und endosomale Vesikel, die die Marker EEA-1 und Rab5 besitzen. Als weitere Proteine die in lytischen Vesikeln gespeichert sind wurden die Zytotoxine Perforin, Granzym B und Granzym A gefärbt. Parallel zu den NK-Zellen wurden CTL gefärbt. In Abbildung 4.1.6.1 dargestellt ist die Mehrfachfärbung von CCL5 mit GMP-17 bzw. Perforin mit GMP-17. CD8 diente der Unterscheidung von T-Zellen und NK-Zellen in PBL, da NK-Zellen negativ bzw. schwach positiv für CD8 sind, während zytotoxische T-Zellen stark CD8 positiv sind. Kolo-kalisation wurde einerseits durch die Mischfarbe „gelb“, die sich aus der Farbüberlagerung der Farbkanäle ergibt und andererseits durch die Überlagerungen der Histogramme der Fluoreszenzintensitätsprofile nachgewiesen. Für die Histogrammdarstellung wurde über die Software des konfokalen Lasermikroskops eine *region of interest* (ROI) ausgewählt, die in den Abbildungen als weißer Strich durch das untersuchte Vesikel zu sehen ist. Die Software berechnet entlang dieser Linie das Fluoreszenzprofil der Farbkanäle und stellt sie als Histogramm dar. Für jede Kombinationsfärbung wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet (Tabelle 4.1.6.1). Abbildung 4.1.6.1 zeigt exemplarisch für jede Kombinationsfärbung eine Zelle und das dazugehörige Fluoreszenzintensitätsprofil. Wie aus der Abbildung ersichtlich, war Perforin in NK-Zellen und T-Zellen nahezu immer mit GMP-17 kolo-kalisiert, CCL5 hingegen nicht.





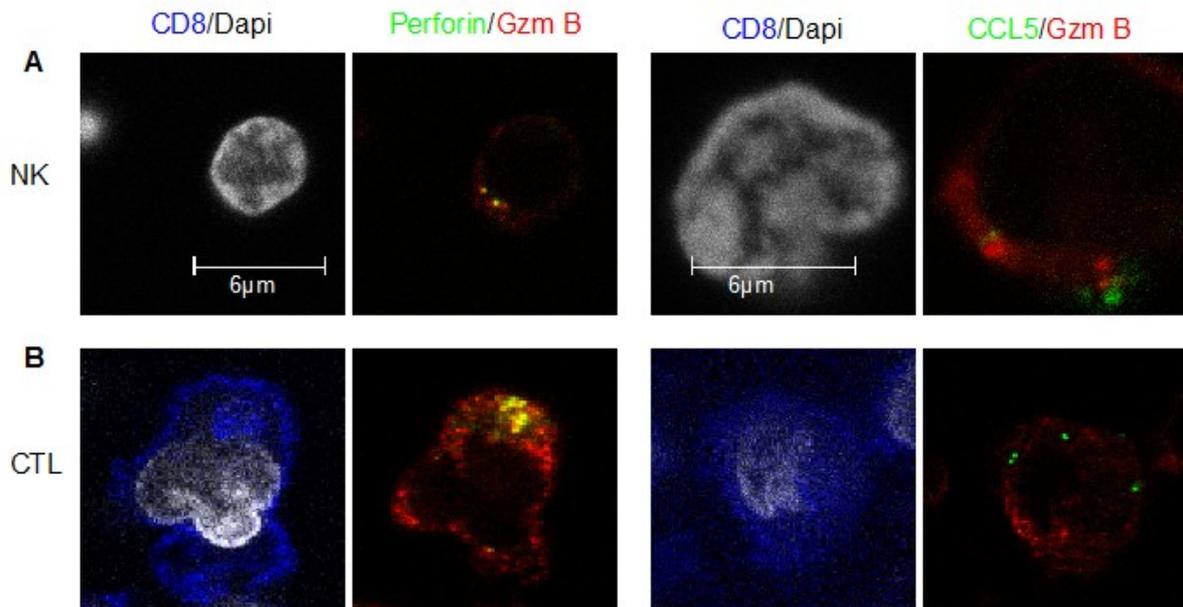
**Abbildung 4.1.6.1: Konfokale Bildaufnahme einer NK-Zelle bzw. CD8-positiven CTL gefärbt mit Antikörperkombination CCL5, GMP-17 und CD8 bzw. Perforin, GMP-17 und CD8.** PBMCs (A & B) wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft und mit Antikörperkombination gegen CD8 (anti-Kaninchen-Cy5, dargestellt in blau), GMP-17 (anti-MausIgG1-A568, rot) und Perforin (anti-MausIgG2b-Alexa488) bzw. CCL5 (VL2-Hybridomüberstand und anti-MausIgG2b-A488, grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen (Maßstab entspricht 6µm) wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, mit z-Stacks (0,3µm Abstand) über die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle. Dargestellt ist exemplarisch eine optische Schnittebene (z-Ebene) mit den verschiedenen Fluoreszenzsignalen von CD8, GMP-17 und Perforin bzw. CCL5 als Überlagerungsbild (jeweils links). Zur Auswertung der Kolokalisation wurden alle z-Stacks individuell bewertet und eine Kolokalisation von GMP-17 mit Perforin bzw. CCL5 einerseits optisch identifiziert, wenn sich eine gelb-orange Mischfarbe ergab. Andererseits wurde eine Kolokalisation mithilfe einer Histogrammdarstellung der Fluoreszenzprofile entlang einer ausgewählten Linie identifiziert. Auf der rechten Seite sind die Fluoreszenzintensitätsprofile von GMP-17 (rot) und Perforin (grün) bzw. CCL5 (grün) entlang der weißen Linien dargestellt. Es zeigte sich eine Kolokalisation von Perforin mit GMP-17 aber nicht von GMP-17 und CCL5. NK-Zellen (A, CD8-negative Zelle in PBMC) und CD8-positive PBMC (B) zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Die Kombinationsfärbung von CD8, CD107 und Perforin bzw. CCL5 (Abb. 4.1.6.2) zeigte keine Kolokalisation von CCL5 mit CD107 in NK-Zellen und CTL, aber eine Kolokalisation von CD107 mit Perforin.



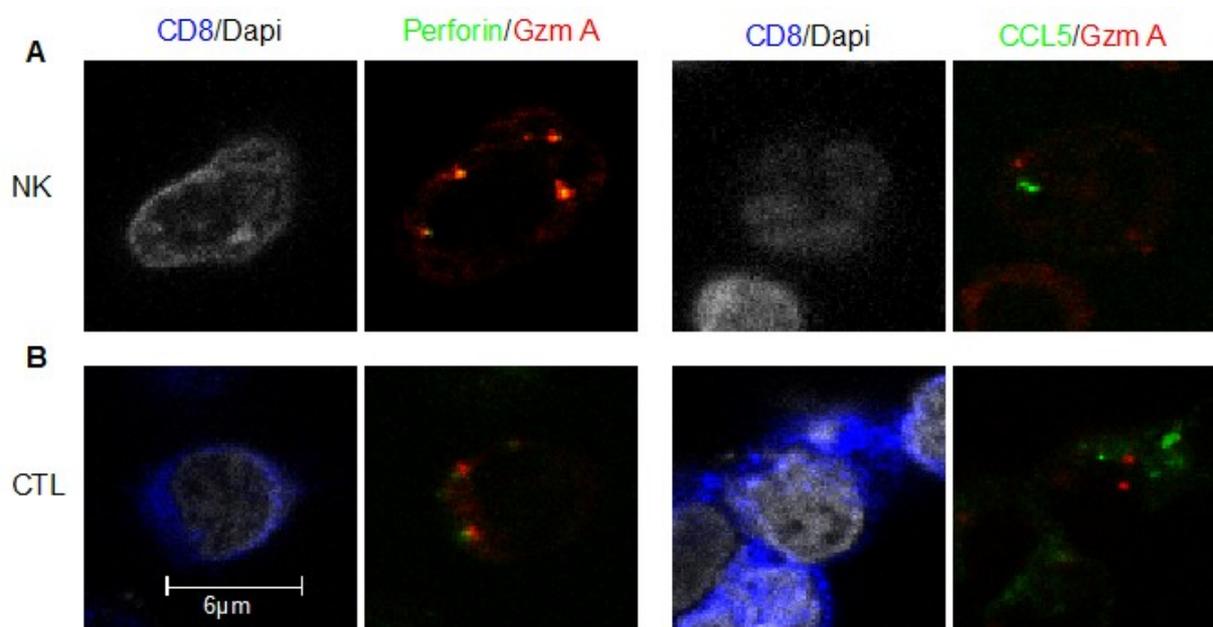
**Abbildung 4.1.6.2: Konfokale Bildaufnahme einer NK-Zelle bzw. CD8-positiven CTL gefärbt mit Antikörperkombination CCL5, CD107 und CD8 bzw. Perforin, CD107 und CD8.** PBMCs (A) bzw. CTL JB4 (B) wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft und mit Antikörperkombination gegen CD8 (anti-Kaninchen-Cy5, dargestellt in blau), CD107 (anti-MausIgG1-A488, rot) und Perforin (anti-MausIgG2b-Alexa568) bzw. CCL5 (VL2-Hybridomüberstand und anti-MausIgG2b-A568, grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen (Maßstab entspricht 6µm) wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, mit z-Stacks (0,3µm Abstand) über die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle. Dargestellt ist exemplarisch eine optische Schnittebene (z-Ebene) mit den Fluoreszenzsignalen von CD8 und DAPI als Überlagerungsbild (jeweils links) und ein Überlagerungsbild der Fluoreszenzsignale von CD107 und Perforin bzw. CCL5 (jeweils rechts). Zur Auswertung der Kolokalisation wurden alle z-Stacks individuell bewertet und eine Kolokalisation von CD107 mit Perforin bzw. CCL5 optisch identifiziert, wenn sich eine gelb-orange Mischfarbe ergab. Es zeigte sich eine Kolokalisation von Perforin mit CD107 aber nicht von CD107 und CCL5. NK-Zellen (A, CD8-negative Zelle in PBMC) und CD8-positiven CTL (B) zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Neben den Membran-assoziierten-Markern CD107 und GMP-17 sind lytische Granula durch das Vorhandensein der Zytotoxine Granzym B und Granzym A gekennzeichnet. Daher wurden Kombinationsfärbungen von CD8, Granzym B und Perforin bzw. CCL5 (Abb. 4.1.6.3) und CD8, Granzym A und Perforin bzw. CCL5 (Abb. 4.1.6.4) durch geführt und am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Wie aus Abbildung 4.1.6.3 für Granzym B und aus Abbildung 4.1.6.4 für Granzym A ersichtlich ist kolokalisierten sowohl Granzym B als auch Granzym A mit Perforin aber nicht mit CCL5. Es zeigt sich kein Unterschied in der Kolokalisation zwischen NK-Zellen und CTL.



**Abbildung 4.1.6.3: Konfokale Bildaufnahme einer NK-Zelle bzw. CD8-positiven CTL gefärbt mit Antikörperkombination CCL5, Granzym B (Gzm B) und CD8 bzw. Perforin, Gzm B und CD8.** PBMCs (A) bzw. CTL JB4 (B) wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft und mit Antikörperkombination gegen CD8 (anti-Kaninchen-Cy5, dargestellt in blau), Gzm B (anti-MausIgG1-A568, rot) und Perforin (anti-MausIgG2b-Alexa488) bzw. CCL5 (VL2-Hybridomüberstand und anti-MausIgG2b-A488, grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen (Maßstab entspricht 6 μm) wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, mit z-Stacks (0,3 μm Abstand) über die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle. Dargestellt ist exemplarisch eine optische Schnittebene (z-Ebene) mit den Fluoreszenzsignalen von CD8 und DAPI als Überlagerungsbild (jeweils links) und ein Überlagerungsbild der Fluoreszenzsignale von Gzm B und Perforin bzw. CCL5 (jeweils rechts). Zur Auswertung der Kolokalisation wurden alle z-Stacks individuell bewertet und eine Kolokalisation von Gzm B mit Perforin bzw. CCL5 optisch identifiziert, wenn sich eine gelb-orange Mischfarbe ergab. Es zeigte sich eine Kolokalisation von Perforin mit Gzm B aber nicht von Gzm B und CCL5. NK-Zellen (A, CD8-negative Zelle in PBMC) und CD8-positiven CTL (B) zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Da CCL5 weder mit CD107, noch mit GMP-17, noch mit den lytischen Proteinen Granzym B und Granzym A kolokalisierte, während entsprechende Kolokalisation des lytischen Proteins Perforin eindeutig gezeigt werden konnte, kann man davon ausgehen, dass CCL5 nicht im lytischen Kompartiment lokalisiert ist. NK-Zellen und CTL zeigten vergleichbare Ergebnisse.



**Abbildung 4.1.6.4: Konfokale Bildaufnahme einer NK-Zelle bzw. CD8-positiven CTL gefärbt mit Antikörperkombination CCL5, Granzym A (Gzm A) und CD8 bzw. Perforin, Gzm A und CD8.** PBMCs (A) bzw. CTL JB4 (B) wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft und mit Antikörperkombination gegen CD8 (anti-Kaninchen-Cy5, dargestellt in blau), Gzm A (anti-MausIgG1-A488, rot) und Perforin (anti-MausIgG2b-Alexa568) bzw. CCL5 (VL2-Hybridomüberstand und anti-MausIgG2b-A568, grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen (Maßstab entspricht 6µm) wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, mit z-Stacks (0,3µm Abstand) über die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle. Dargestellt ist exemplarisch eine optische Schnittebene (z-Ebene) mit den Fluoreszenzsignalen von CD8 und DAPI als Überlagerungsbild (jeweils links) und ein Überlagerungsbild der Fluoreszenzsignale von Gzm A und Perforin bzw. CCL5 (jeweils rechts). Zur Auswertung der Kolokalisation wurden alle z-Stacks individuell bewertet und eine Kolokalisation von Gzm A mit Perforin bzw. CCL5 optisch identifiziert, wenn sich eine gelb-orange Mischfarbe ergab. Es zeigte sich eine Kolokalisation von Perforin mit Gzm A aber nicht von Gzm A und CCL5. NK-Zellen (A, CD8-negative Zelle in PBMC) und CD8-positiven CTL (B) zeigten vergleichbare Ergebnisse.

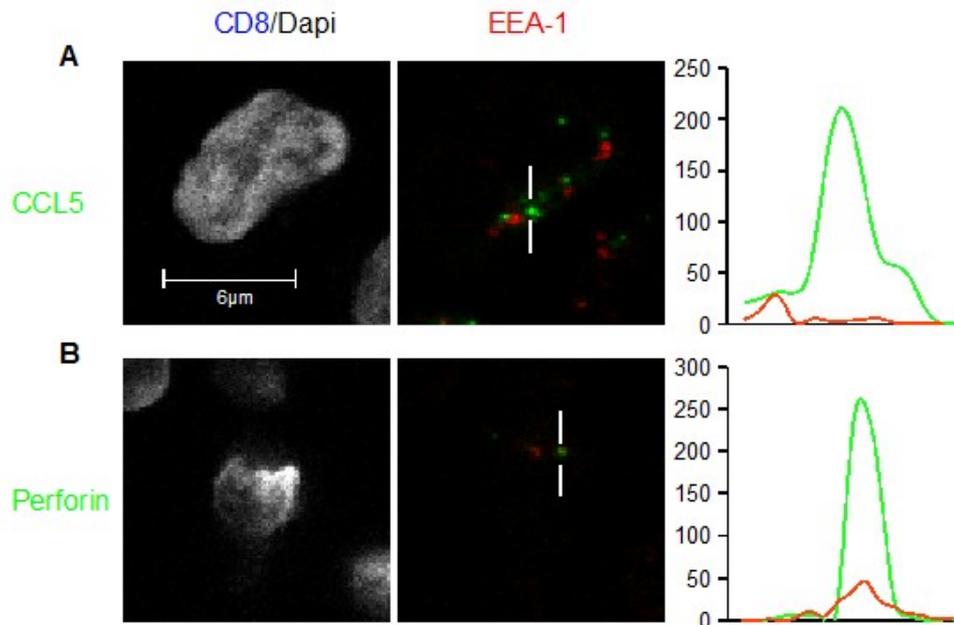
In Tabelle 4.1.6.1 ist der prozentuale Anteil der Kolokalisation von Perforin bzw. CCL5 und den lytischen Markern GMP-17, CD107, Granzym B und Granzym A in NK-Zellen aufgeführt.

	Kolokalisation mit					
	Perforin	CCL5	GMP-17	CD107	Granzym B	Granzym A
<b>Perforin</b>	xxx	n.b*	95%	99%	91%	89%
<b>CCL5</b>	n.b*	xxx	2%	5%	1%	8%

**Tabelle 4.1.6.1: Prozentualer Anteil der Kolokalisation von Perforin bzw. CCL5 mit GMP-17, CD107, Granzym B und Granzym A.** \*n.b steht für nicht bestimmbar, da die Antikörper den selben Isotyp (IgG2b) hatten.

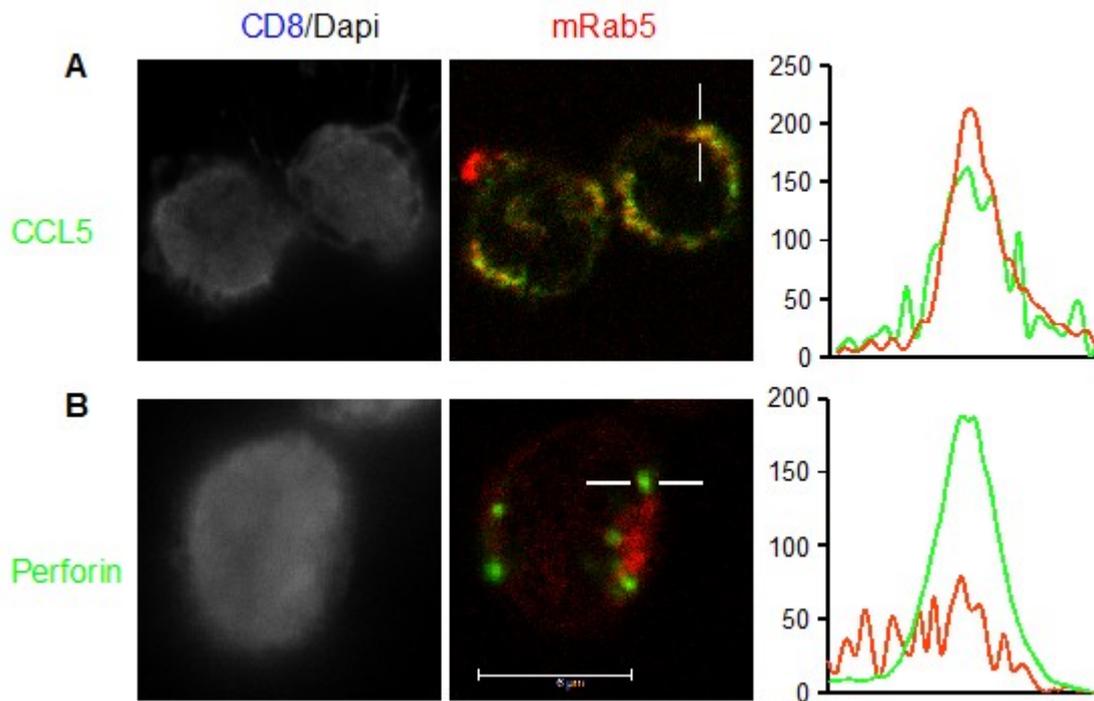
Obwohl CCL5 nicht mit lytischen Granula und deren Proteinhalt kolokalisierte deutete die punktäre Färbung auf eine vesikuläre Lagerung hin.

Daher wurden endosomale Vesikel über Marker EEA-1 (frühe endosomale Vesikel) und Rab5 (späte endosomale Vesikel und Recyclingvesikel) in Kombination mit CD8 und Perforin bzw. CCL5 gefärbt. Die Kombinationsfärbung von CD8, EEA-1 und Perforin bzw. CCL5 (Abbildung 4.1.6.6) zeigte keine Kolokalisation von Perforin oder CCL5 mit EEA-1.



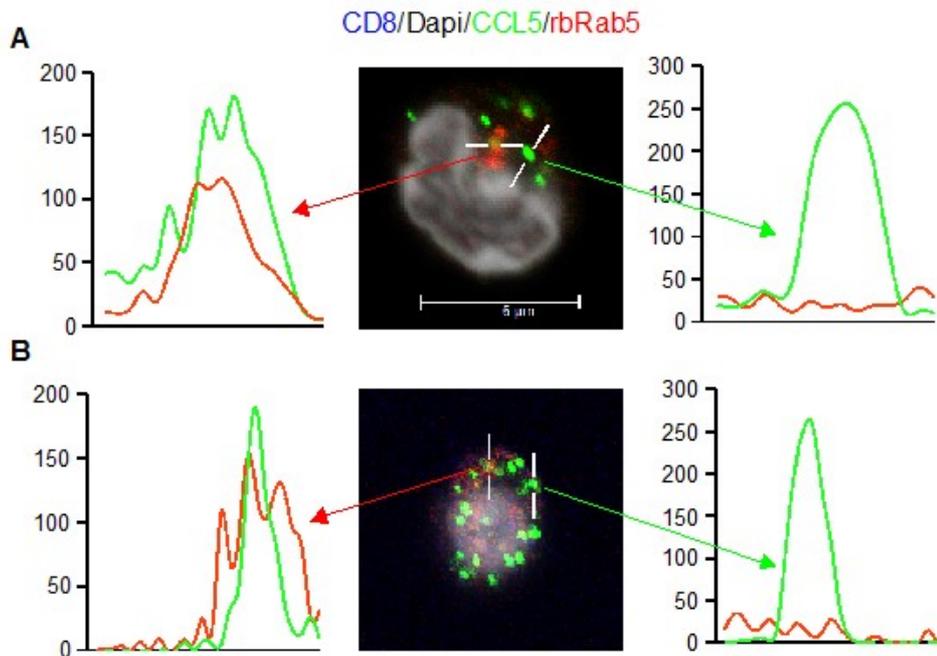
**Abbildung 4.1.6.5: Konfokale Bildaufnahme einer NK-Zelle gefärbt mit Antikörperkombination CCL5 (A), EEA-1 und CD8 bzw. Perforin (B), EEA-1 und CD8.** PBMCs wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft und mit Antikörperkombination gegen CD8 (anti-Kaninchen-Cy5, dargestellt in blau), EEA-1 (anti-MausIgG1-A568, rot) und Perforin (anti-MausIgG2b-Alexa488) bzw. CCL5 (VL2-Hybridomüberstand und anti-MausIgG2b-A488, grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen (Maßstab entspricht 6µm) wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, mit z-Stacks (0,3µm Abstand) über die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle. Dargestellt ist exemplarisch eine optische Schnittebene (z-Ebene) mit den Fluoreszenzsignalen von CD8 und DAPI (jeweils links) sowie EEA-1 und Perforin bzw. CCL5 als Überlagerungsbild (Mitte). Zur Auswertung der Kolokalisation wurden alle z-Stacks individuell bewertet und eine Kolokalisation von EEA-1 mit Perforin bzw. CCL5 einerseits optisch identifiziert, wenn sich eine gelb-orange Mischfarbe ergab. Andererseits wurde eine Kolokalisation mithilfe einer Histogrammdarstellung der Fluoreszenzprofile entlang einer ausgewählten Linie identifiziert. Auf der rechten Seite sind die Fluoreszenzintensitätsprofile von EEA-1 (rot) und Perforin (grün) bzw. CCL5 (grün) entlang der weißen Linien dargestellt. Es zeigte sich keine Kolokalisation von Perforin bzw. CCL5 mit EEA-1 in NK-Zellen (CD8-negative Zelle in PBMC)

In Abbildung 4.1.6.7 ist die Kombinationsfärbung von CD8, dem anti Rab5 Antikörper aus der Maus (mRab5) und Perforin bzw. CCL5 in NK-Zellen zu sehen. Es zeigte sich, dass CCL5, aber nicht Perforin, mit mRab5 kolokalisierte. Eine quantitative Bewertung des Anteils der CCL5 positiven Vesikel ergab, dass durchschnittlich 94% der CCL5-Vesikel gleichzeitig auch mRab5 positiv waren.



**Abbildung 4.1.6.6: Konfokale Bildaufnahme einer NK-Zelle gefärbt mit Antikörperkombination CCL5 (A), mRab5 und CD8 bzw. Perforin (B), mRab5 und CD8.** PBMCs wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft und mit Antikörperkombination gegen CD8 (anti-Kaninchen-Cy5, dargestellt in blau), mRab5 (anti-MausIgG1-A568, rot) und Perforin (anti-MausIgG2b-Alexa488) bzw. CCL5 (VL2-Hybridomüberstand und anti-MausIgG2b-A488, grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen (Maßstab entspricht 6µm) wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, mit z-Stacks (0,3µm Abstand) über die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle. Dargestellt ist exemplarisch eine optische Schnittebene (z-Ebene) mit den Fluoreszenzsignalen von CD8 und DAPI (jeweils links) sowie mRab5 und Perforin bzw. CCL5 als Überlagerungsbild (Mitte). Zur Auswertung der Kolokalisation wurden alle z-Stacks individuell bewertet und eine Kolokalisation von mRab5 mit Perforin bzw. CCL5 einerseits optisch identifiziert, wenn sich eine gelb-orange Mischfarbe ergab. Andererseits wurde eine Kolokalisation mithilfe einer Histogrammdarstellung der Fluoreszenzprofile entlang einer ausgewählten Linie identifiziert. Auf der rechten Seite sind die Fluoreszenzintensitätsprofile von mRab5 (rot) und Perforin (grün) bzw. CCL5 (grün) entlang der weißen Linien dargestellt. Es zeigte sich eine Kolokalisation von CCL5 mit mRab5 aber nicht von mRab5 und Perforin in NK-Zellen (CD8-negative Zelle in PBMC).

Die Kolokalisation von CCL5 mit dem Rab5 Kompartiment wurde weiterhin analysiert, indem zur Färbung ein Antikörper aus dem Kaninchen (rbRab5) verwendet wurde. Die Kombinationsfärbung von CCL5 und rbRab5 in frisch isolierten NK-Zellen (4.1.6.8 A) zeigte viel weniger Rab5-Signal und nur weniger Kolokalisation, der CCL5 positiven Vesikel (50%) als mit dem mRab5-Antikörper (94%) beobachtet wurde. Allerdings waren 90% der rbRab5 Vesikel CCL5 positiv. NK-Zellen, die über 24h mit IL-2 (50U/ml) kultiviert worden waren, zeigten trotz Zunahme der rbRab5 und CCL5 positiven Vesikel nicht mehr Kolokalisation.



**Abbildung 4.1.6.7: Konfokale Bildaufnahme einer NK-Zelle gefärbt mit Antikörperkombination CCL5, rbRab5 und CD8 in isolierten NK-Zellen direkt nach Isolation (A) und nach 24h IL-2 Inkubation (50U/ml).** NK-Zellen wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgetropft und mit Antikörperkombination gegen CD8 (anti-Kaninchen-Cy5, dargestellt in blau), rbRab5 (anti-rb-RRX, rot) und CCL5 (VL2-Hybridomüberstand und anti-MausIgG2b-A488, grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen (Maßstab entspricht 6µm) wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, mit z-Stacks (0,3µm Abstand) über die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle. Dargestellt ist exemplarisch eine optische Schnittebene (z-Ebene) mit den Fluoreszenzsignalen von CD8, rbRab5 CCL5 als Überlagerungsbild (Mitte). Zur Auswertung der Kolokalisation wurden alle z-Stacks individuell bewertet und eine Kolokalisation von rbRab5 mit CCL5 einerseits optisch identifiziert, wenn sich eine gelb-orange Mischfarbe ergab. Andererseits wurde eine Kolokalisation mithilfe einer Histogrammdarstellung der Fluoreszenzprofile entlang einer ausgewählten Linie identifiziert. Die Fluoreszenzintensitätsprofile auf der linken Seite zeigen Kolokalisation von rbRab5 (rot) und CCL5 (grün), während auf der rechten Seite ein Vesikel dargestellt ist, welches positiv für CCL5 aber negativ für rbRab5 war.

Als Schlussfolgerung kann man ziehen, dass rbRab5 wie mRab5 CCL5haltige Vesikel kennzeichnet, CCL5 aber auch in rbRab5 negativen Vesikeln zu finden ist, die von dem mRab5 Antikörper angefärbt werden können..

## 4.2 Die Rolle des Chemokins CCL5 bei der Phagozytose apoptotischer Zellen

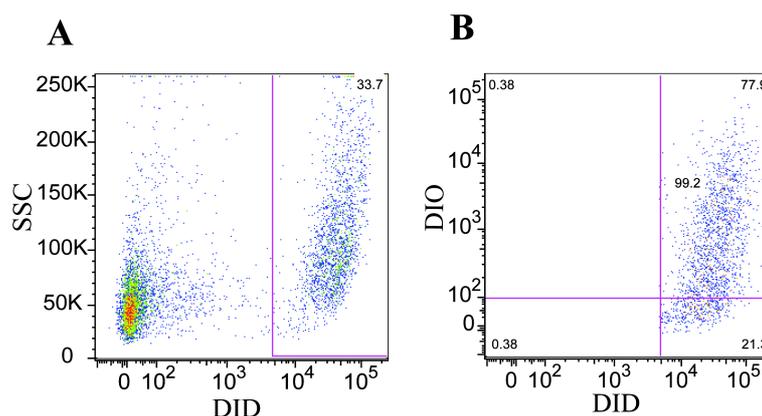
### 4.2.1 Vorarbeiten

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass CTL während des Tötens von Zielzellen CCL5 auf die Oberfläche der Zellen ablagerten. Diese Ablagerung war abhängig von Zielzellerkennung, da die Kokultur der CTL mit einer Zelle, die von den CTL nicht erkannt wurde, zu keiner Übertragung von CCL5 führte [56]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Zielzellen, die nach CTL-vermittelter Apoptose mit CCL5 bedeckt waren, besser von Makrophagen phagozytiert wurden als apoptotische Zellen ohne CCL5 auf der Oberfläche [57]. Basierend auf diesen Vorarbeiten sollte nun geklärt werden, auf welchem Mechanismus die gesteigerte Phagozytose von CCL5-bedeckten apoptotischen Zellen durch Makrophagen beruht.

### 4.2.2 Einfluss von CCL5 auf die Phagozytose durch Maus-Makrophagen

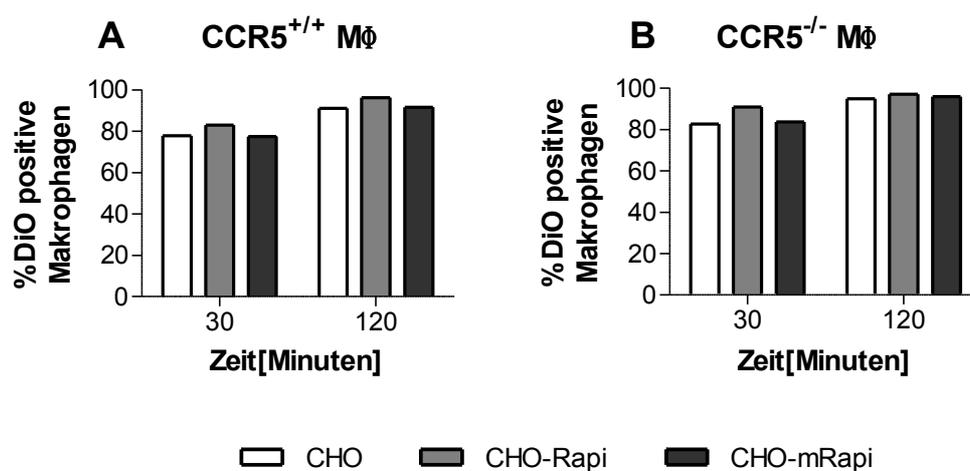
Da CCL5 auf Makrophagen sowohl an CCR1 als auch an CCR5 binden kann war die Frage, welcher Rezeptor für die CCL5-induzierte Phagozytose verantwortlich ist. Um zu testen, ob der Rezeptor CCR5 eine Rolle spielt wurde die Phagozytose von Wildtyp(WT) Maus-Makrophagen mit der von CCR5<sup>-/-</sup> Maus-Makrophagen verglichen. Um die Rolle des CCL5 zu erkennen wurden drei verschiedene Typen apoptotischer Zellen verwendet. Diese waren: apoptotische Zellen von untransfizierten CHO-Zellen (*chinese ovarian cancer cells*; CHO), die kein CCL5 auf der Oberfläche tragen, apoptotische Zellen von CHO-Zellen die stabil mit dem ccl5 Gen transfiziert waren, wobei die kodierende Sequenz auch eine Signalsequenz für eine GPI-Verankerung (ccl5-GPI) enthielt um zu erreichen, dass CCL5 auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wird (CHO-Rapi) und apoptotische Zellen von CHO-Zellen in die ein mutiertes ccl5-GPI stabil transfiziert wurde (CHO-mRapi). Das mutierte ccl5-GPI erzeugt ein CCL5, mit einem N-terminalen Methionin, welches als CCL5 Antagonist wirkt. Vor Induktion der Apoptose wurden die CHO-, CHO-Rapi und CHO-mRapi-Zellen mit Vybrant®DiO gefärbt. Die Apoptose wurde durch Staurosporin-Inkubation (18 Stunden) induziert. Nach Ablauf der Apoptoseinduktion wurde die Stärke der Färbung und die Anzahl der apoptotischen

Ereignisse durchflusszytometrisch analysiert. Die Makrophagen wurden mit Vybrant<sup>®</sup>DiD gefärbt und die Farbintensität durchflusszytometrisch überprüft. Makrophagen und apoptotische Zellen wurden im Verhältnis 1:3 gemischt und über 30min bzw. 120min bei 37°C und 4°C kokultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Phagozytoseleistung, d.h. wieviele apoptotische Zellen von den Makrophagen aufgenommen wurden, und die Anzahl der Makrophagen, die apoptotische Zellen aufgenommen hatten am Durchflusszytometer bestimmt. Um den prozentualen Anteil an phagozytierenden Makrophagen zu bestimmen wurde im Punktediagramm die DiD-positiven Zellen gegen den Sidescatter (SSC) dargestellt und die Gesamtheit der DiD-positiven Zellen (Makrophagen) ausgewählt (Abb. 4.2.2.1 A). Innerhalb der DiD-positiven Zellen wurde der prozentuale Anteil der DiO positiven Zellen bestimmt. Der Grenzwert zur Unterscheidung von DiO positiven und DiO negativen Makrophagen wurde über den Ansatz von DiD-positiven Makrophagen ohne apoptotische Zellen festgelegt. Die Phagozytoseleistung ergibt sich aus der medianen DiO-Fluoreszenzintensität (DiO-MFI) und gibt an wieviel apoptotische Zellen (DiO positive Zellen) die Makrophagen (DiD positive Zellen) aufgenommen haben. Bei der Berechnung der Phagozytoseleistung wird die Differenz aus der DiO-MFI des 37°C Werts und des 4°C Werts gebildet. Zusätzlich musste mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden, der die unterschiedlichen Farbintensitäten der apoptotischen Zellen korrigiert. Dieser Korrekturfaktor ( $K_{FI}$ ) ergibt sich, indem die MFI der apoptotischen Zellen mit der höchsten Intensität gleich eins gesetzt wurde und zu den beiden anderen Zellen in Relation gesetzt wurde



**Abbildung 4.2.2.1: Die Auswahlstrategie des Phagozytostest.** DiD markierte Balb/c WT und Ccr5<sup>-/-</sup> Makrophagen wurden im Verhältnis 1:3 mit DiO markierten apoptotischen CHO-Zellen, CHO-Rapi-Zellen und CHO-mRapi-Zellen gemischt und für 30min bzw. 120min inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Zuerst wurde in einem Punktediagramm die DiD Farbintensität der durchflusszytometrisch analysierten Zellen gegen den *sidescatter* (SSC) dargestellt und die DiD positiven Zellen (Makrophagen) über ein Auswahlfenster isoliert (A). Die DiD Farbintensität der DiD positiven Zellen wurden dann wiederum gegen die DiO Farbintensität dargestellt um die DiO-Farbintensität (DiO-MFI) und den prozentualen Anteil der DiD positiven Zellen zu bestimmen. Der horizontale Grenzwert für DiO-Positivität bzw. Negativität ergab sich aus dem Ansatz, der nur DiD-positive Makrophagen aber keine DiO positiven Tumorzellen enthielt (B).

In Abbildung 4.2.2.2 ist der prozentuale Anteil der phagozytisch aktiven Makrophagen dargestellt. Es zeigte sich, dass 80%-95% der Balb/c WT Makrophagen phagozytisch aktiv waren. Es zeigt sich kein Unterschied im Anteil der phagozytisch aktiven Makrophagen zwischen CHO, CHO-Rapi oder CHO-mRapi Zellen. Die CCR5<sup>-/-</sup> Maus Makrophagen zeigten keinen Unterschied zu den WT Makrophagen. Daraus kann man schließen, dass CCL5 nicht den Anteil phagozytisch aktiver Makrophagen erhöht.

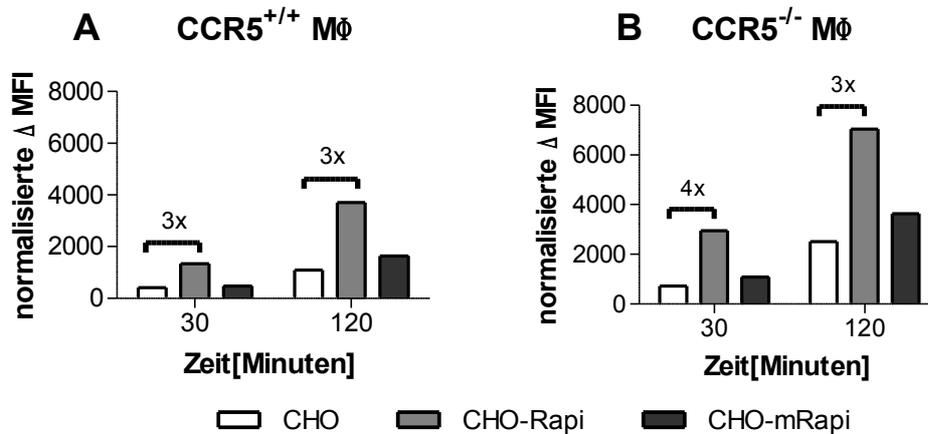


**Abbildung 4.2.2.2: Der prozentuale Anteil phagozytisch aktiver Balb/c WT (A) und CCR5<sup>-/-</sup> Makrophagen (B).** DiD markierte Balb/c WT und CCR5<sup>-/-</sup> Makrophagen wurden im Verhältnis 1:3 mit DiO markierten apoptotischen CHO-Zellen, CHO-Rapi-Zellen bzw. CHO-mRapi-Zellen gemischt und für 30min bzw. 120min inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil der phagozytisch aktiven Makrophagen wurde bestimmt, indem der prozentuale Anteil der DiO und gleichzeitig DiD positiven Zellen (Makrophagen) im Punktediagramm bei 37°C und bei 4°C bestimmt und die Differenz aus beiden Werten gebildet wurde. Auf der Y-Achse sind die Differenzwerte als %DiO-positive Makrophagen dargestellt. Der weiße Balken zeigt die Phagozytose mit apoptotischen CHO Zellen, der hellgrauer Balken die Phagozytose mit apoptotischen CHO-Rapi Zellen, der dunkelgrauer Balken die Phagozytose mit apoptotischen CHO-mRapi Zellen. Die X-Achse zeigt die zwei untersuchten Zeitwerte 30min und 120 min.

In Abbildung 4.2.2.3 ist die Phagozytoseleistung (als normalisierte  $\Delta$ MFI) der WT-Maus Makrophagen und der CCR5<sup>-/-</sup> Maus Makrophagen zu sehen. Die Phagozytoseleistung sagt aus, wieviele apoptotische Zellen von phagozytisch aktiven Makrophagen aufgenommen wurden. Sie berechnet sich aus der DiO-MFI der Makrophagen (DiD positive Zellen). Es zeigte sich, dass WT Makrophagen 3mal mehr CHO-Rapi-Zellen aufnehmen als apoptotischen CHO-Zellen oder CHO-mRapi-Zellen. Diese Steigerung ist CCL5 abhängig, da die CHO-mRapi positiven apoptotischen Zellen, die antagonistisch wirken, die Phagozytoseleistung gegenüber den apoptotischen CHO-Zellen nicht steigern. Mit zunehmender Phagozytosezeit wurden allgemein mehr apoptotische Zellen aufgenommen aber der Unterschied zwischen den

einzelnen apoptotischen Zelltypen veränderte sich nicht.

Die Phagozytoseleistung der  $CCR5^{-/-}$  Makrophagen war generell doppelt so hoch wie die der WT Makrophagen. Vergleicht man auch hier die Phagozytoseleistung zwischen den apoptotischen Zelltypen so sieht man das  $CCR5^{-/-}$  Makrophagen CHO-Rapi apoptotische genauso wie WT Makrophagen verstärkt aufnahmen. Daher kann man davon ausgehen, dass sie CCL5 induzierte Steigerung der Phagozytose nicht CCR5 abhängig ist.



**Abbildung 4.2.2.3: Phagozytoseleistung der Balb/c WT (A) und Balb/c  $CCR5^{-/-}$  (B) Maus Makrophagen.** DiD markierte Balb/c WT und  $CCR5^{-/-}$  Makrophagen wurden im Verhältnis 1:3 mit DiO markierten apoptotischen CHO-Zellen, CHO-Rapi-Zellen und CHO-mRapi-Zellen gemischt und für 30min bzw. 120min inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Phagozytoseleistung wurde bestimmt, indem die DiO MFI der DiD positiven Makrophagen im Histogramm bestimmt wurde. Aus der DiO MFI der DiD positiven Zellen bei 37° und der DiO MFI der DiD positiven Zellen bei 4°C wurde die Differenz  $\Delta MFI$  gebildet. Die  $\Delta MFI$  wurde mit dem vorher bestimmten Faktor zum Ausgleich unterschiedlicher Farbintensitäten der verschiedenen apoptotischen Zelltypen multipliziert. Diese normalisierten  $\Delta MFI$ -Werte sind auf der Y-Achse abgebildet. Der weiße Balken zeigt die Phagozytose mit apoptotischen CHO Zellen, der hellgrauer Balken die Phagozytose mit apoptotischen CHO-Rapi Zellen, der dunkelgrauer Balken die Phagozytose mit apoptotischen CHO-mRapi Zellen. Die X-Achse zeigt die zwei untersuchten Zeitwerte 30min und 120min.

### 4.3 NK-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom

NK-Zellen können Zellen mit aberranter MHC Expression, z.B. Tumorzellen, erkennen und durch die Sezernierung von Zytokinen andere Immunzellen anlocken und aktivieren. In Vorarbeiten von J. Schleyen [38] wurde gezeigt, dass sich die klarzelligen Nierenzellkarzinom durchflusszytometrisch anhand ihres prozentualen Gehalts an NK-Zellen in NK<sup>high</sup> (NK-Anteil >20%) und NK<sup>low</sup> Tumore einteilen lassen. Die NK-Zellen beider Tumorgruppen unterschieden sich auch in ihrer funktionellen Qualität, da insbesondere die NK-Zellen aus Tumoren mit einem hohen NK-Anteil ihre zytolytische Aktivität durch Kurzzeit-Inkubation mit niedrig dosiertem IL-2 wiedererlangen konnten, während NK-Zellen aus NK<sup>low</sup> Tumoren in der Regel nicht reaktivierbar waren. Es ist bekannt, dass einige Patienten auf IL-2 basierte Immuntherapien mit Tumorregression ansprechen und wir spekulierten daher, ob ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an NK-Zellen im Tumor und dem Ansprechen auf eine IL-2-basierte Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinom bestehen könnte. Um diese Hypothese zu evaluieren müsste eine große Patientenkohorte, inklusive Patienten mit IL-2 Therapie, untersucht werden. Die jetzige Methode zur Unterscheidung von Tumoren mit hohem und niedrigem NK-Anteil beruht auf der durchflusszytometrischen Analyse von TIL, die aus frischem post-operativem Gewebe isoliert wurden und ist deshalb ungeeignet zur Analyse von großen Patientenkohorten und archiviertem Patientenmaterial. Daher war es ein Ziel ein molekulares Profil zu etablieren, das den unterschiedlichen NK-Gehalt in den TIL widerspiegelt, so dass Archivmaterial untersucht und retrospektiv der Zusammenhang von NK-Gehalt und Therapieansprechen evaluiert werden kann.

### 4.3.1 Das molekulare Profil des Tumormilieus

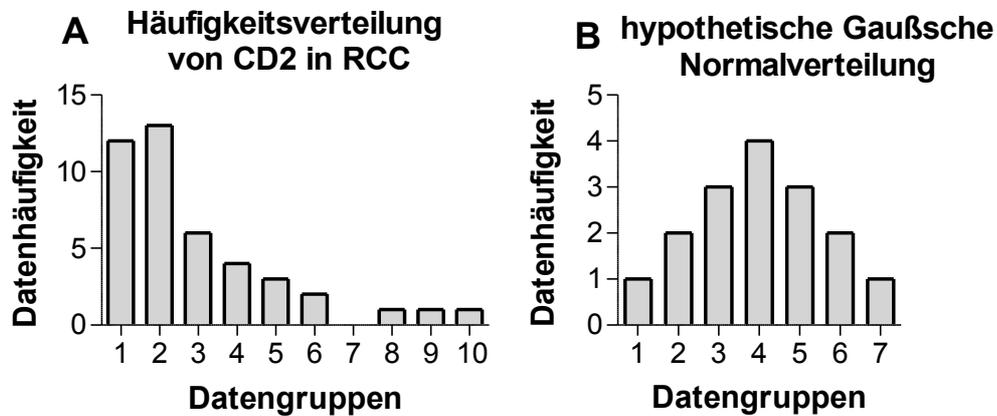
Um ein molekulares Profil des Tumormilieus des klarzelligem Nierenzellkarzinoms auf zu stellen, wurde Tumormaterial von 37 Patienten mit pathologisch bestätigtem klarzelligem Nierenzellkarzinom über quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysiert. Von 12 Patienten wurde auch das Normalnierengewebe der tumortragenden Niere untersucht. Als NK-zellrelevante Marker wurden die Lymphozyten Marker CD2 (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen), CD3 (T-Zellen), Nkp46 (NK-Zellen), CD56 (NK-Zellen), Perforin (CTL und NK-Zellen) und Granzym B (CTL und NK-Zellen) sowie Zytokine und Chemokine, die für den Aktivierungszustand oder die Rekrutierung von NK-Zellen im Gewebe bedeutsam sein könnten quantifiziert.

#### 4.3.1.1 Die Transkriptmenge von Lymphozytenmarkern in Normalnierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe

Aus den Geweben wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In dieser cDNA wurde die Transkriptmenge von CD2, CD3, Nkp46, Perforin und Granzym B über eine Taqman-basierte qRT-PCR bestimmt. Die resultierenden Ct-Werte wurden auf das Haushaltsgen 18SrRNA normalisiert, da 18SrRNA in Vorversuchen im Vergleich mit GAPDH und  $\beta$ -Actin für die Tumorgewebe am besten geeignet war [58]. Die Transkriptmenge wurde über die *comparative-Ct-Methode* berechnet. In den Fällen, in denen die Transkriptmenge eines Parameters erst bei einem Ct-Wert  $>38$  nachweisbar war, also unter dem Detektionsgrenzen der Methode lag, wurde dem Gewebe für diesen Parameter willkürlich der Wert  $10^{-10}$  zugewiesen, da dieser mindestens eine Log-Stufe unter der niedrigsten nachweisbaren Transkriptmenge lag. In der graphischen Darstellung wurden diese Werte mit u.D. für „unter der Detektionsgrenze“ gekennzeichnet.

Für die korrekte statistische Auswertung war es nötig zu untersuchen, ob die Daten der einzelnen Parameter normalverteilt waren also einer Gaußschen' Verteilung folgten oder nicht. Dazu wurden die Daten aller Parameter verschiedenen Normalitätstests (Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino and Pearson omnibus und Shapiro-Wilk Normalitätstest) unterzogen. In Abbildung 4.3.1.1 A ist die Häufigkeitsverteilung der Daten von CD2 für RCC dargestellt. Wenn man es mit den fiktiven normalverteilten Daten in Abb. 4.3.1.1B vergleicht sieht man auch graphisch,

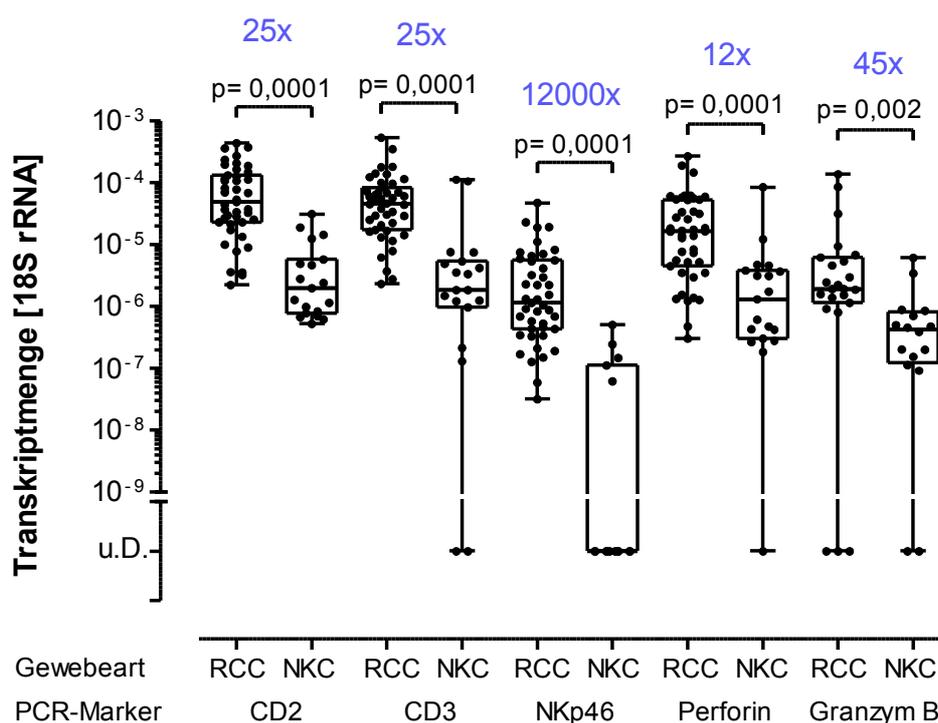
dass diese Daten nicht normalverteilt sind. Für keinen Parameter konnte eine signifikante Normalverteilung festgestellt werden. Daher wurden bei den nachfolgenden statistischen Auswertungen die Testvarianten für nicht-parametrische, also nicht-normalverteilte Daten, verwendet.



**Abbildung 4.3.1.1: Die Häufigkeitsverteilung der Transkriptmenge von CD2 in RCC-Gewebe (A) im Vergleich zu einer fiktiven normalverteilten Häufigkeitsverteilung (B). A)** Die RCC-Gewebe wurden durch die Statistiksoftware anhand ihrer Transkriptmenge aufsteigend in die Gruppen 1 bis 10 eingeteilt und die Anzahl der Gewebe innerhalb jeder Gruppe bestimmt. **B)** Anstelle von Transkriptmengen wurden fiktive Werte verwendet, so dass sich eine Normalverteilung ergibt. Der Vergleich der Häufigkeitsverteilung von CD2 mit der fiktiven Normalverteilung zeigt graphisch, dass die CD2 Transkriptmenge in RCC Geweben kein normalverteilter Parameter ist.

Der Mann-Whitney-U Test ist ein statistisches Analyseverfahren für nicht-parametrische Daten. Dieser wurde angewandt um fest zu stellen, ob sich die Transkriptmenge an CD2, CD3, NKp46, Perforin und Granzym B in den Tumorgeweben (RCC) signifikant von der in den Normalnierengeweben (NKC) unterscheidet (Abb. 4.3.1.2). Alle Parameter unterschieden sich signifikant, wobei die Transkriptmenge in den Tumorgeweben immer höher war als in den Normalgeweben.

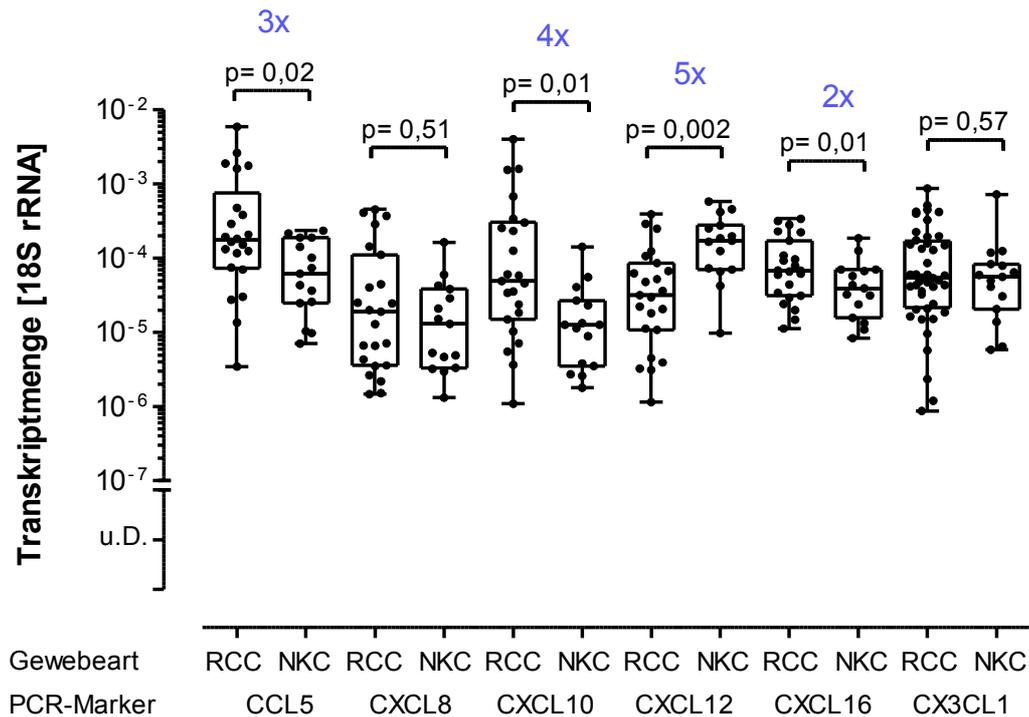




**Abbildung 4.3.1.2: Transkriptmenge der Lymphozytenmarker CD2, CD3, NKp46, Perforin und Granzym B in RCC und NKC Gewebe.** In 37 RCC-Geweben und 12 NKC-Geweben wurde die Transkriptmenge an CD2, CD3, NKp46, Perforin und Granzym B mittels qRT-PCR bestimmt und auf 18SrRNA normalisiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge der Lymphozytenmarker in den RCC und NKC Geweben signifikant unterschieden (p-Werte). Jeder Punkt steht für ein Gewebe. Die überlagerte Box-Whiskers-Darstellung zeigt den Median, sowie die 25% bzw. 75% Perzentile. Die Whiskers zeigen die Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Transkriptmenge an. Als u.D. (unter der Detektionsgrenze) wurden die Gewebe eingestuft, deren Ct-Werte der qRT-PCR über 38 lagen. Der xfache Unterschied der medianen Transkriptmenge der RCC-Gewebe zu den NKC-Geweben ist in blau angegeben..

#### 4.3.1.2 Die Transkriptmenge verschiedener Chemokine in Normalnierengeweben und Nierenzellkarzinomen

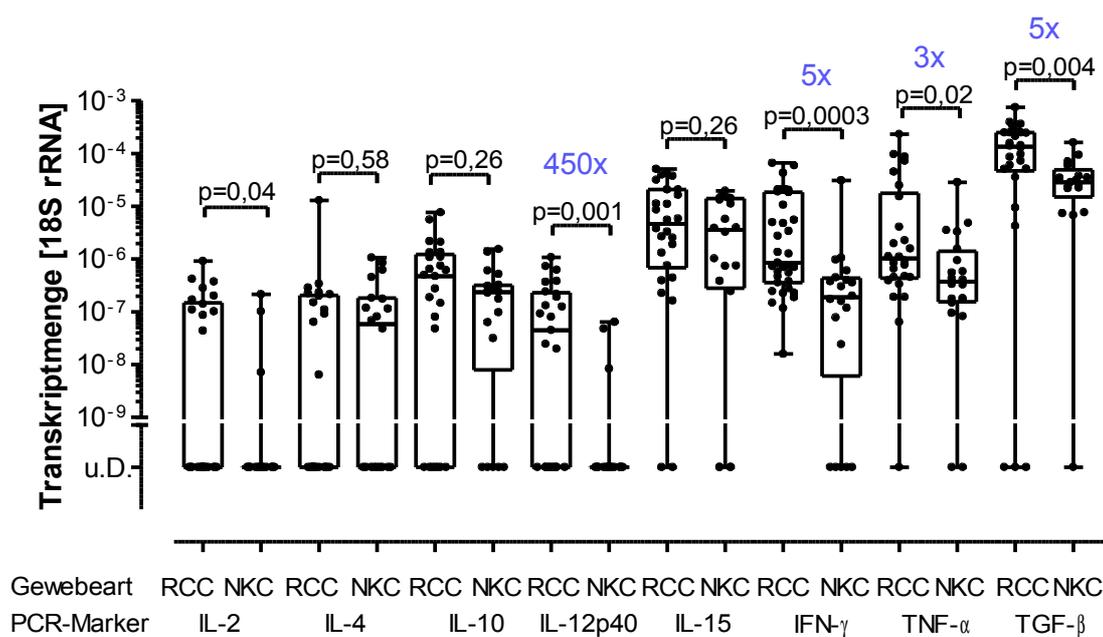
Die RCC- und NKC-Gewebe wurden auf die Transkriptmenge der Chemokine CCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL16 und CX3CL1 untersucht. Für diese Chemokine ist beschrieben, dass sie einen Einfluss auf die Rekrutierung von Lymphozyten haben. In Abbildung 4.3.1.3 sind die Transkriptmengen der Gewebe für die untersuchten Chemokine graphisch dargestellt. Die Transkriptmengen an CCL5, CXCL10 und CXCL16 erwiesen sich als signifikant erhöht, wohingegen die Transkriptmenge an CXCL12 signifikant erniedrigt war. Die Transkriptmengen von CXCL8, CXCL16 und CX3CL1 waren vergleichbar.



**Abbildung 4.3.1.3: Transkriptmenge der Chemokine CCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL16 und CX3CL1 in RCC und NKC Gewebe.** In 37 RCC-Geweben und 12 NKC-Geweben wurde die Transkriptmenge der Chemokine mittels qRT-PCR bestimmt und auf 18SrRNA normalisiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge der Chemokine in den RCC und NKC Geweben signifikant unterschieden (p-Werte). Jeder Punkt steht für einen Gewebe. Die überlagerte Box-Whiskers-Darstellung zeigt den Median, sowie die 25% bzw. 75% Perzentile. Die Whiskers zeigen die Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Transkriptmenge an. Als u.D. (unter der Detektionsgrenze) wurden Gewebe eingestuft, deren Ct-Werte der qRT-PCR über 38 lagen. Der x-fache Unterschied der medianen Transkriptmenge der RCC-Gewebe zu den NKC-Geweben für die signifikant unterschiedlichen Parameter ist in blau angegeben.

### 4.3.1.3 Die Transkriptmenge verschiedener Zytokine in Normalnierengeweben und Nierenzellkarzinomen

Es wurden die Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  untersucht, da diese Zytokine in der Lage sind das Gewebemilieu und somit das Überleben und den Aktivierungszustand der im Gewebe vorhandenen Lymphozyten zu beeinflussen. Die Analyse zeigte, dass die Transkriptmenge der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-12p40 (450fach), IFN- $\gamma$  (5fach) und TNF- $\alpha$  (3fach), aber auch das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  (5fach) in den Tumorgeweben signifikant erhöht waren. IL-4, IL-10 und IL-15 Transkriptmengen waren hingegen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 4.3.1.4).



**Abbildung 4.3.1.4: Transkriptmenge der Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  in RCC- und NKC-Gewebe.** In 37 RCC Geweben und 12 NKC Geweben wurde die Transkriptmenge der Zytokine mittels qRT-PCR bestimmt und auf 18SrRNA normalisiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge der Zytokine in den RCC und NKC Geweben signifikant unterschieden (p-Werte). Jeder Punkt steht für ein Gewebe. Die überlagerte Box-Whiskers-Darstellung zeigt den Median, sowie die 25% bzw. 75% Perzentile. Die Whiskers zeigen die Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Transkriptmenge an. Als u.D. (unter der Detektionsgrenze) wurden Gewebe eingestuft, deren Ct-Werte der qRT-PCR über 38 lagen. Der xfache Unterschied der medianen Transkriptmenge der RCC-Gewebe zu den NKC-Geweben für die signifikant unterschiedlichen Parameter ist in blau angegeben.

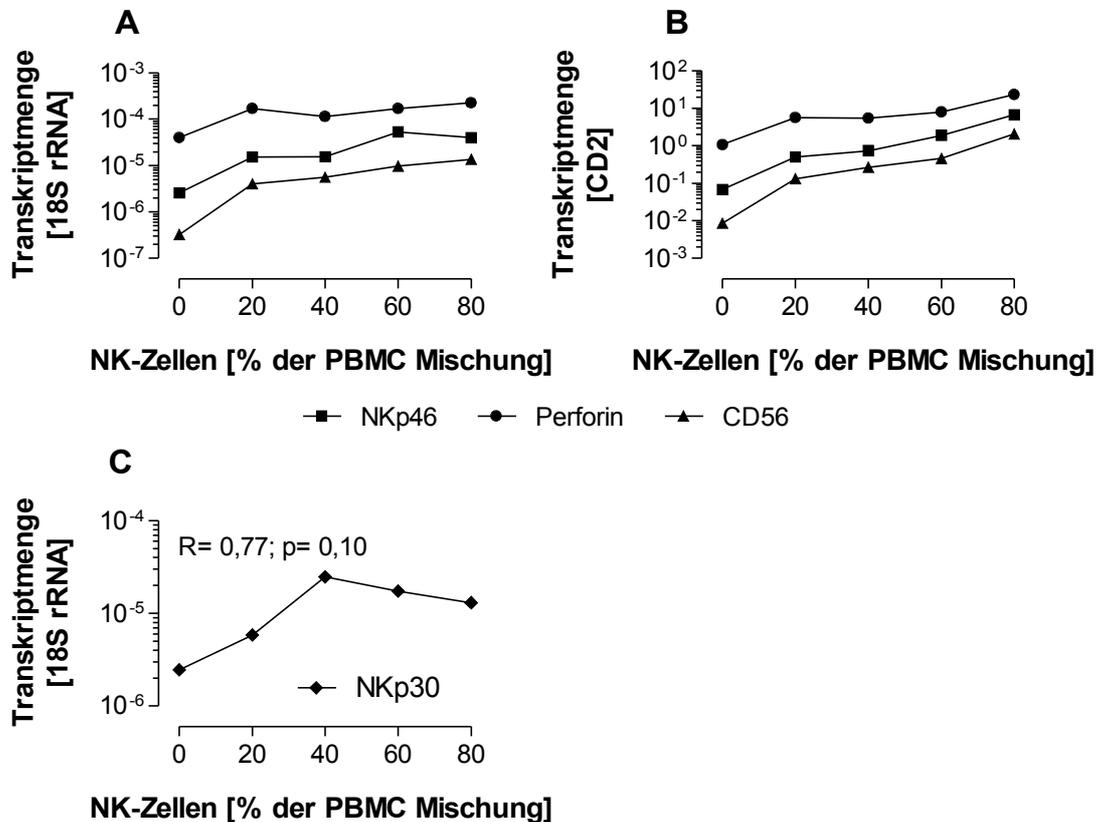
#### 4.4 Bestimmung des Anteils der NK-Zellen am Lymphozyteninfiltrat im Gewebe

##### 4.4.1 NKp46, CD56 und Perforin als molekulare Marker zur Quantifizierung der Häufigkeit von NK-Zellen in einer gemischten Lymphozytenpopulation

NK-Zellen werden über die Expression verschiedener Marker charakterisiert. Einige wie NKp30, NKp44 und NKp46 sind exklusive Marker, während andere wie Perforin und CD56 auch von anderen Zelltypen wie zum Beispiel T-Zellen exprimiert werden. Antikörper gegen diese Marker alleine oder in Kombination mit anderen Markern werden standardmäßig in der Durchflusszytometrie und der Histologie zur Identifizierung und Quantifizierung von NK-Zellen in Zellsuspensionen und Geweben verwendet. Ziel war es nun zu zeigen, ob die Transkriptmenge von NKp30, NKp44, NKp46, CD56 und Perforin benutzt werden kann, um NK-Zellen auf molekularer Ebene zu quantifizieren.

In einem *Spiking*-Experiment wurden isolierte humane NK-Zellen in definierten Konzentrationen zu NK-depletierten peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC) titriert und die Zellmischung über qRT-PCR untersucht. Die Transkriptmenge von NKp30, NKp44, NKp46, CD56 und Perforin wurden einerseits über die Normalisierung mit 18SrRNA oder mit dem Lymphozytenmarker CD2 bestimmt. CD2 ist ein konstitutiv und stabil exprimierter Oberflächenmarker auf T- und NK-Zellen. Die Untersuchung der Transkriptmenge von CD2 über „Multid Normfinder“ Software ergab, dass CD2 ebenso wie 18SrRNA zur Normalisierung der verwendeten Proben geeignet ist. Die Abbildungen 4.4.1.1 A und B zeigen exemplarisch die Transkriptmenge an NKp46, Perforin und CD56 normalisiert auf 18SrRNA bzw. CD2 aufgetragen gegen den prozentualen Anteil an NK-Zellen in der PBMC-Mischung eines Experiments. Es wurden insgesamt 3 Experimente mit PBMC von drei verschiedenen Spender durchgeführt und alle erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Die Transkriptmenge von NKp46, CD56 und Perforin nahm mit steigendem NK-Anteil in der PBMC-Mischung zu. Die Korrelationsanalyse zeigte, dass die Transkriptmenge von NKp46 ( $R=0,94;0,04$ ), CD56 ( $R=0,99;p=0,003$ ) und Perforin ( $R=0,83;p=0,04$ ) normalisiert auf 18SrRNA signifikant mit dem Anteil an NK-Zellen in PBMC korrelierte. Die Normalisierung auf den Lymphozytenmarker CD2 brachte ähnliche Ergebnisse für NKp46 ( $R=0,94;0,02$ ), CD56 ( $R=0,94;p=0,02$ ) und Perforin ( $R=0,88;p=0,03$ ), was darauf hindeutet, dass beide für die Quantifizierung von NK-Zellen geeignet sind. Die Transkriptmenge von NKp30 korrelierte

nicht signifikant mit dem NK-Anteil in der PBMC-Mischung ( $R=0,77$ ,  $p=0,10$ ) (Abb. 4.4.1.1 C). NKp44 konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies ist konsistent mit einer niedrigen bzw. fehlenden NKp44 Expression auf nicht-aktivierten peripheren NK-Zellen [59].



**Abbildung 4.4.1.1: Die Transkriptmengen von NKp46, Perforin und CD56 (A und B) und NKp30 (C) bezogen auf den NK-Zellanteil in einer PBMC-Mischung.** Humane NK-Zellen wurden aus PBMC gesunder Spender isoliert und in definierten Mengen mit NK-Zelldepletierten PBMC vermischt. Die Transkriptmengen von NKp30, NKp46, Perforin und CD56 wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Die Transkriptmengen wurden auf 18SrRNA normalisiert und die gegen den prozentualen Anteil an NK-Zellen in der PBMC-Mischung aufgetragen. Die Berechnung der Spearman Korrelation von Transkriptmenge und NK-Zellanteil ergab, dass die Transkriptmenge von NKp30 mit einem Korrelationskoeffizienten(R) von 0,77 und einem p-Wert von 0,10 nicht signifikant positive korrelierte aber die Transkriptmengen von NKp46 ( $R=0,94$ ;  $p=0,02$ ) Perforin ( $R=0,83$ ;  $p=0,04$ ) und CD56 ( $R=0,99$ ;  $p=0,003$ ). B) Die Transkriptmengen von NKp46, Perforin und CD56 wurden auf den Lymphozytenmarker CD2 normalisiert und gegen den prozentualen Anteil an NK-Zellen in der PBMC Mischung aufgetragen. Die Berechnung der Spearman Korrelation von Transkriptmenge und NK-Zellanteil ergab, dass die Transkriptmengen von NKp46 ( $R=0,94$ ;  $p=0,02$ ), Perforin ( $R=0,88$ ;  $p=0,03$ ) und CD56 ( $R=0,94$ ;  $p=0,02$ ) signifikant mit dem Anteil der NK-Zellen in der PBMC Mischung korrelieren.

#### 4.4.2 Einfluss von Indolamin-2,3-dioxygenase und TGF- $\beta$ auf die Transkriptmenge von NKp46, Perforin und CD56

Für TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) und IDO (indolamin-2,3-dioxygenase) wurde beschrieben, dass sie die Oberflächenexpression und die Transkriptmenge von Lymphozytenmarkern und Chemokinrezeptoren, darunter auch NKp46 und CX3CL1 modulieren können [60-62]. TGF- $\beta$  und IDO sind Gewebefaktoren, die häufig in Tumoren und entzündeten Geweben beobachtet werden. Auch im klarzelligen Nierenzellkarzinom ist eine erhöhte Konzentration an IDO mRNA und Proteinmenge beschrieben [63]. Es war daher wichtig zu definieren, in wie weit sie auf die Transkriptmenge der von uns untersuchten Lymphozytenmarker NKp46, Perforin, CD56 Einfluss nehmen. Aus Untersuchungen an Dendritischen Zellen war bekannt, dass sie nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* nicht mehr als 4 $\mu$ g/ml L-Kynurenin, dem Hauptabbauprodukt von IDO, sezernieren. Daher wurde davon ausgegangen, dass physiologische Konzentrationen an L-Kynurenin im Bereich von 4 $\mu$ g/ml liegen [64]. In der Literatur werden aber Konzentrationen von bis zu 125 $\mu$ g/ml zur Untersuchung von IDO-Effekten verwendet [61]. Modulatorischen Effekte von TGF- $\beta$  auf die Transkriptmenge und Oberflächenexpression von Lymphozytenmarker wurden für einen Bereich von 10ng/ml beschrieben [60].

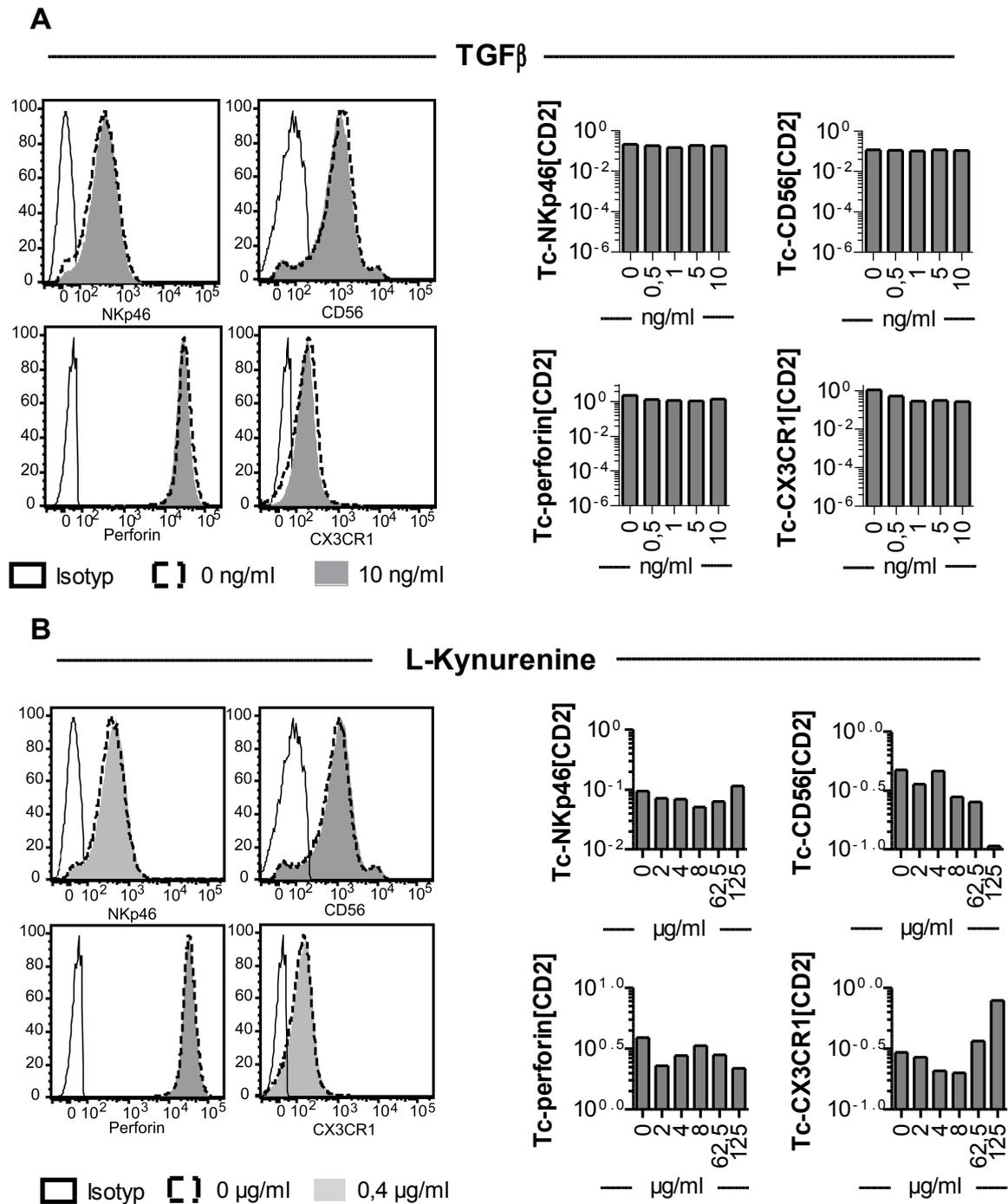
PBMCs und isolierte NK-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von TGF- $\beta$  (0-10ng/ml) und L-Kynurenin (0-125 $\mu$ g/ml) 24 Stunden inkubiert und danach parallel die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie und die Transkriptmenge der Marker NKp46, Perforin, CD56 und CX3CR1 untersucht. Abbildung 4.4.2.1 zeigt, dass TGF- $\beta$  die Oberflächen Expression und die Transkriptmenge von NKp46, Perforin, CD56 und CX3CR1 von isolierten NK-Zellen nicht beeinflusste.





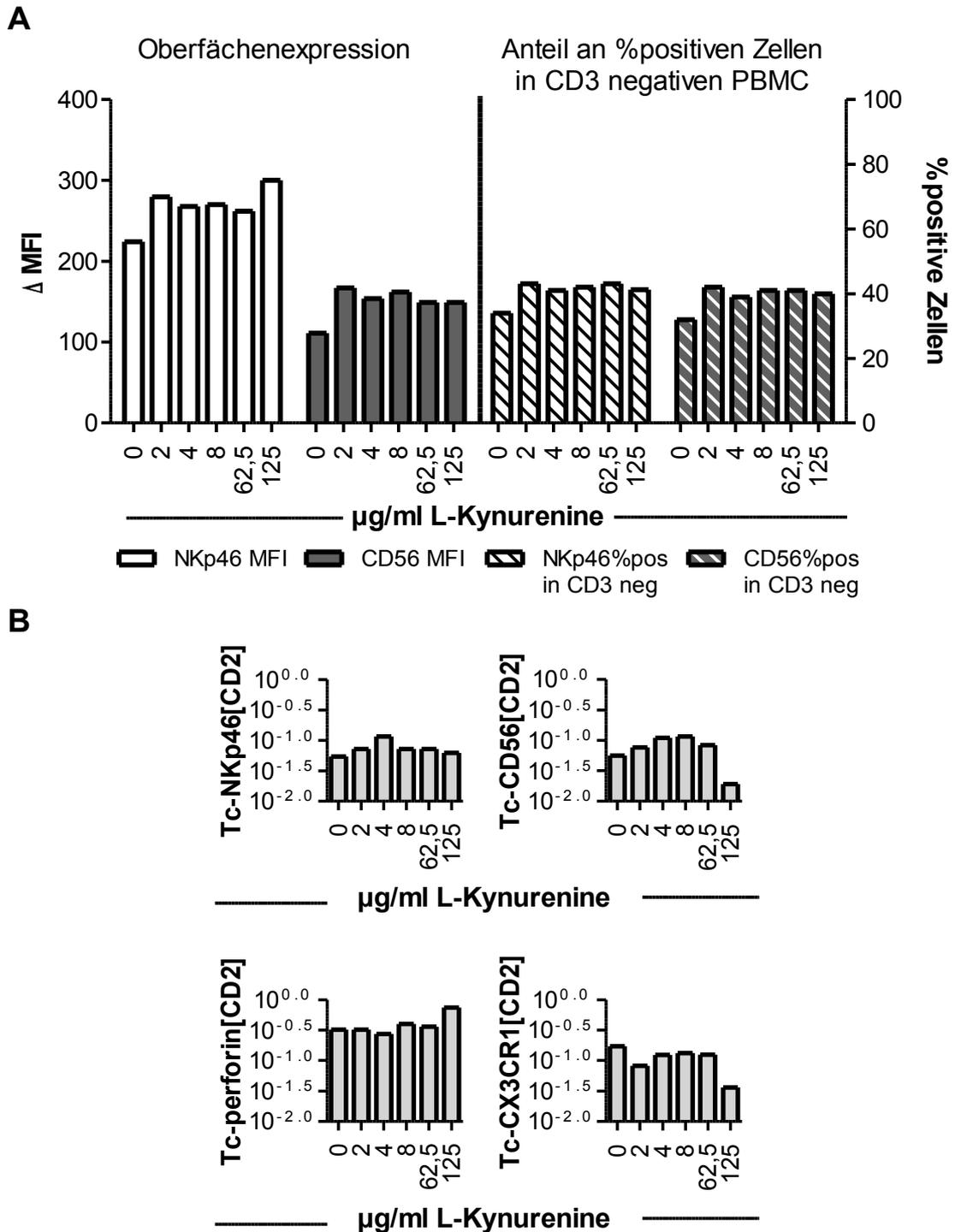






**Abbildung 4.4.2.1: Der Einfluss von TGF- $\beta$  (A) und L-Kynurenin (B) auf die Oberflächenexpression und die Transkriptmenge von NKp46, Perforin, CD56 und CX3CR1 in isolierten primären NK-Zellen.** Der Einfluss von TGF- $\beta$  (0-10ng/ml) und L-Kynurenin (0-125 $\mu$ g/ml) auf die Oberflächenexpression von NKp46 (mIgG1-PE), CD56 (mIgG1-APC), Perforin (mIgG2b sekundär abgegriffen mit anti-IgG2b Alexa488) und CX3CR1 (mIgG2 sekundär abgegriffen mit anti-IgG2b Alexa488 und anti-IgG2a-Alexa488) wurde durchflusszytometrisch untersucht und exemplarisch die  $\Delta$ MFI der angegebenen Konzentrationen im Histogramm dargestellt. Die Transkriptmengen von NKp46, Perforin, CD56 und CX3CR1 normalisiert auf CD2 mittels qRT-PCR bestimmt und in den Balkendiagrammen gegen die verwendeten Konzentration an TGF- $\beta$  und L-Kynurenin aufgetragen.

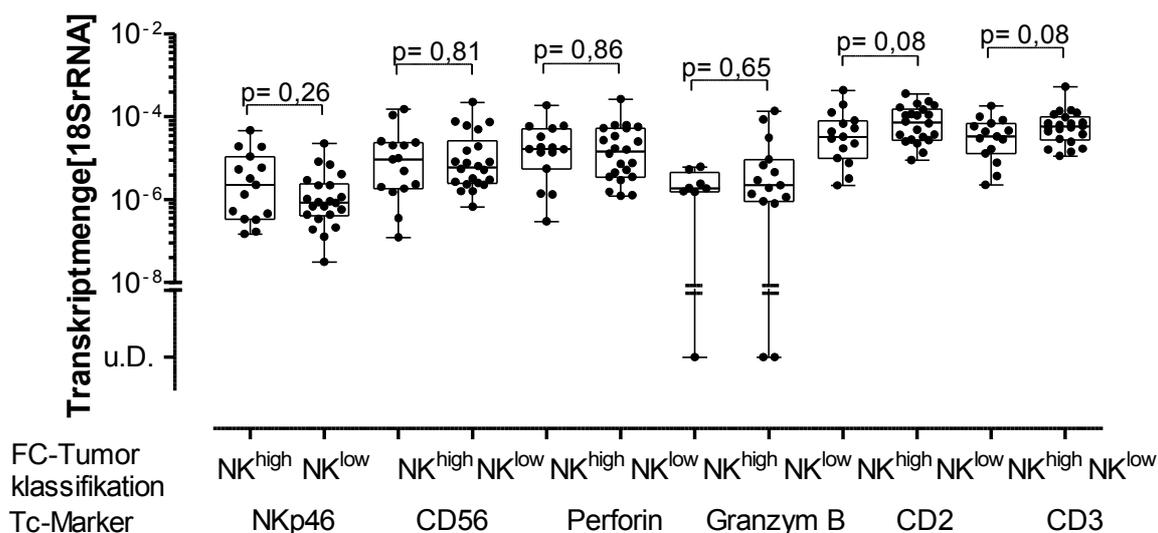
Auch L-Kynurenin beeinflusste die Oberflächenexpression und die Transkriptmenge nicht (Abb. 4.4.2.1). Nur die Transkriptmenge von CD56 sinkt bei Inkubation mit der höchsten L-Kynurenin Konzentration. Die mRNA Expression von CX3CR1 wurde durch die Inkubation mit L-Kynurenin in den höchsten Konzentrationen gesteigert. Zusätzlich zu den isolierten NK-Zellen wurde auch der Effekt von L-Kynurenin auf die Oberflächenexpression und von NKp46 und CD56 und den Anteil der NK-Zellen in den PBMC sowie den Effekt auf die Transkriptmenge von NKp46, Perforin, CD56 und CX3CR1 in NK-Zellen in PBMC untersucht. Abbildung 4.4.2.2 zeigt, dass keine Effekte auf die Oberflächenexpression von NKp46 und CD56 zusehen war. Auch der Anteil der NK-Zellen in PBMC wurde nicht beeinflusst. Weiterhin konnte kein Effekt auf die Transkriptmenge von NKp46, Perforin gesehen werden. Außer einem inhibierenden Effekt der höchsten L-Kynureninkonzentration konnte auch kein Effekt auf die CD56 und CX3CR1 Transkriptmenge festgestellt werden.



**Abbildung 4.4.2.2: Der Einfluss von L-Kynurenin auf die Oberflächenexpression und den Anteil an NKp46 und CD56 positiven Zellen in PBMC (A) und die Transkriptmenge von NKp46, Perforin, CD56 und CX3CR1 in PBMC (B).** A) PBMC wurden mit L-Kynurenin (0-125µg/ml) 24h inkubiert und danach auf die Oberflächenexpression und den Anteil an NKp46 und CD56 positiven Zellen in PBMCs wurde durchflusszytometrisch über die Oberflächenfärbung von NKp46 (mIgG1-PE) und CD56 (mIgG1-APC) untersucht. Die  $\Delta$ MFI der Marker bei angegebener Konzentration wurde aus der Differenz der spezifischen Färbung und der Isotypfärbung berechnet und als Balkendiagramm dargestellt (links). Der prozentuale Anteil der NKp46 und CD56 positiven Zellen innerhalb der CD3 negativen Zellen bei angegebener Konzentration an L-Kynurenin wurden als Balkendiagramm (rechts) dargestellt. B) Die Transkriptmengen von NKp46, Perforin, CD56 und CX3CR1 wurde mittels qRT-PCR bestimmt und in den Balkendiagrammen gegen die verwendeten Konzentration an L-Kynurenin aufgetragen.

#### 4.4.3 Diskriminierung von NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren mittels der Transkriptmenge von NKp46, CD56 und Perforin

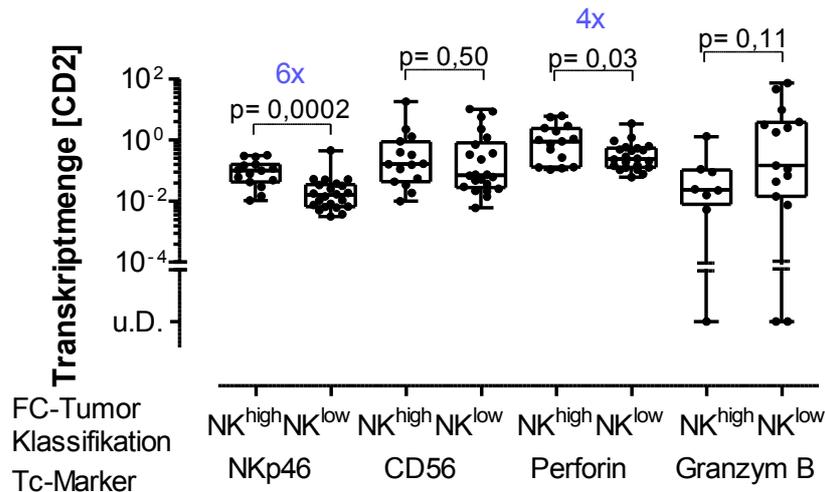
Ein Organ ist eine heterogene Einheit aus verschiedenen Zelltypen mit einem wechselnden aber meist geringem Anteil an Lymphozyteninfiltration. Die Zusammensetzung dieses Infiltrats wird durch organ- und krankheitsspezifischen Faktoren bestimmt. Bisherige Methoden zur NK-Zellquantifizierung sind die Durchflusszytometrie an Gewebesuspensionen oder die Histologie. Die molekulare Quantifizierung würde eine erhebliche Erleichterung darstellen, da limitierende Faktoren wie ausreichende Menge an frischem Gewebematerial bei der Durchflusszytometrie bzw. das Fehlen von spezifischen Markern bei der Histologie keine Rolle spielen würden. Wir hatten mit Hilfe der Durchflusszytometrie an isolierten TIL festgestellt, dass sich RCC-Tumore in zwei Gruppen einteilen lassen. Eine, die in den tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) einen hohen Anteil an NK-Zellen (>20% der TIL) hat und eine mit einem geringen Anteil an NK-Zellen (<20% der TIL). Der Grenzwert von 20% ergab sich durch den Vergleich mit PBMCs gesunder Spender, welche nicht mehr als 15% NK Zellen aufwiesen [38]. Da die Transkriptmengen von NKp46, Perforin und CD56 mit dem NK-Zellanteil in PBMCs korrelierten (siehe Abbildung 4.4.1.1, Kapitel 4.4.1) wurden diese Marker nun auf die RCC-Gewebe angewendet. Zusätzlich wurde die Transkriptmenge von Granzym B als weiterer Lymphozytenmarker bestimmt. Die Marker wurden auf 18SrRNA normalisiert (Tc-18SrRNA), und auf Normalverteilung getestet. Da sie nicht normalverteilt waren, wurden nicht-parametrische Testverfahren verwendet, um zu evaluieren, ob die Transkriptmenge die Unterscheidung von NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren erlaubt. Die 18SrRNA normalisierten Transkriptmengen von NKp46, Perforin, CD56 und Granzym B unterschieden die FACS-basierten (FC) NK<sup>high</sup> oder NK<sup>low</sup> Tumore nicht (Abb. 4.4.3.1). FC-NK<sup>low</sup>-Gewebe hatten zwar eine höhere CD2- und CD3-Transkriptmenge als NK<sup>high</sup>-Gewebe. Dies war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 4.4.3.1: 18SrRNA normalisierte Transkriptmengen der Lymphozytenmarker in RCC-Tumore mit FACS-basierter  $NK^{high}$  bzw.  $NK^{low}$  Tumorklassifizierung.** Von 37 Tumoren, die nach ihrem Prozentualen Anteil an NK-Zellen in TIL in  $NK^{high}$  und  $NK^{low}$  Tumore eingeteilt wurden (FACS-basierte (FC)-Tumorklassifizierung), wurde die Transkriptmenge der Lymphozytenmarker NKp46, CD56, Perforin, Granzym B, CD2 und CD3 mittels qRT-PCR (Tc-Marker) bestimmt und auf 18SrRNA normalisiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge dieser Lymphozytenmarker in den  $NK^{high}$  und  $NK^{low}$  Tumoren signifikant unterschied (p-Werte). Jeder Punkt steht für einen Tumor. Die überlagerte Box-Whiskers-Darstellung zeigt den Median und die 25% bzw. 75% Perzentile. Die Whiskers zeigen die Minimal- und Maximalwerte an. Als u.D. (unter der Detektionsgrenze) wurden Tumore eingestuft, deren Ct-Werte der qRT-PCR über 38 lagen, also unterhalb der Nachweisgrenze der Methode.

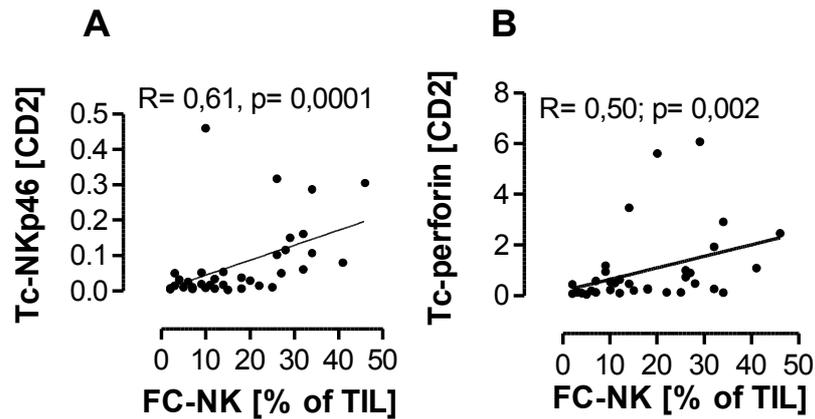
Da die durchflusszytometrische Einteilung in  $NK^{high}/NK^{low}$  Tumore auf dem prozentualen Anteil von NK-Zellen in aus dem Gewebe stammenden Leukozyten basierte, wurde versucht diesen Prozess durch die Normalisierung auf den Lymphozytenmarker CD2 nach zu ahmen. Die Transkriptmengen von NKp46, CD56, Perforin und Granzym B wurden auf CD2 normalisiert. Die Transkriptmenge von NKp46 normalisiert auf CD2 (Tc-NKp46[CD2]) sowie von Perforin (Tc-Perforin[CD2]) unterschieden FC- $NK^{high}$  von FC- $NK^{low}$  Tumore mit hoher Signifikanz (Abb. 4.4.3.2). So war die Transkriptmenge von NKp46 6mal und die von Perforin 4mal höher in den  $NK^{high}$  Tumoren.





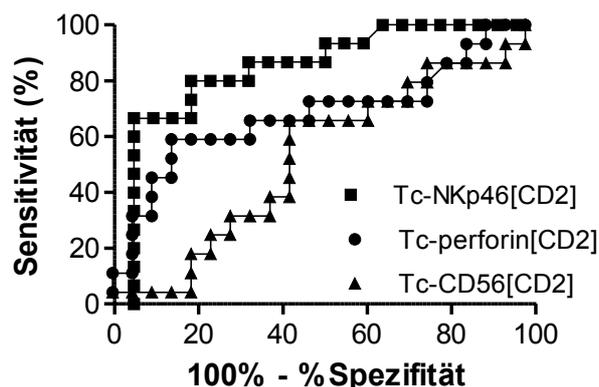
**Abbildung 4.4.3.2: CD2-normalisierte Transkriptmengen der Lymphozytenmarker in RCC-Tumoren mit FACS-basierter NK<sup>high</sup> bzw. NK<sup>low</sup> Tumorklassifizierung.** Von 37 Tumoren, die nach ihrem prozentualen Anteil an NK-Zellen in TIL in NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumore eingeteilt wurden (FC-Tumorklassifizierung), wurde die Transkriptmenge der Lymphozytenmarker NKp46, CD56, Perforin und Granzym B mittels qRT-PCR (Tc-Marker) bestimmt und auf CD2 normalisiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge dieser Lymphozytenmarker in den NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren signifikant unterschied (p-Werte). Jeder Punkt steht für einen Tumor. Die überlagerte Box-Whiskers-Darstellung zeigt den Median und die 25% bzw. 75% Perzentile. Die Whiskers zeigen die Minimal- und Maximalwerte an. Als u.D. (unter der Detektionsgrenze) wurden Tumore eingestuft, deren Ct-Werte der qRT-PCR über 38 lagen, also unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. Der xfache Unterschied in der medianen Transkriptmenge der signifikant unterschiedlichen Tc-Marker ist in blau angegeben.

Die Transkriptmengen an Granzym B und CD56 zeigten auch nach CD2-Normalisierung keine Korrelation mit dem NK-Zellanteil in TIL. Eine Korrelationsanalyse nach Spearman bestätigte, dass die Transkriptmengen von NKp46 und Perforin normalisiert auf CD2 mit dem prozentualen Anteil an NK-Zellen in TIL signifikant positiv korrelierten (Abb. 4.4.2.3).



**Abbildung 4.4.3.3: Korrelationsanalyse der Transkriptmengen von NKp46 und Perforin normalisiert auf CD2 mit dem prozentualen Anteil von NK in TIL.** Die über qRT-PCR bestimmten Transkriptmengen von NKp46 (Tc-NKp46 [CD2]) und Perforin (Tc-Perforin [CD2]) wurden auf CD2 normalisiert. Die Korrelationsanalyse der Transkriptmengen mit dem prozentualen Anteil von NK-Zellen in TIL nach Spearman ergab, dass die Transkriptmenge von NKp46 ( $R = 0,61$ ;  $p = 0,0001$ ) und Perforin ( $R = 0,50$ ;  $p = 0,002$ ) normalisiert auf CD2 signifikant mit dem Anteil von NK-Zellen in TIL korreliert.

Mittels ROC (*receiver operator characteristic*) Analyse wurde geprüft, ob die Differenzierung an Hand der Transkriptmenge von NKp46, CD56 und Perforin ein sinnvolles Mittel zur Unterscheidung von RCC-Tumoren mit hohem und niedrigem NK-Zellanteil ist. Die ermittelten Grenzwerte und Werte der Fläche unter der Kurve (*area underneath the curve*, AUC), die ein Maß für die Stärke der Assoziation sind, zeigten, dass die Transkriptmengen an NKp46 und Perforin brauchbar sind ( $p < 0,05$ ;  $AUC > 0,6$ ), CD56 jedoch nicht. (Alb 4.4.3.4; Tabelle 4.4.3.1). Die ROC-Analyse besagt, dass je höher der Wert der AUC ist desto valider ist die getestete Assoziation.



**Abbildung 4.4.3.4: ROC-Analyse der Quantifizierung des NK-Zellanteils mittels Transkriptmenge von NKp46, CD56 und Perforin.** Die über qRT-PCR bestimmten Transkriptmenge von NKp46, CD56 und Perforin wurden auf CD2 normalisiert. Über eine ROC Analyse wurde ermittelt ob die Transkriptmenge ein sinnvolles Mittel zur Unterscheidung von NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren ist. Es zeigte sich das die Transkriptmenge von NKp46 (Quadrat) mit einer AUC von 0,85 ( $p=0,0002$ ) und Perforin (Kreis) mit einer AUC von 0,70 ( $p=0,03$ ) ein sinnvolles Mittel ist, die Transkriptmenge von CD56 (Dreieck) mit einer AUC von 0,57 ( $p=0,50$ ) nicht. In der graphischen Darstellung ist die Sensitivität der Unterteilung gegen die 100%-Spezifität aufgetragen. Je weiter links oben die Kurve verläuft, desto höher ist die AUC und damit auch die Validität der Unterteilung.

Die hohe Sensitivität von Tc-NKp46[CD2] (Tabelle 4.4.3.1) zeigt, dass dieser Marker am besten dazu geeignet ist, zu bestimmen, ob ein Tumor mit einer Transkriptmenge über dem ROC-Grenzwert wirklich ein NK<sup>high</sup> Tumor ist, während die hohe Spezifität der Tc-Perforin[CD2] mit hoher Genauigkeit einen Tumor mit einer Transkriptmenge unterhalb des ROC-Grenzwerts einem NK<sup>low</sup> Tumor zuordnet (Tabelle 4.4.3.1)

qRT-PCR Marker [Normalisierung]	AUC	p-Wert	Konfidenz -intervall	Grenzwert (ROC)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Tc-NKp46 [CD2]	0,85	0,0002	0,72 – 0,98	0,04	80	82
Tc-CD56 [CD2]	0,57	0,50	0,36 – 0,74	---	---	---
Tc-Perforin [CD2]	0,70	0,03	0,51 – 0,88	0,68	60	86

**Tabelle 4.4.3.1: ROC-Analyse der Quantifizierung des NK-Zellanteils mittels Transkriptmenge von NKp46, CD56 und Perforin.** Aufgeführt sind die AUC-Werte, p-Werte mit Konfidenzintervall, sowie die Grenzwerte mit den zugehörigen Sensitivitäten und Spezifitäten.

Die Anwendung der ROC-Grenzwerte in einer Kontingenzanalyse mittels Fisher's Exact Test ergab gute positive (PPV) und negative prediktive Werte für Tc-NKp46[CD2] und Tc-Perforin[CD2]. Die Werte des relativen Risikos (RR) im 95% Konfidenzintervall sagten aus, dass Gewebe mit einem Tc-NKp46[CD2] oder Tc-Perforin[CD2] über dem ROC-Grenzwert eine 5mal bzw. 3mal höhere Wahrscheinlichkeit haben ein FC-NK<sup>high</sup> Tumor als ein NK<sup>low</sup> Tumor zu sein (Tabelle 4.4.2.2). Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass die Transkriptmenge von NKp46 und Perforin für die Differenzierung gut geeignet sind und eine Transkript-basierte Unterscheidung von Geweben gemäß ihres NK-Zellanteils erlauben, die der FACS-basierten Quantifizierung von NK-Zellen in TIL entspricht.

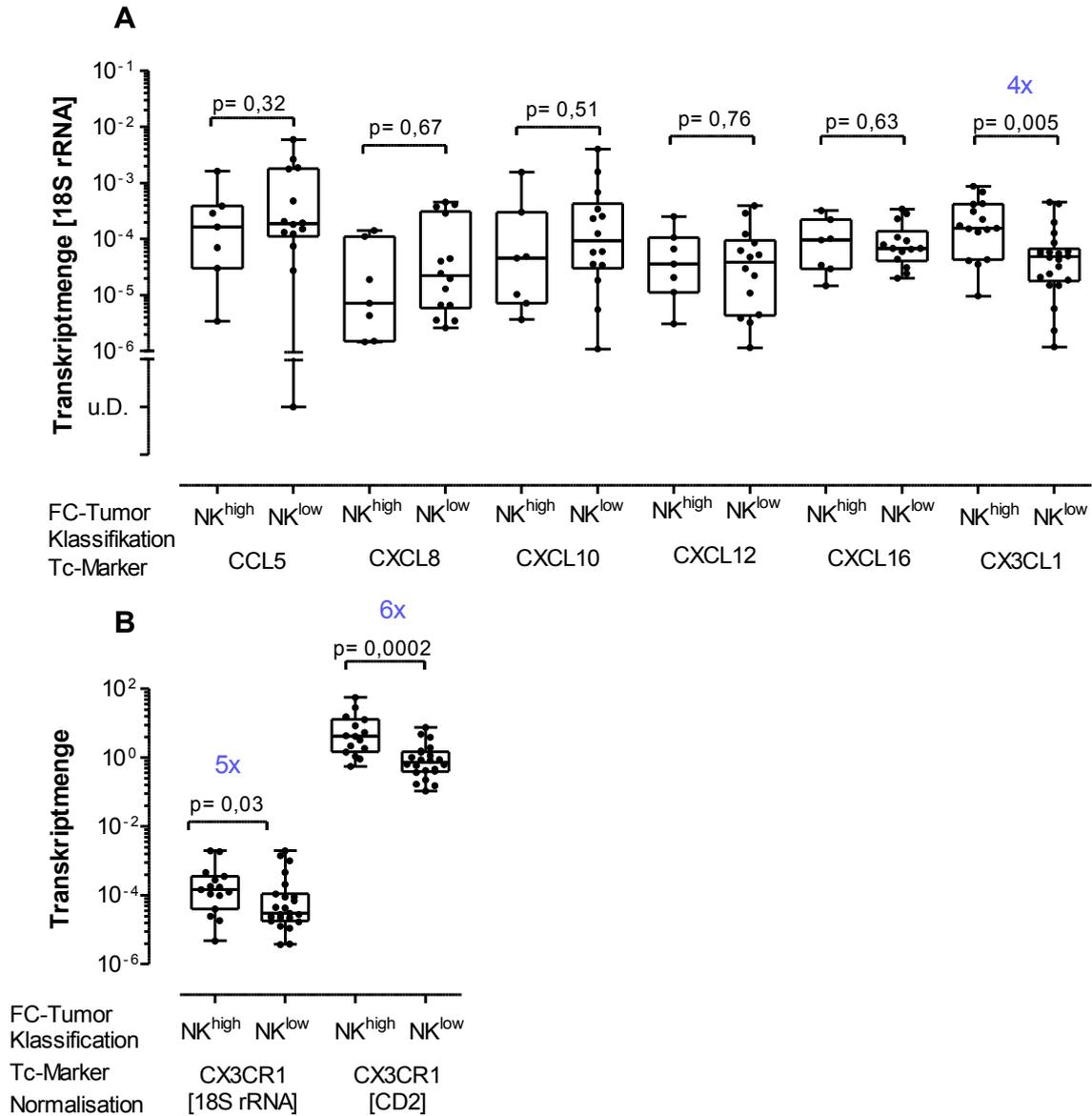
qRT-PCR Marker [Normalisierung]	p-Wert	PPV	NPV	RR [CI 95%]
Tc-NKp46[CD2]	0,0005	0,75	0,86	5,3 [1,8 – 15,5]
Tc-Perforin[CD2]	0,005	0,75	0,76	3,1 [1,4 – 6,8]

**Tabelle 4.4.3.2: Kontingenzanalyse der auf CD2 normalisierten Transkriptmenge von NKp46 (Tc-NKp46[CD2]) und Perforin (Tc-Perforin[CD2]).** Aufgeführt sind der p-Wert, der PPV, NPV und RR der Kontingenzanalyse. PPV bzw. NPV sind der positive bzw. negative prediktive Wert. RR bezeichnet das relative Risiko mit dem dazugehörigen 95% Konfidenzintervall (CI) in eckigen Klammern.

#### 4.4.4 Diskriminierung von NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren mittels der Transkriptmenge von Chemokinen

Da Chemokine die Einwanderung der Lymphozyten ins Gewebe organisieren, könnten sie mitverantwortlich sein für die Unterschiede in der Zusammensetzung der gewebeständigen Lymphozytenpopulation. Abhängig von ihrer Rezeptorexpression migrieren NK-Zellen auf Signal verschiedenster Chemokine wie CCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL16 und CX3CL1 [6]. Die Transkriptmenge dieser Chemokine wurde in den RCC-Tumoren untersucht. Die über qRT-PCR bestimmten Transkriptmengen wurden auf 18SrRNA normalisiert. Da Chemokine von einer Vielzahl von Zelltypen einschließlich Tumorzellen, Lymphozyten und myeloiden Zellen sezerniert werden war eine Normalisierung auf CD2 nicht angebracht.

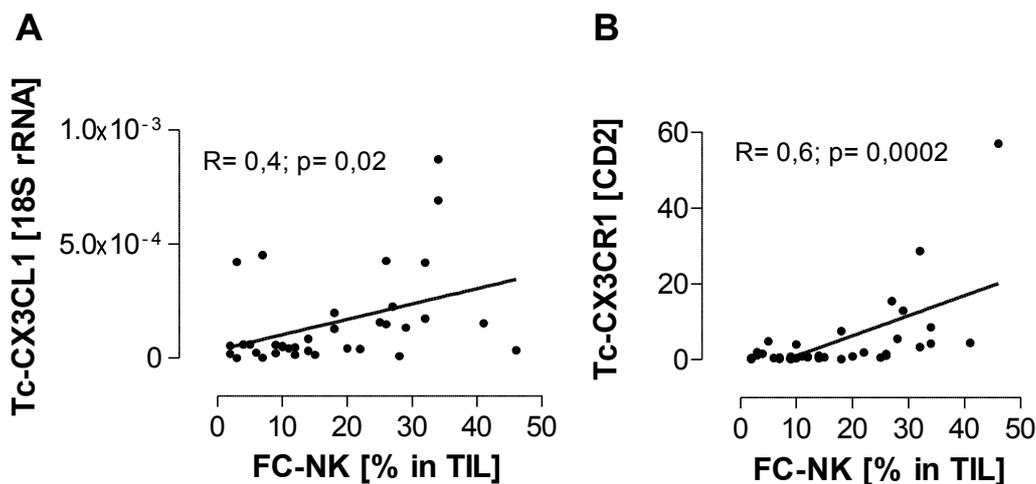




**Abbildung 4.4.4.1: Transkriptmengen der Chemokine in RCC-Tumoren mit FACS-basierter NK<sup>high</sup> bzw. NK<sup>low</sup> Tumorklassifizierung.** **A)** In Tumoren, die nach ihrem Prozentualen Anteil an NK-Zellen in TIL in NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren eingeteilt wurden (FC-Tumorklassifizierung), wurde die Transkriptmengen der Chemokine CCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL16 (n=27) und CX3CL1 (n=37) mittels qRT-PCR (Tc-Marker) bestimmt und auf 18SrRNA normalisiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge dieser Chemokine in den NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren signifikant unterschied (p-Werte). Jeder Punkt steht für einen Tumor. Die überlagerte Box-Whiskers-Darstellung zeigt den Median und die 25% bzw. 75% Perzentile. Die Whiskers zeigen die Minimal- und Maximalwerte an. Als u.D. (unter der Detektionsgrenze) wurden Tumore eingestuft, deren Ct-Werte der qRT-PCR über 38 lagen, also unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. Der xfache Unterschied in der medianen Transkriptmenge der signifikant unterschiedlichen Tc-Marker ist in blau angegeben. **B)** Von 37 Tumoren, die nach ihrem prozentualen Anteil an NK-Zellen in TIL in NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren eingeteilt wurden (FC-Tumorklassifizierung), wurde die Transkriptmenge des Chemokinrezeptors CX3CR1 mittels qRT-PCR (TC-Marker) bestimmt und auf 18SrRNA und auf CD2 normalisiert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge in den NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren signifikant unterschied (p-Werte). Der xfache Unterschied in der medianen Transkriptmenge der signifikant unterschiedlichen Tc-Marker ist in blau angegeben.

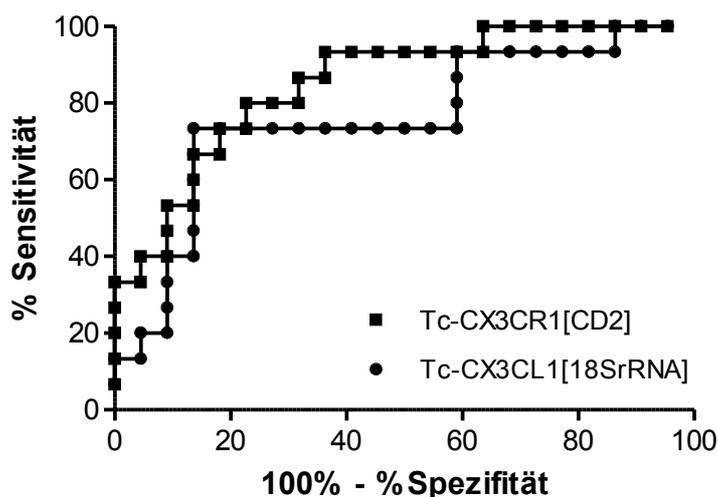
Von den analysierten Chemokinen war nur die Transkriptmenge von CX3CL1 signifikant unterschiedlich in den NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren, wobei die Tc-CX3CL1[18SrRNA] in den NK<sup>high</sup> 4mal höher war als in den NK<sup>low</sup> Tumoren. Aufgrund der Differenzierung von NK<sup>high</sup>/NK<sup>low</sup> anhand der CX3CL1-Transkriptmenge wurde auch die Transkriptmenge des dazugehörige Rezeptor CX3CR1 untersucht (Abb. 4.4.3.1 B). Die Transkriptmenge von CX3CR1 normalisiert auf 18SrRNA war 5mal höher in den NK<sup>high</sup> Tumoren als in den NK<sup>low</sup> Tumoren (p=0,03). Die Transkriptmenge von CX3CR1 normalisiert auf CD2 war in NK<sup>high</sup> Tumoren 6mal höher als in NK<sup>low</sup> Tumoren (p=0,0002).

Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab, dass die Transkriptmenge von CX3CL1 normalisiert auf 18SrRNA (Tc-CX3CL1 [18SrRNA]) (R=0,4; p=0,02) und die Transkriptmenge von CX3CR1 normalisiert auf CD2 (Tc-CX3CR1 [CD2]) (R=0,6; p=0,0002) positiv mit dem prozentualen Anteil von NK-Zellen in TIL korrelierten (Abb. 4.4.4.2).



**Abbildung 4.4.4.2: Korrelationsanalyse der Transkriptmengen von CX3CL1 [18SrRNA] und CX3CR1 [CD2] mit dem prozentualen Anteil von NK in TIL.** Die über qRT-PCR bestimmten Transkriptmengen von CX3CL1 (Tc-NKp46 [18SrRNA]) und Perforin (Tc-CX3CR1 [CD2]) wurden auf 18SrRNA bzw. CD2 normalisiert. Die Korrelationsanalyse der Transkriptmengen mit dem prozentualen Anteil von NK-Zellen in TIL nach Spearman ergab, dass die Transkriptmenge von CX3CL1 (R= 0,40;p=0,02) und CX3CR1 (R=0,60; p=0,0002) normalisiert auf 18SrRNA bzw. CD2 signifikant mit dem Anteil von NK-Zellen in TIL korreliert.

Die ROC-Analyse der Tc-CX3CL1[18SrRNA] und Tc-CX3CR1[CD2] zeigte eine hohe Güte mit AUC-Werten von 0,76 und 0,85 (Tabelle 4.4.3.1). Dies wird auch in der graphischen Darstellung der beiden Marker deutlich (Abb. 4.4.4.3).



**Abbildung 4.4.4.3: ROC-Analyse der Quantifizierung des NK-Zellanteils mittels Transkriptmenge von CX3CL1 und CX3CR1.** Die über qRT-PCR bestimmten Transkriptmengen von CX3CL1 und CX3CR1 wurden auf 18SrRNA bzw. CD2 normalisiert. Über eine ROC Analyse wurde ermittelt, ob die Transkriptmenge ein sinnvolles Mittel zur Unterscheidung von NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren ist. Es zeigte sich, dass die Transkriptmenge von CX3CL1 [18SrRNA] (Kreis) mit einer AUC von 0,76 (p=0,005) und CX3CR1 [CD2] (Quadrat) mit einer AUC von 0,85 (p=0,0002) ein sinnvolles Mittel sind. In der graphischen Darstellung ist die Sensitivität der Unterteilung gegen die 100%-Spezifität aufgetragen. Je weiter links oben die Kurve verläuft, desto höher ist die AUC und damit auch die Validität der Unterteilung.

Die Sensitivität und Spezifität der ROC-Parameter für die Tc-CX3CL1[18SrRNA] und Tc-CX3CR1[CD2] deuten darauf hin, dass Tc-CX3CL1[18SrRNA] ein besserer Prediktor von NK<sup>low</sup>, Tc-CX3CR1[CD2] hingegen von NK<sup>high</sup>-Tumoren ist (Tabelle 4.4.4.1).

qRT-PCR Marker [Normalisierung]	AUC	p-Wert	CI	Grenzwert	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
Tc-CX3CL1[18SrRNA]	0,76	0,005	0,59 – 0,92	0,000131	73	86
Tc-CX3CR1[18SrRNA]	0,72	0,03	0,54 – 0,89	0,095	73	77
Tc-CX3CR1[CD2]	0,85	0,0002	0,73 – 0,97	1,46	80	77

**Tabelle 4.4.4.1: ROC-Analyse der Quantifizierung des NK-Zellanteils mittels Transkriptmenge von CX3CL1 und CX3CR1.** Aufgeführt sind die AUC-Werte, p-Werte mit Konfidenzintervall, sowie die über ROC-Analyse ermittelten Grenzwerte mit den zugehörigen Sensitivitäten und Spezifitäten der ROC Analyse der Einteilung mittels der Transkriptmengen von CX3CL1 (Tc-CX3CL1 [18SrRNA]), CX3CR1 (Tc-CX3CR1 [18SrRNA]) und CX3CR1 (Tc-CX3CR1 [CD2]).

Die Kontingenzanalyse ergab, dass die Einteilung basierend auf den ROC-Grenzwerten der Tc-CX3CL1<sup>high</sup>/CX3CL1<sup>low</sup> bzw. die Tc-CX3CR1<sup>high</sup>/CX3CR1<sup>low</sup> Gruppen einen hohen positiven und negativen prediktive Wert für die FACS-basierte NK<sup>high</sup>/NK<sup>low</sup> Gruppen Einteilung hatte. (Tabelle 4.4.4.2). Daher kann man davon ausgehen, dass die Transkriptmengen von CX3CL1[18SrRNA] und CX3CR1[CD2] als Mittel zu Bestimmung des NK-Anteils in den Tumoren geeignet sind.

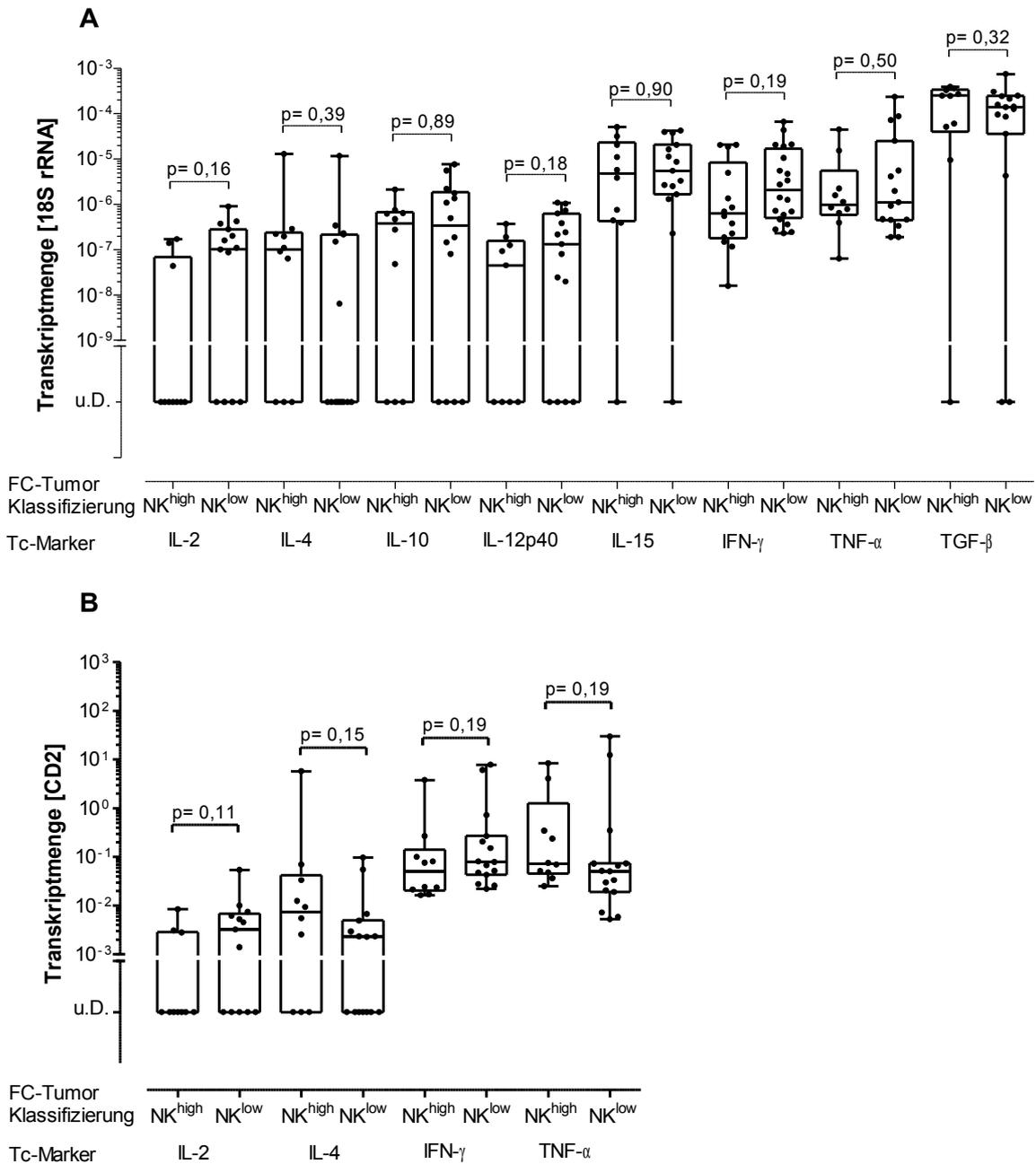
qRT-PCR Marker [Normalisierung]	p-Wert	PPV	NPV	RR [CI 95%]
Tc-CX3CL1 [18SrRNA]	0,0004	0,79	0,83	4,5 [1,8 – 11,5]
Tc-CX3CL1 [18SrRNA]	0,01	0,69	0,81	3,6 [1,4 – 9,3]
Tc-CX3CR1 [CD2]	0,001	0,71	0,85	4,7 [1,6 – 14]

**Tabelle 4.4.4.2: Kontingenzanalyse der Transkriptmenge von CX3CL1 (Tc-CX3CL1 [18SrRNA]), CX3CR1 (Tc-CX3CR1 [18SrRNA]) und CX3CR1 (Tc-CX3CR1 [CD2]).** Aufgeführt sind der p-Wert, der PPV, NPV und RR der Kontingenzanalyse. PPV bzw. NPV sind der positive bzw. negative prediktive Wert. RR bezeichnet das relative Risiko mit dem dazugehörigen 95% Konfidenzintervall (CI) in eckigen Klammern.

#### 4.4.5 Diskriminierung von NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren mittels der Transkriptmenge von Zytokinen

Zytokine sind ein Teil des Gewebemilieus und könnten die Anzahl der NK-Zellen im Gewebe durch Förderung des Überlebens oder der Proliferation der Lymphozyten innerhalb des Gewebes beeinflussen. Besonders IL-2, IL-12 und IL-15 werden mit NK-Zellaktivierung und Proliferation assoziiert, während IL-10 und TGF- $\beta$  zu NK-Zellinhibition und Apoptose führen können [5]. TNF- $\alpha$  allein oder in Kombination mit IL-1 und IFN- $\gamma$  sind dafür bekannt CX3CL1 zu regulieren und könnten deswegen die Transkriptmenge in RCC Tumoren beeinflussen [28;65]. Die Analyse der Transkriptmengen dieser Zytokine normalisiert auf 18SrRNA ergab das die Transkriptmenge der Zytokine nicht signifikant NK<sup>high</sup> von NK<sup>low</sup> Tumoren unterschieden (4.4.5.1 A). Einige der Zytokine wie IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  werden hauptsächlich von Leukozyten gebildet [1]. Daher schien es sinnvoll die Transkriptmengen dieser Zytokine auf CD2 zu normalisieren. Auch die Normalisierung auf CD2 führte zur keiner Differenzierung zwischen NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren Abb. 4.4.5.1 B)





**Abbildung 4.4.5.1: Transkriptmengen verschiedener Zytokine in RCC-Tumoren mit FACS-basierter NK<sup>high</sup> bzw. NK<sup>low</sup> Tumorklassifizierung.** Von 27 RCC-Tumoren, die nach ihrem prozentualen Gehalt an NK-Zellen in NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren eingeteilt wurden (FC-Tumorklassifizierung), wurde die Transkriptmenge der Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  mittels qRT-PCR (Tc-Marker) bestimmt. Mithilfe des Mann-Whitney-U Test wurde geprüft, ob sich die Transkriptmenge dieser Zytokine in den NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren signifikant unterschied (p-Werte). Jeder Punkt steht für einen Tumor. Die überlagerte Box-Whiskers-Darstellung zeigt den Median und die 25% bzw. 75% Perzentile. Die Whiskers zeigen die Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Transkriptmenge an. Als u.D. (unter Detektionsgrenze) wurden die Tumoren eingestuft, deren Ct-Werte der PCR über 38 lagen, also unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. **A)** Transkriptmenge der Zytokine normalisiert auf 18SrRNA. **B)** Transkriptmenge der überwiegend von Leukozyten exprimierten Zytokine (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) normalisiert auf CD2.

#### 4.4.6 Multivariate Datenanalyse

Nachdem die Marker einzeln über univariate statistische Methoden untersucht wurden, wurde über multivariate Datenanalyse überprüft, ob die Kombination der einzelnen Marker die Klassifizierung in NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren verbessert und welcher der Marker, NKp46, Perforin, CX3CL1 oder CX3CR1, den stärksten Einfluss auf eine multivariate Klassifikation hat. Als Methode wurden artifizielle neuronale Netzwerke (ANN) verwendet [66]. Die Analyse wurde von Dr. A. Buchner (Labor für Tumorummunologie, LTI, LMU München) durchgeführt. Es wurden 1000 Netzwerke trainiert und die fünf besten davon heraus gefiltert. Diese ordneten zwischen 26 und 32 der 37 Fälle (70% - 86%) korrekt den FACS-basierten NK-Gruppe zu. Die AUC-Werte der ROC-Analyse lagen zwischen 0,89 und 0,93 (Tabelle 4.4.6.1) und damit über den Werten der Einzelanalysen, die zwischen 0,70 und 0,85 (Tabelle 4.4.3.1 und 4.4.4.1) lagen. Dies deutet daraufhin, dass die Kombination der Marker die Klassifizierung verbessert.

Netzwerk	Korrekt zugeordnete Proben		AUC	Güte [%]		
	[n]	[%]		Trainingslauf	Testlauf	Validierung
1	26	70	0,90	67	100	60
2	29	78	0,90	74	100	80
3	31	84	0,89	81	100	80
4	32	86	0,92	85	100	80
5	29	78	0,93	74	100	80

**Tabelle 4.4.6.1: Multivariate Analyse der NK<sup>high</sup>/NK<sup>low</sup> Einteilung mittels artifizierlicher neuronaler Netzwerke (ANN).** Aufgeführt sind die besten 5 Netzwerke von 1000. Zu jedem Netzwerk ist die Anzahl und der prozentuale Anteil der korrekt zugeordneten Proben, der AUC-Wert sowie die prozentuale Güte des Trainingslaufs, des Testlaufs und der Validierung angegeben.

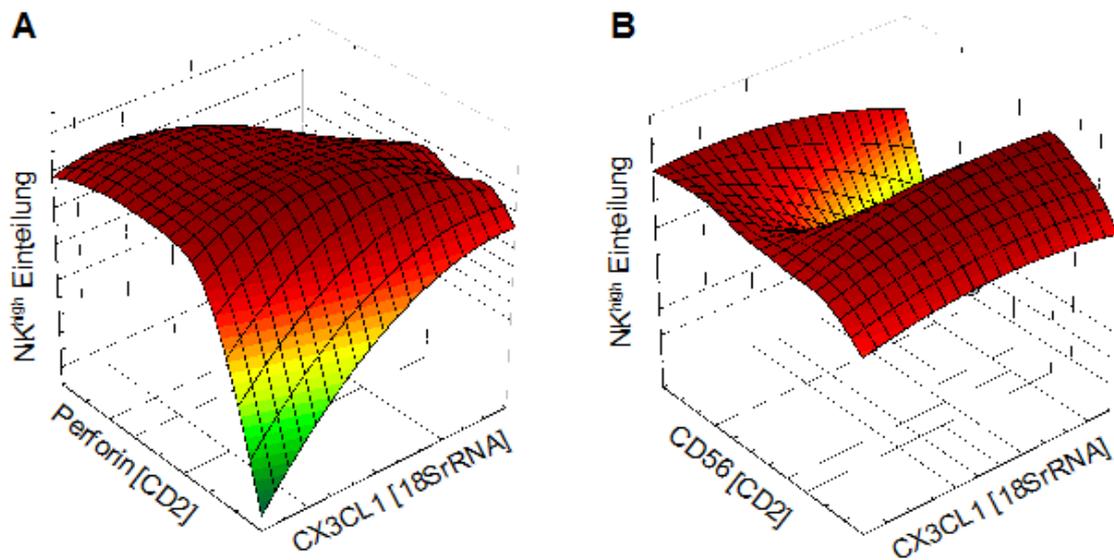
Um die Bedeutung der einzelnen Marker für die Netzwerkentscheidung zu erkennen, wurde eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Ein Sensitivitätsindex über 1,0 bedeutet, dass das Ergebnis der Klassifizierung verschlechtert würde, wenn man diese Variable weglassen würde. Ein Wert von 1,0 bedeutet, dass diese Variable keinen Einfluss auf die Entscheidung des Netzwerks hat. Die Transkriptmenge von CX3CL1 [18SrRNA], Perforin [CD2], CX3CR1 [CD2] und NKp46 [CD2] hatten einen durchschnittlichen Sensitivitätsindex von 1,27, 1,13, 1,09 und 1,06. Sie waren für die Klassifizierung durch das Netzwerk von Bedeutung, wobei Transkriptmengen von CX3CL1[18SrRNA] und Perforin[CD2] die höchste Bedeutung hatten. Im Vergleich dazu hatten die Transkriptmengen von CD2 [18SrRNA] und CD56 [CD2] einen Sensitivitätsindex von 1,0, waren also für die Netzwerkentscheidung ohne Bedeutung (Tabelle 4.4.5.2).

qRT-PCR Marker [Normalisierung]	Sensitivitätsindex von Netzwerk 5
Tc-NKp46 [CD2]	1,06
Tc-Perforin [CD2]	1,13
Tc-CX3CL1 [18SrRNA]	1,27
Tc-CX3CR1 [CD2]	1,09
Tc-CD2 [18SrRNA]	1,00
Tc-CD56 [CD2]	1,00

**Tabelle 4.4.6.2: Analyse des Sensitivitätsindex der artifiziieller neuronaler Netzwerke ANN.** Exemplarisch sind die Werte der Sensitivitätsanalyse der Transkriptmengen von NKp46[CD2], Perforin [CD2], CX3CL1 [18SrRNA], CX3CR1 [18SrRNA], CD2 [18SrRNA] und CD56 [CD2] des Netzwerks 5 aus den fünf besten der 1000 analysierten Netzwerke dargestellt.

In Abbildung 4.4.6.1 A ist der Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge zweier Marker, die die Netzwerkentscheidung beeinflussen (Tc-Perforin [CD2] und Tc-CX3CL1 [18SrRNA]), und dem prozentualen NK-Zellanteil in TIL graphisch dargestellt. Abbildung 4.4.6.1 B zeigt graphisch den Zusammenhang zwischen prozentualen NK-Zellanteil in TIL und der Transkriptmenge eines Markers (CD56 [CD2]), der die Netzwerkentscheidung nicht beeinflusst, und der Transkriptmenge eines Markers (CX3CL1 [18SrRNA]), der die Netzwerkentscheidung beeinflusst. Die Höhe des Z-Werts einer Kombination gibt an, wie das Netzwerk eine Zuordnung des Gewebes durchführt. Je höher dieser Z-Wert ist, desto eher wird ein Gewebe der NK<sup>high</sup> Gruppe zugeordnet.

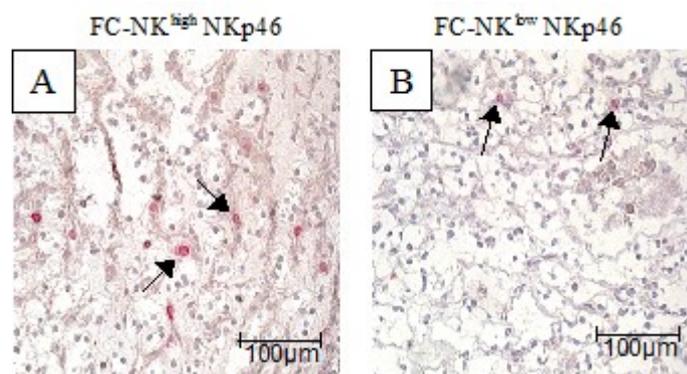




**Abbildung 4.4.6.1: Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge von Perforin und CX3CL1 bzw. CD56 und CX3CL1 und der Netzwerkeinteilung in die NK<sup>high</sup> Gruppe.** Abgebildetsind zwei *response Surfaces* des Netzwerks 5. Unter **A)** ist der Einfluss der Transkriptmenge von Perforin [CD2] und CX3CL1 [18SrRNA] auf die Netzwerkeinteilung in NK<sup>high</sup>/NK<sup>low</sup> Gruppen dargestellt. **B)** Einfluss von CD56[CD2] und CX3CL1[18SrRNA] auf die Netzwerkeinteilung in die NK<sup>high</sup>/NK<sup>low</sup> Gruppen. Je grüner die *response surface* gefärbt ist desto geringer ist der Z-wert auf der Z-Achse. Dies spricht für die Zugehörigkeit zur NK<sup>low</sup> Gruppe

#### 4.5 Immunhistologische Quantifizierung des Immuninfiltrates in Nierenzellkarzinomgewebe

Die absolute Anzahl an Zellen mit Markerexpression CD2, CD3, NKp46 und Perforin wurde in RCC-Gewebe mittels immunhistochemischer Färbung (APAAP-Methode) quantifiziert. Als Beispiel ist die Färbung mit dem Antikörper gegen NKp46 gezeigt. (Abb. 4.5.1).



**Abbildung 4.5.1: Immunhistologische Färbung von NKp46 in RCC-Geweben.** NKp46 Färbung wurde nach der APAAP- Methode immunhistochemisch in einem NK<sup>high</sup> (A) und NK<sup>low</sup> (B) Tumor gefärbt. Bei 400fach Vergrößerung wurden die Gewebe unter dem Mikroskop untersucht und für jeden Tumor die positiven Zellen in 10 nicht überlappende HPF (*high power fields*) ausgezählt. NKp46 positive Zellen sind rot gefärbt und Zellkerne blau. Die Pfeile zeigen positiv gefärbte Zellen im Tumorgewebe an. Der Maßstab entspricht 100µm.

Die Auszählung von mindestens 10 Gesichtsfeldern bei einer Vergrößerung von 400x ergab, dass die Gruppe der NK<sup>high</sup> Tumoren gleichviel CD2, NKp46 und Perforin, aber signifikant ( $p=0,01$ ) weniger CD3 positive Zellen wie NK<sup>low</sup> Tumore hatten (Tabelle 4.5.1). Eine „Normalisierung“ der NKp46+ Zellen auf die Gesamtzahl des Leukozyteninfiltrats, berechnet als Verhältnis von NKp46+ Zellen zu CD2+ Zellen, zeigte ebenfalls kein Unterschied zwischen den durchflusszytometrisch eingeteilten NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren. Einschränkend ist hierzu anzumerken, dass die Fallzahl der histologisch untersuchten Gewebe relativ gering ist (Tabelle 4.5.1)

Marker [Nachweisverfahren]	Gruppe	Median [Min.- Max.]	Fallzahl [n]	p-Wert
CD2 [IHC]	FC-NK <sup>high</sup>	37 [18– 56,5]	6	0,62
	FC-NK <sup>low</sup>	32 [7 – 83,5]	8	
CD3 [IHC]	FC-NK <sup>high</sup>	37 [6 - 54]	9	0,01
	FC-NK <sup>low</sup>	72,5 [19 – 199,5]	14	
NKp46 [IHC]	FC-NK <sup>high</sup>	9,5 [1 - 20]	6	0,36
	FC-NK <sup>low</sup>	6,5 [1 - 10]	8	
Perforin [IHC]	FC-NK <sup>high</sup>	5,8 [2 – 17,5]	10	0,46
	FC-NK <sup>low</sup>	4 [0 - 59]	16	
NKp46/CD2 [IHC]	FC-NK <sup>high</sup>	0,19 [0,2– 0,97]	6	0,46
	FC-NK <sup>low</sup>	0,2 [0,02 – 1,1]	8	
Perforin/CD2 [IHC]	FC-NK <sup>high</sup>	0,2 [0,1 – 0,32]	4	0,11
	FC-NK <sup>low</sup>	0,1 [0,06 – 0,17]	5	

**Tabelle 4.5.1: Absolute Quantifizierung markerpositiver Zellen in RCC-Geweben mittels immunhistochemischer Untersuchungen in Relation zur FACS-basierten Quantifizierung des prozentualen NK-Zellanteils in TIL isoliert aus RCC-Geweben.** Die absolute Anzahl der CD2, CD3, NKp46 und Perforin positiven Zellen in RCC-Geweben (Fallzahl [n] für jeden Marker angegeben) wurde mittels immunhistochemischer Färbung nach der APAAP-Methode bestimmt, in dem die positiv gefärbten Zellen unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung in 10 nicht überlappenden HPFs (*high power fields*) gezählt und der Median ermittelt wurde. Aufgeführt ist der Median mit der Streubreite der gefärbten Tumoren. Zur Bestimmung des Verhältnis von NKp46 bzw. Perforin positiven Zellen zu CD2 positiven Zellen wurde die mediane Anzahl an NKp46 bzw. Perforin positiven Zellen jedes einzelnen Tumors ins Verhältnis zur Anzahl der CD2 positiven Zellen des jeweiligen Tumors gesetzt. Daraus wurde der Median pro Gruppe und die Streubreite der NKp46/CD2 bzw. Perforin/CD2 Verhältnisse bestimmt. Der p-Wert, ermittelt über Mann-Whitney-U Test, gibt an ob sich NK<sup>high</sup> Tumor in der absoluten Anzahl diese Markers signifikant von NK<sup>low</sup> Tumoren unterscheidet.

Die Zahlenwerte zeigten, dass NKp46 offensichtlich auf Proteinebene und im immunhistochemischen Nachweis nicht geeignet ist, den Anteil an NK-Zellen im Lymphozyteninfiltrat von RCC-Gewebe korrekt wiederzugeben. Mögliche Erklärungen sind die geringe Nachweisgrenze der immunhistochemischen Färbung zusammen mit der relativ geringen Expressionsdichte des NKp46-Proteins auf der Zelloberfläche der NK-Zellen und/oder die geringen Affinität des gegen NKp46 gerichteten Antikörpers. Die durchflusszytometrischen Analyse, die eine höhere Sensitivität im Nachweis von Proteinen hat, zeigte, dass die NKp46-Färbung von NK-Zellen in PBMCs eine deutlich geringere mediane Fluoreszenz (MFI) aufweist, als die des Markers CD56 (MFI)

Die Korrelationsanalyse nach Spearman zwischen Transkriptmenge bzw. prozentualen Anteil an NK-Zellen in TIL und der absoluten Anzahl an positiven Zellen ergab eine positive Korrelation des FACS-basierten NK-Zellanteils mit der absoluten Anzahl an NKp46<sup>+</sup> Zellen (R=0,56;p=0,04). Des weiteren zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem NK-Anteil

in TIL und der Anzahl an CD3<sup>+</sup> Zellen (Tabelle 4.5.2). Die absolute Transkriptmenge an NKp46, das heißt die Transkriptmenge normalisiert auf 18SrRNA (Tc-NKp46[18SrRNA]), korrelierte nicht mit der absoluten Anzahl an NKp46<sup>+</sup>-Zellen und auch die relative Transkriptmenge (Tc-NKp46[CD2]) korrelierte nicht mit der Anzahl an NKp46<sup>+</sup>-Zellen im Verhältnis zu CD2<sup>+</sup>-Zellen.

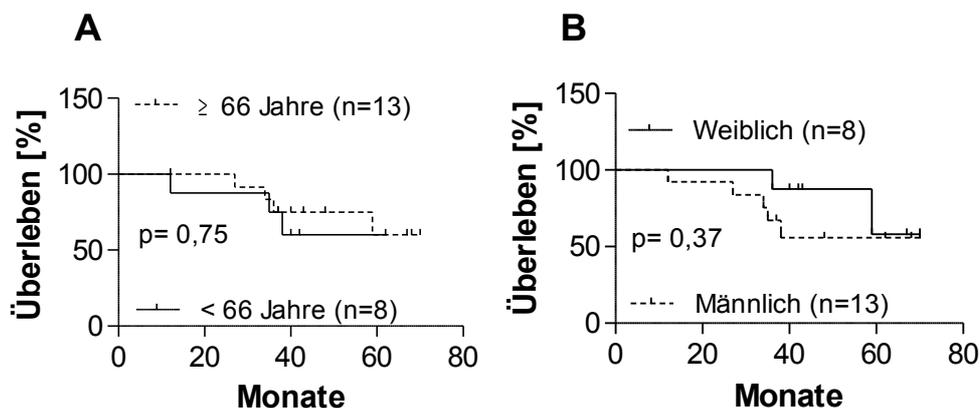
Korrelation	Spearman Koeffizient (R)	p-Wert
FC-NK[%TIL] mit IHC-NKp46	0,56	0,04
FC-NK[%TIL] mit IHC-CD3	-0,57	0,004
FC-NK[%TIL] mit IHC-CD2	0,003	0,99
Tc-NKp46 [18SrRNA] mit IHC-NKp46	0,01	0,96
Tc-NKp46 [CD2] mit IHC-NKp46/CD2	0,50	0,08

**Tabelle 4.5.2: Spearman Korrelationsanalyse zwischen Transkriptmenge bzw. prozentualem Anteil an NK-Zellen in TIL und der absoluten Anzahl an positiven Zellen.** Über Korrelationsanalyse nach Spearman wurde berechnet, ob der prozentuale Anteil an NK-Zellen in TIL mit der absoluten Anzahl an CD2, CD3, NKp46. Weiterhin die Korrelation zwischen der Transkriptmenge von NKp46 [18SrRNA] und der absoluten Anzahl an NKp46 positiven Zellen und die Korrelation zwischen der Transkriptmenge von NKp46 [CD2] und dem Verhältnis von NKp46 zu CD2 positiven Zellen. Angegeben ist jeweils der Korrelationskoeffizient R und der p-Wert für die Korrelation.

#### 4.6 Zusammenhang zwischen dem prozentualen Gehalt an NK-Zellen im Lymphozyteninfiltrat bzw. dem molekularen Profil und Überleben von RCC-Patienten

##### 4.6.1 Einfluss von klinischen und pathologischen Parametern auf das Überleben von RCC-Patienten

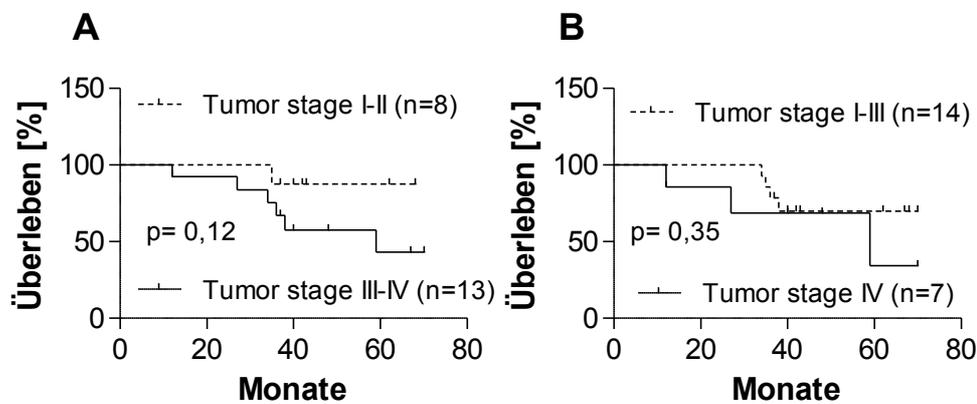
In vielen Malignitäten haben klinische und pathologische Parameter wie Geschlecht, Alter und Tumorstadium einen Einfluss auf das Überleben der Patienten. Mit 21 Patienten, deren *Follow-Up* Daten zur Verfügung standen, wurde der Einfluss dieser Parameter auf das Überleben untersucht. Ein Einfluss des TNM Status auf das Überleben konnte wegen der geringen Datenmenge nicht untersucht werden. Die Überlebensanalyse wurde mittels des Log-Rang (Mantel-Cox) Test durchgeführt und als Kaplan-Meier Kurve graphisch dargestellt. Es konnte kein Einfluss von Alter und Geschlecht auf das Überleben der Patienten festgestellt werden (Abb. 4.6.1.1). Die Patienten wurden dabei anhand des medianen Alters des untersuchten Patientenkollektivs (66 Jahre) in zwei Gruppen eingeteilt.



**Abbildung 4.6.1.1:** Kaplan-Meier-Darstellung des Einflusses von Alter (A) und Geschlecht (B) auf das Überleben der RCC-Patienten. A) Patienten, die das mediane Alter von 66 Jahren erreicht hatten oder älter waren (n=13) gegen Patienten, deren Alter unter dem medianen Alter lag (n=8). Die Berechnungen basieren auf dem Log-Rang (Mantel-Cox) Test.

Nach UICC werden klarzellige Nierenzellkarzinome in vier Tumorstadien (I-IV) eingeordnet. Für die Überlebensanalyse wurden einmal die Stadien I und II gegen die Stadien III und IV

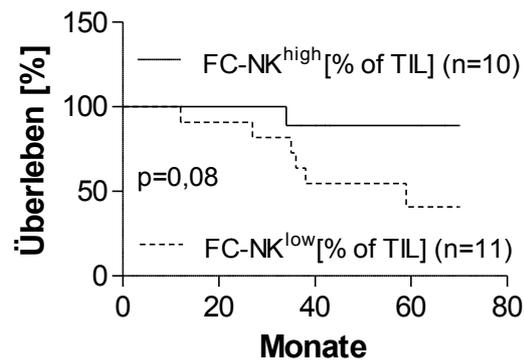
verglichen, außerdem wurden die Stadien I, II und III mit dem Stadium IV verglichen. Keiner der beiden Vergleiche zeigte einen Unterschied im Überleben auf.



**Abbildung 4.6.1.2:** Kaplan-Meier-Darstellung des Einflusses von Tumorstadium auf das Überleben der RCC Patienten (n=21). A) Tumorstadium I-II (n=8) gegen Tumorstadium III-IV (n=13). B) Tumorstadium I-III (n=14) gegen IV (n=7). Die Berechnungen basieren auf dem Log-Rang (Mantel-Cox) Test.

#### 4.6.2 Einfluss des prozentualen NK-Zellgehalts am Lymphozyteninfiltrat auf das Überleben von RCC-Patienten

Der prozentuale Anteil an NK-Zellen in aus Tumorgewebe isolierten TIL war mittels Durchflusszytometrie ermittelt worden. Die NK-Zellen wurden hierbei als CD3 negative CD56 positive Zellen ermittelt. Die Tumoren wurden nach ihrem prozentualen Anteil an NK-Zellen in  $NK^{high}$  ( $\geq 20\%$  NK in TIL) und  $NK^{low}$  ( $< 20\%$  NK in TIL) eingeteilt. Die Patienten wurden nach dieser Einteilung stratifiziert und das Überleben in diesen beiden Gruppen verglichen (Abb. 4.6.2.1). Es zeigte sich, dass das Überleben in der  $NK^{high}$  Gruppe zwar länger war, aber der Unterschied nicht das Signifikanzniveau erreichte ( $p=0,08$ ).



**Abbildung 4.6.2.1:** Kaplan-Meier Darstellung des Einflusses des unterschiedlichen prozentualen Anteils an NK-Zellen in aus Gewebe isolierten TIL. Das prozentuale Überleben der Patienten der FC-NK<sup>high</sup>-Gruppe (n=10) wurde mit dem der FC-NK<sup>low</sup>-Gruppe (n=11) verglichen. Der Unterschied im Überleben erreichte nicht das Signifikanzniveau (p=0,08). Die Berechnung basierte auf dem Log-Rang (Mantel-Cox) Test.

#### 4.6.3 Einfluss des molekularen Profils auf das Überleben der RCC-Patienten

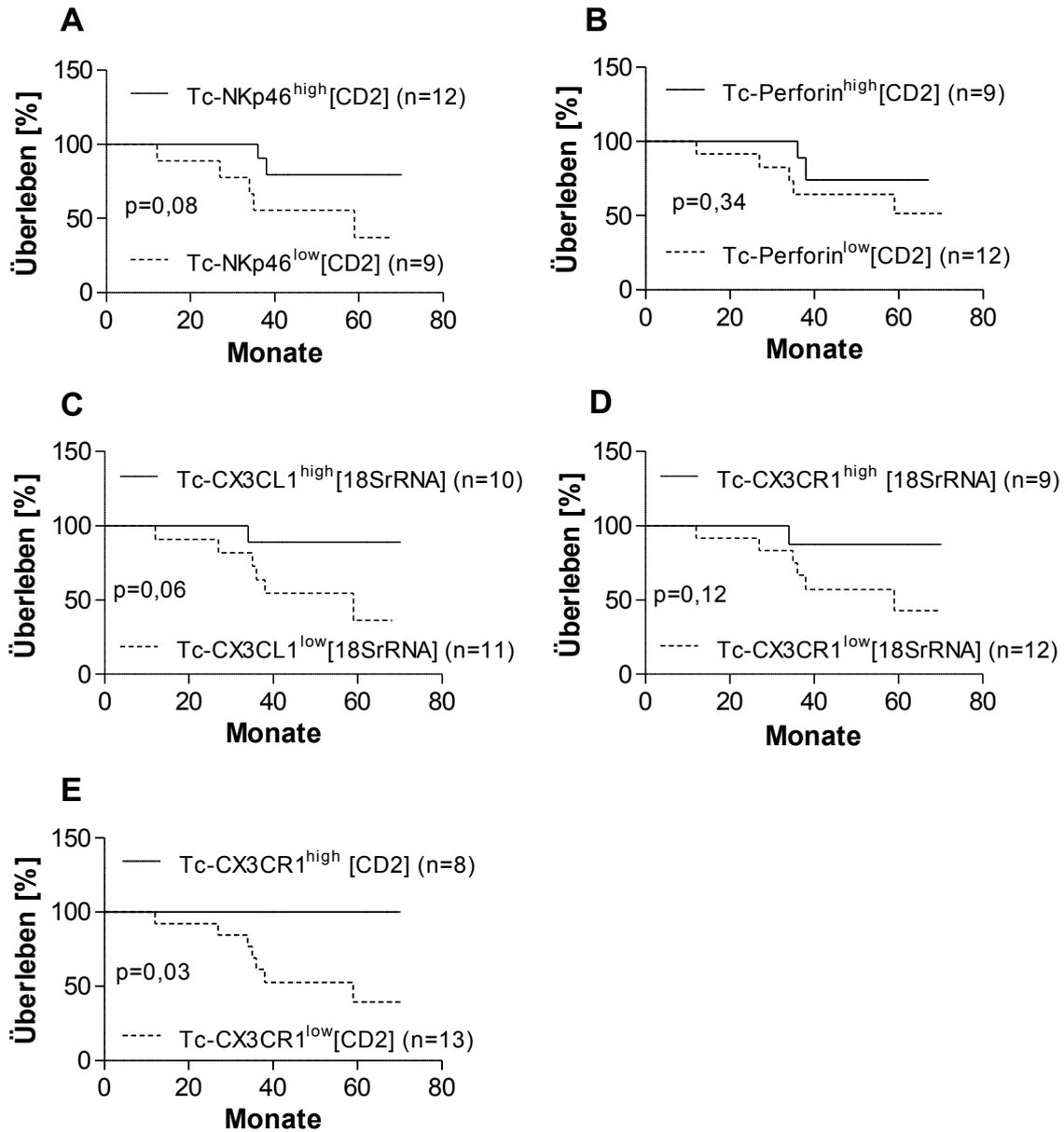
##### 4.6.3.1 Einteilung der Patienten nach dem Medianen der Transkriptmenge

Die RCC-Patienten wurden entsprechend der Transkriptmenge in den Tumoren in eine Gruppe mit Transkriptmengen über oder gleich dem medianen Wert aller Tumoren und in eine Gruppe mit Transkriptmengen unter dem medianen Wert aller Tumoren eingeteilt. Bewertet wurden jeweils die Transkriptmenge von CD2, CD3, CD56, NKp46, Perforin, Granzym B, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , CCL5, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL16, CX3CL1 und CX3CR1 normalisiert auf das Haushaltsgen 18SrRNA. Für keinen der untersuchten Transkripte konnte eine signifikante Korrelation mit dem Überleben festgestellt werden. Die Gruppe mit hoher Transkriptmenge an CX3CR1 [18SrRNA] zeigte zwar ein längeres Überleben in der Gruppe mit hoher Transkriptmenge, aber das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht (p=0,06). Auch die Parameter CX3CL1 [18SrRNA] (p=0,32), NKp46 [18SrRNA] (p=0,13), Perforin [18SrRNA] (p=0,46), CD56 [18SrRNA] (p=0,77), CD2 [18SrRNA] (p=0,62) und TGF- $\beta$  [18SrRNA] (p=0,97) zeigten keine Korrelation mit dem Überleben.

#### 4.6.3.2 Einteilung der Patienten basierend auf den Cut-off-Werten der ROC-Analyse

21 RCC-Patienten mit vorhandenen Follow-Up-Daten wurden unter zur Hilfenahme der über ROC-Analyse ermittelten Grenzwerte (siehe Tabelle 4.4.3.1 und 4.4.4.1) in zwei Gruppen eingeteilt. Zur Bewertung wurden die Transkriptmengen von NKp46, Perforin und CX3CR1 normalisiert auf CD2 und CX3CL1 und CX3CR1 normalisiert auf 18SrRNA verwendet. Die Stratifizierung nach der Transkriptmenge von NKp46 [CD2], Perforin [CD2] oder CX3CL1 und CX3CR1 normalisiert auf 18SrRNA erreichten nicht das Signifikanzniveau ( $p=0,08$ ,  $p=0,34$ ,  $p=0,06$  bzw.  $0,12$ ) (Abb. 4.6.3.1 A-D). erfolgt die Einteilung nach dem ROC-Grenzwert von CX3CR1 normalisiert auf CD2 so ergab sich ein signifikant besseres Überleben für Patienten der CX3CR1 [CD2]<sup>high</sup> Gruppe ( $p=0,03$ ) (Abb. 4.6.3.1 E).

Die auf CX3CR1[CD2] Transkript-Basis getroffene Unterteilung korrelierte nicht mit Geschlecht ( $R= 0,29$ ;  $p= 0,12$ ) oder Alter ( $R= -0,01$ ;  $p= 0,96$ ). Eine Kontingenzanalyse mittels Fisher's Exakt Test zeigte keinen Zusammenhang zwischen der Einteilung nach dem CX3CR1[CD2]-ROC-Grenzwert und dem Tumorstadium unabhängig, davon, ob beim Tumorstadium die Stadien I und II als eine Gruppe gegen III und IV als zweite Gruppe eingeteilt wurde oder ob die Stadien I, II und III als eine Gruppe dem Stadium IV als andere Gruppe gegenüber gestellt wurden ( $p=0,35$  bzw.  $p=0,48$ ). Dies deutet daraufhin, dass die Transkriptmenge von CX3CR1[CD2] ein von klinischen oder pathologischen Klassifizierungen unabhängiger Faktor ist.



**Abbildung 4.6.3.1:** Kaplan-Meier Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Transkriptmengen von NKp46, Perforin, CX3CL1 CX3CR1 auf das Überleben von RCC-Patienten (n=21). Basierend auf den ROC-Grenzwerten wurden die Patienten anhand ihrer Transkriptmenge an NKp46 [CD2] (A), Perforin [CD2] (B), CX3CL1[18SrRNA] (C), CX3CR1 [18SrRNA] (D) und CX3CR1 [CD2] (E) in zwei Gruppen eingeteilt und eine Korrelation mit dem Überleben untersucht. Die Berechnung basierte auf dem Log-Rang (Mantel-Cox) Test. Nur die Einteilung über die CX3CR1 [CD2]-Transkriptmenge erreichte das Signifikanzniveau (p=0,03).

## 5 Diskussion

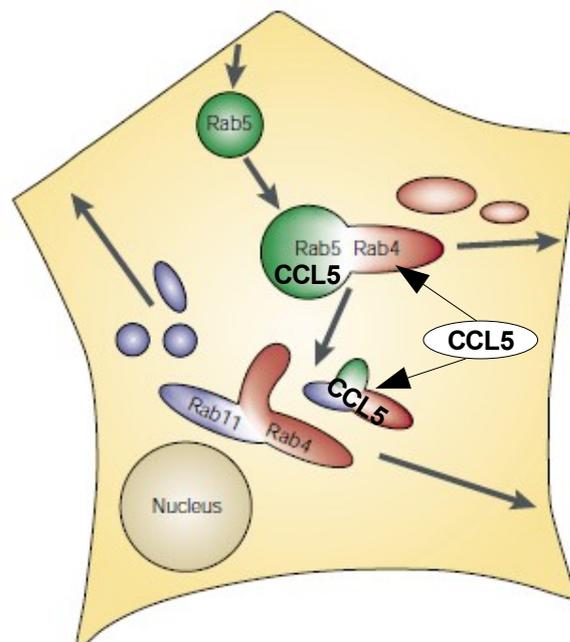
### 5.1 CCL5 ist konstitutiv exprimiert in ruhenden NK-Zellen und kolokalisiert mit Rab5

Die Bedeutung des in dieser Arbeit untersuchten Chemokins CCL5 (RANTES) wurde bisher vor allem in T-Zellen und Makrophagen untersucht. Neben der chemotaktischen Wirkung auf T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und DC ist für CCL5 auch eine aktivierende Wirkung auf T-Zellen und CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen beschrieben [6;67]. CCL5 ist in naiven T-Zellen weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene nachweisbar, sondern wird erst bei Bindung des T-Zellrezeptors an den spezifischen MHC-Peptid-Komplex zeitgleich mit Perforin, Granzym B und Granzym A induziert [25;26]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass CCL5 in Effektor-T-Zellen in granulären Vesikeln vorliegt und bei Stimulation des T-Zellrezeptors zusammen mit den Zytotoxinen in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird. So wurde vermutet, dass CCL5 zusammen mit den Zytotoxinen in den lytischen Granula lokalisiert ist [27]. Catafalmo et al. zeigten aber, dass CCL5 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen weder in den lytischen noch in frühen Endosomen oder in Golgi Vesikeln lokalisiert ist, sondern sich in einem CCL5 spezifischen sekretorischen Vesikel befindet [27]. Bis heute konnte noch kein Vesikel-Marker identifiziert werden, der mit CCL5 kolokalisiert. Im Gegensatz zu dem relativ umfangreichen Wissen über CCL5 in T-Zellen ist über CCL5 in NK-Zellen wenig bekannt. Deshalb wurde in dieser Arbeit zuerst die grundlegenden Eigenschaften von CCL5 in NK-Zellen untersucht und mit den Erkenntnissen in zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass CCL5 auf Proteinebene in ruhenden primären humanen NK-Zellen konstitutiv nachweisbar ist und eine den Zytotoxinen Perforin, Granzym B und Granzym A vergleichbare Proteinstabilität besitzt. Die Proteinstabilität von CCL5 war in NK-Zellen wesentlich länger als in CTL, in welchen das Proteinniveau stark von einer Neusynthese durch Translation von gespeicherter mRNA abhängig war. Parallele Untersuchungen durch unseren Kooperationspartner D. Kumar zeigten, dass primäre NK-Zellen konstitutiv einen hohen Gehalt an CCL5 mRNA haben (Anhang 8.1 Publikation Kumar et al Figure 1D). Die konstitutive Transkription von CCL5 in NK-Zellen war von JNK MAPK Signalwegen aber nicht ERK und p38 gesteuert (Anhang 8.1 Publikation Kumar et al Figure 2A). Die zentrale Rolle des JNK-Signalwegs wurde auch für den Erhalt der Proteinmenge nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, wie CCL5 in NK-Zellen reguliert

wird. Sie zeigten gleichzeitig Unterschiede zu CTL, indem bei NK-Zellen die Expression konstitutiv erfolgt, unter Beteiligung des JNK MAPK Signalwegs, während in CTL die Expression induziert erfolgt unter Beteiligung von p38 und ERK1/2 MAPK Signalwege [52;54;55].

Trotz konstitutiver Proteinexpression wurde CCL5 von primären NK-Zellen nicht spontan freigesetzt. Die Sekretion erfolgte erst nach unspezifischer PMA/I Stimulation. Weiterführend wäre es interessant zu bestimmen, ob die CCL5-Sekretion in NK-Zellen über Signale der aktivierenden Rezeptoren, wie NKp30, NLP46 oder NKG2D, oder aber auch durch Zytokine wie IL-2, IL15 oder IL-21, deren aktivierende Wirkung auf NK-Zellen beschrieben ist, induziert wird. Präliminäre Versuche mit IL-2 lassen vermuten, dass dieses Zytokin nicht zur CCL5 Sekretion führt. Die Stimulierten NK-Zellen sezernierten CCL5 auch in Anwesenheit von Proteinsynthese und Transkriptioninhibitoren. Die initiale Freisetzung (bis 60min) war in Anwesenheit der Inhibitoren vollständig identisch zum nicht-inhibierten Ansatz. Dies war ein erster Hinweis, dass CCL5 in primären NK-Zellen intrazellulär als gespeichertes Protein vorliegen könnte. Daraufhin wurde die intrazelluläre Lokalisation von CCL5 untersucht. Konsistent mit Beschreibungen in CTL wurde keine Kolo­kalisierung von CCL5 mit lytischen Granulamarkern (GMP-17 und CD107), lytischen Proteinen ( Granzym B und Granzym A) oder einem Marker für frühe Endosomen (EEA-1) festgestellt [27]. Erstmals wurde in dieser Arbeit eine mögliche Kolo­kalisierung von CCL5 und Rab5 untersucht. Es zeigte sich , dass CCL5 und Rab5 kolo­kalisieren. Da eine Rab5 Kolo­kalisierung mit CCL5 bisher noch nie gezeigt worden war, wurde zur Bestätigung dieses Befundes ein zweiter Antikörper gegen Rab5 eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass der Rab5-Antikörper aus Kaninchen weniger Vesikel anfärbte, als der zuerst verwendete Antikörper aus der Maus. Alle Rab5 positiven Vesikel waren auch CCL5 positiv, aber es gab etwa die gleiche Anzahl an CCL5 Vesikel die nicht von, Rab5-Antikörper aus dem Kaninchen angefärbt wurden. Weiterführend gilt jetzt durch Doppelfärbung mit Maus und Kaninchen Antikörper gegen Rab5 nachzuweisen, in wieweit diese Antikörper überlappende Vesikel anfärben. Es gibt verschiedene Rab5-Proteine, so dass denkbar ist, dass vielleicht der Maus-Antikörper zusätzlich ein anderes Rab-Protein erkennt. Rab-Proteine gehören zur Superfamilie der Ras GTPasen und spielen eine Rolle in der Vesikelbildung, -Bewegung und Vesikelfusion. Jeder dieser Schritte wird von unterschiedlichen Rab-Proteinen reguliert wird, so dass die meisten Rab-Proteine charakteristisch für ein bestimmtes Kompartiment sind [Ref]. Für Rab5 ist beschrieben, dass es den Clathrin-coated -Vesikel-vermittelten Transport von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen steuert. Außerdem ist bekannt, dass Rab5 an der Fusion von endosomalen Vesikeln

beteiligt ist, wobei sich in den Fusionsvesikeln spezifische Rab-Domänen ausbilden [68]. Die Spezifität eines Kompartiments ist daher nicht unbedingt mit einem einzigen Rab-Protein korreliert, sondern ein Kompartiment zeichnet sich durch ein Mosaik verschiedener Rab-Domänen aus. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob noch andere Rab-Proteine mit CCL5 kolokalisieren. Dies ist in Abbildung 5.1.1 schematisch gezeigt. Desweiteren ist veranschaulicht, dass Rab5 an einer Schnittstelle verschiedener Vesikel positioniert ist. Die Mögliche Positionierung von CCL5 im vesikulären Netzwerk ist eingezeichnet. Da viele vesikuläre Kompartimente durch mehrere Rab-Proteine gekennzeichnet sind, wäre es interessant zu untersuchen, ob noch andere Rab-Proteine mit CCL5 kolokalisieren.



**Abbildung 5.1.1: Schematische Darstellung des endosomalen Vesikel-Kompartiments und die Verteilung von Rab-Proteinen in den Kompartimenten.** Clatherin-coated-Vesikel sind durch Rab5 (grün) gekennzeichnet. Diese Vesikel fusionieren mit Rab4-Vesikeln (rot) und dann mit Rab11-Vesikeln (lila), wobei die Rab-Moleküle spezifische Domänen ausbilden. Die Pfeile zeigen den Fluss der Vesikel an. Die mögliche Lokalisation von CCL5 in Rab5-Kompartimenten ist dargestellt. [modifiziert nach Zerial et al. ,Nature Reviews 2001[68]]

## 5.2 Die Rolle des Chemokins CCL5 für die Phagozytose von Makrophagen

Das Chemokin CCL5 wird in reifen zytotoxischen T-Zellen in intrazellulären Granula gespeichert und nach Aktivierung der T-Zellen durch die Bindung des T-Zellrezeptors an den spezifischen MHC-Peptid-Komplex sezerniert. Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Nelson (medizinische Poliklinik Innenstadt LMU München) zeigten, dass CCL5 bei der Erkennung von Zielzellen durch CTL auf die Plasmamembran der Zelle abgelagert wird. CCL5 kann auch auf der Oberfläche der entstehenden apoptotischen Zellen nachgewiesen werden [56]. Rückschlüsse auf eine mögliche physiologische Bedeutung dieser Ablagerung kann man aus den Ergebnissen ziehen, dass apoptotische Zellen, die CCL5 auf der Oberfläche aufwiesen vermehrt von humanen Makrophagen aufgenommen wurden als apoptotische Zellen ohne CCL5 [57]. Diese Aufnahme war inhibierbar durch die Zugabe des CCL5-Antagonisten Met-RANTES, der an die selben Rezeptoren, CCR1 und CCR5, auf Makrophagen bindet wie CCL5. Da Met-RANTES nicht zwischen CCR1 und CCR5 unterscheidet, war es Ziel dieser Arbeit zu bestimmen, ob die CCL5-induzierte Phagozytose den Rezeptor CCR5 oder CCR1 benutzt. Um dies zu klären wurde die CCL5 induzierte Phagozytose von WT-Mausmakrophagen mit der von CCR5<sup>-/-</sup> Mausmakrophagen verglichen. Zunächst wurde bestätigt, dass Maus-Makrophagen, wie vorher für humane Makrophagen gezeigt, apoptotische Zellen, die funktionelles CCL5 auf der Oberfläche trugen, effektiver aufnahmen als apoptotische Zellen ohne CCL5 oder apoptotische Zellen mit antagonistisch wirkendem CCL5 (Met-RANTES). Weiterhin ergab der Vergleich von WT und CCR5<sup>-/-</sup> Makrophagen, dass die verstärkte Aufnahme ebenso in den CCR5<sup>-/-</sup> Maus Makrophagen auftrat. Daher kann man davon ausgehen, dass die CCL5-induzierte Phagozytose nicht über CCR5 vermittelt wird. Um eine Beteiligung von CCR1 zu zeigen oder auszuschließen sind einerseits weitere Versuche mit spezifischen CCR1 und CCR5 Inhibitoren und andererseits mit CCR1<sup>-/-</sup> Maus-Makrophagen notwendig.

### 5.3 Das klarzellige Nierenzellkarzinom zeigt ein komplexes Profil an Zytokinen, Chemokinen und Lymphozytenmarker

Das klarzellige Nierenzellkarzinoms zeichnet sich durch ein hohes Lymphozyteninfiltrat aus [37;69]. In den meisten Fällen ist das Lymphozyteninfiltrat alleine aber nicht in der Lage Tumorwachstum zu kontrollieren und es kommt zu Progression und Metastasierung des Tumors.

In dieser Arbeit wurden die Transkriptmengen verschiedener Lymphozytenmarker, Chemokine und Zytokine mittels qRT-PCR in Nierenzellkarzinom- und des Normalnierengewebe untersucht. Ein Vergleich zeigte, dass die Transkriptspiegel der Lymphozytenmarker in den Tumorgeweben signifikant erhöht waren und so das beobachtete hohe Infiltrat im Nierenzellkarzinom widerspiegeln. Die erhöhte Menge an Zytotoxinen, Perforin und Granzym B im Tumorgewebe deutet darauf hin, dass bevorzugt Effektor-T-Zellen und NK-Zellen im Tumorgewebe vorhanden sind. Dies konnte durch histologische Befunde bestätigt werden (unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe). Von den Zytokinen zeigten vor allem Zytokine wie IL-2, IL-12p40, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  erhöhte Transkriptmengen im Tumorgewebe. Diese Zytokine haben ein zweiseitiges Wirkprofil. Während sie in der akuten Entzündungsphase Zellen des angeborenen (NK-Zellen) und erworbenen Immunsystems (T-Zellen) aktivieren und antitumoral sein können, unterstützen sie bei chronischer Entzündung den Gewebeumbau und die Angiogenese. Sie schaffen so ein Milieu, welches Zellproliferation, genetische Instabilität, Migration, also Tumorprogression fördert [70-74]. Somit unterstützt das hier in Tumoren gefundene Zytokinmilieu die Hypothese, dass Tumoren inflammatorische Erkrankungen sind, die vom Immunsystem nicht geheilt werden. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und einem höheren Krebsrisiko und viele Tumore entstehen an Orten chronischer Entzündung [72]. In diesem Zusammenhang ist für TNF- $\alpha$  beschrieben, dass es angiogenesefördernde Wirkung besitzt und ein Wachstumsfaktor für das Nierenzellkarzinom aber auch für Brustkrebs und Gebärmutterkrebs ist [72]. Dabei wird TNF- $\alpha$  mit schlechter Prognose und Cachexia assoziiert. Im Fall des Nierenzellkarzinoms ergibt sich die hohe Menge an TNF- $\alpha$  unter Umständen durch die Mutation des Hippel-Lindau Gens, das unmutiert die Translation von TNF- $\alpha$  unterdrückt, aber in 80% der Nierenzellkarzinome mutiert ist [33;72]. Es ist beschrieben, dass Nierenzellkarzinomzellen, aber auch andere Tumorzellen, TNF- $\alpha$  sezernieren. Daher gibt es Studien, die die Verwendung von monoklonalen anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern als Therapieform für das Nierenzellkarzinom

untersuchen [75]. Weiterhin sind protumorale Effekte von IL-12p40 denkbar. IL-12p40 ist eine Untereinheit des Zytokins IL-12 aber auch von IL-23 [76]. Daher kann über die Transkriptmenge von IL-12p40 nicht zwischen diesen beiden Zytokinen unterschieden werden. IL-23 ist im Zusammenhang mit Tumoren auch als Angiogenese fördernd beschrieben [77]. IL-2 wurde ursprünglich als Wachstumsfaktor für T-Zellen und NK-Zellen beschrieben. Mittlerweile weiß man aber, dass es auch T-Zellapoptose und regulatorische T-Zellen induzieren kann, die eine antitumorale Immunantwort inhibieren. Kennzeichnend für das Nierenzellkarzinom ist auch eine hohe Transkriptmenge des Zytokins TGF- $\beta$ . Für TGF- $\beta$  ist beschrieben, dass es vor allem immunsupprimierend und antiinflammatorisch wirkt, in dem es unter anderem NK-Zellen inhibiert, die Differenzierung von T-Zellen in regulatorische T-Zellen induziert und die Angiogenese fördert [78].

Von den untersuchten Chemokinen waren die Transkriptmengen von CCL5, CXCL10 und CXCL16 im Tumor erhöht, während die Transkriptmenge von CXCL12 in den Normalnierengeweben erhöht vorlag. CCL5, CXCL10 und CXCL16 sind beschrieben als proinflammatorische Zytokine, die T-Zellen und NK-Zellen anlocken und können daher mitverantwortlich für die hohe Infiltratmenge in den Tumoren sein [6;21]. Es ist beschrieben, dass CXCL12 in normalen Nierenzellgewebe exprimiert wird und in Reaktion auf eine akute Entzündung erhöht nachweisbar ist [79]. Im Nierenzellkarzinom hingegen ist konsistent mit unseren Untersuchungen beschrieben, dass CXCL12 im Tumor erniedrigt vorliegt. Weiterhin ist beschrieben, dass CXCL12 über die Bindung an CXCR4 auf den Nierenzellkarzinomzellen die Migration entlang des Gradienten an CXCL12, mit niedrigen Konzentrationen in der Peripherie und hohen Konzentrationen im Knochenmark, stimuliert [79-81]. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass die niedrige Menge an CXCL12 im Tumorgewebe das Auswandern der Tumorzellen fördert. Erhöhte tumorale Expression von CXCL16 wurde kürzlich als neuer prognostischer Marker für längeres Überleben beschrieben [82]. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich hingegen kein Zusammenhang zwischen CXCL16-Transkriptmenge und Patientenüberleben. Im Gegensatz zu unserem Patientenkollektiv, welches ausschließlich klarzellige Nierenzellkarzinome beinhaltete, konnten Gutwein et al. einen Überlebensvorteil von höherer CXCL16 Expression nur in papillären Nierenzellkarzinomen zeigen [82]. Dies könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich für keines der untersuchten Transkripte, bei Einteilung nach dem Median der Transkriptmenge in den Tumoren, ein Zusammenhang zwischen Transkriptmenge und Überleben.

#### 5.4 Der Anteil an NK-Zellen im Immunzellinfiltrat des Nierenzellkarzinoms lässt sich an Hand der Transkriptmenge von NKp46, Perforin, CX3CL1 und CX3CR1 quantifizieren

NK-Zellen sind durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet virus-infizierte oder maligne Zellen zu erkennen und spontan zu lysieren. NK-Zellen sind aber auch eine wichtige Quelle für Zytokine und Chemokine und könne so an der Ausrichtung einer Immunantwort mit beteiligt sein [5]. In der Therapie hämatologischer Tumoren, z.B. dem akuten myeloiden Lymphom (AML) sind NK-Zellen Teil des hämatopoetischen Stammzelltransfers, da sie keine „*graft versus host disease*“ (GvHD) aber einen „*graft versus leukemia*“ (GVL) Effekt vermitteln [7]. In soliden Tumoren ist deren Rolle noch wenig gut etabliert. In Brustkrebs jedoch gibt es Beschreibungen, dass NK-Zellen die Wirkung von monoklonalen Antikörpern verstärken können und in Tumoren wie dem kleinzelliges Bronchialkarzinom und dem Magenkarzinom ist die Menge an NK-Zellen positiv assoziiert worden mit Tumorkontrolle [5;11;14].

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des NK-Zellanteils im Lymphozyteninfiltrat des klarzelliges Nierenzellkarzinoms untersucht. Durch die durchflusszytometrische Untersuchung der aus Nierenzellkarzinomen isolierten tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) war bekannt, dass sich klarzellige Nierenzellkarzinome an Hand ihres prozentualen Gehalts an NK-Zellen in NK<sup>high</sup> (> 20% NK in TIL) und NK<sup>low</sup> (< 20% NK in TIL) Tumore einteilen lassen. Der Grenzwert von 20% war auf Grund der Tatsache, dass bei gesunden Spender im Regelfall der prozentuale Anteil der NK-Zellen in PBMC nicht mehr als 20% NK-Zellen betrug, festgelegt worden. NK-Zellen aus NK<sup>high</sup> Tumoren konnten durch Kultur mit niedrig dosiertem IL-2 ihre zytolytische Aktivität wiedererlangen, während NK-Zellen aus NK<sup>low</sup> Tumoren in der Regel nicht reaktivierbar waren. Diese Untersuchungen zeigten, dass NK-Zellen in den beiden Tumor-Gruppen sich nicht nur quantitative sondern auch qualitative unterschieden [38]. In dieser Arbeit wurde erstmalig mittels qRT-PCR die Transkriptmengen von Lymphozytenmarkern und NK-Markern quantifiziert. Dabei war es Ziel, eine Korrelation mit dem prozentualen Anteil der NK-Zellen im Nierenzellkarzinominfiltrat her zu stellen. Es zeigte sich, dass die Transkriptmengen von NKp46, Perforin, CX3CL1 und CX3CR1 signifikant in den NK<sup>high</sup>-Tumoren erhöht vorlagen. Es zeigte sich, dass es ein bedeutsamer Schritt war, eine passende Normalisierung zu wählen. So wurde für die lymphozytenassoziierten Transkripte eine Normalisierung auf den Leukozytenmarker CD2 mit einer Normalisierung auf 18SrRNA

verglichen. Es zeigte sich, dass nur die auf CD2 normalisierten Transkripte die Unterscheidung der NK<sup>high</sup> Tumoren von den NK<sup>low</sup> Tumoren ermöglicht. Plausibel ist dies deshalb, weil die Gatingstrategie der FACS-basierten NK-Zellquantifizierung ebenfalls den Prozentanteil an NK-Zellen im Lymphozyteninfiltrat angibt und nicht die absolute Anzahl an NK im Gewebe. Solche Transkripte, die von verschiedenen Zelltypen einschließlich Tumorzellen exprimiert wurden, also Chemokine und Zytokine, wurden weiterhin auf 18SrRNA normalisiert. So konnten gezeigt werden, dass NKp46, Perforin und CX3CR1 normalisiert auf CD2 und CX3CL1 normalisiert auf 18SrRNA in den NK<sup>high</sup> Tumoren signifikant erhöht waren und mit dem FACS-basierten prozentualen NK-Zellanteil positiv korrelierten. Dagegen konnte im Tumorgewebe kein Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge von CD56, einem klassischen NK-Marker, und dem prozentualen Anteil an NK-Zellen in TIL festgestellt werden. Mit dem Wissen, dass CD56 auch auf aktivierten Effektor-T-Zellen [Ref] und auf T-Zellen im Nierenzellkarzinom (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) vorkommt ist dieses Ergebnis verständlich. Das Ergebnis, dass CX3CR1 und CX3CL1 eine Aussage über den NK-Anteil zulassen ist plausibel. Denn die CX3CL1/CX3CR1 Achse spielt eine Rolle in der antitumoralen Immunantwort der NK-Zellen, da CX3CL1 über die Bindung an CX3CR1, an der Chemotaxis, Adhesion und Aktivierung der NK-Zellen beteiligt ist [31]. CX3CR1 ist vor allem auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert und scheint mit zytotoxischer Effektorfunktion zu korrelieren [2;83]. Außerdem ist CX3CL1 an der Aktivierung von NK-Zellen durch Dendritische Zellen beteiligt [29]

Die Brauchbarkeit und Qualität der Transkriptmengen von NKp46, Perforin, CX3CL1 und CX3CR1 zur Unterscheidung zwischen NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumoren wurde mit mehreren statistischen Verfahren geprüft. Die ROC-Analyse ergab, dass die Einteilung der Tumore in NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumore basierend auf der Transkriptmenge an NKp46, Perforin, CX3CR1 und CX3CL1 hohe Sensitivität und Spezifität besitzt. Der Fisher's Exact Test bestätigte die Brauchbarkeit der Grenzwerte. Die multivariate Datenanalyse mittels artifizieller neuronaler Netzwerke zeigte, dass die Kombination dieser Marker die Sensitivität der Klassifizierung von Tumorgeweben in NK<sup>high</sup> und NK<sup>low</sup> Tumore noch erhöht.

Histologische Quantifizierung von NKp46 positiven Zellen konnten einen Zusammenhang zwischen der Menge an NKp46 positiven Zellen im Gewebe und dem prozentual Anteil an NK-Zellen in TIL feststellen. Es gab jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge an NKp46, unabhängig von der Normalisierungsmethode und der Anzahl positiver Zellen. NKp46 ist auf Proteinebene nicht geeignet den Anteil an NK-Zellen im Lymphozyteninfiltrat korrekt wieder zu geben. Dafür könnte die geringe Nachweisgrenze der

immunhistochemischen Färbung zusammen mit einer geringen Expressionsdichte von NKp46 verantwortlich sein.

Wurden die Patienten (n=21) über die ermittelten ROC-Grenzwerte in zwei Gruppen eingeteilt und für diese zwei Gruppen das mediane Überleben bestimmt, so zeigte sich ein signifikant längeres Überleben für die Gruppe mit Transkriptmengen an CX3CR1 über dem ROC-Grenzwert. Für den prozentualen Anteil an NK in TIL und die Transkriptmenge an NKp46, Perforin und CX3CL1 konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben festgestellt werden, wobei das Überleben in den NK<sup>high</sup>, NKp46<sup>high</sup> und CX3CL1<sup>high</sup> Tumoren tendenziell erhöht war. Da die Anzahl der Patienten mit vollständigen Follow-Up Daten relativ gering ist, können die Ergebnisse als Anhaltspunkt gesehen werden, müssen aber in einem größeren Patientenkollektiv erhärtet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen daraufhin, dass die quantitative Transkriptanalyse (qRT-PCR) von bestimmten Markern den NK-Zellanteil am Lymphozyteninfiltrat im Nierenzellkarzinom wiedergeben kann. Die qRT-PCR ist eine Methode, die einen hohen Probendurchsatz erlaubt und für die Analyse von Archivmaterial geeignet ist. Damit hat sie einen entscheidenden Vorteil gegenüber der durchflusszytometrischen Analyse von TIL, die auf Frischgewebe angewiesen ist und zeitlich sehr aufwendig ist. Zukünftig kann jetzt eine größere Patientenkohorte analysiert werden, um einerseits die hier erhobenen Daten zu validieren. Vor allem ist nun erstmalig möglich die Hypothese zu testen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Anteil an NK-Zellen im Tumor und dem Ansprechen auf IL-2 Therapien besteht. Auf Grund der Tatsache, dass manche Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom auf eine IL-2 basierte Therapie ansprechen spekulierten wir, dass unter Umständen der Gehalt an NK-Zellen beim Ansprechen auf eine IL-2 basierte Therapie eine Bedeutung haben könnte [33;37]. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, wäre dies ein entscheidender Durchbruch für die Therapieauswahl. Denn ein Marker oder eine Markerkombination, welche Ansprecher von Nichtansprechern unterscheidet ist dringend nötig, weil die IL-2 basierte Therapie mit hohen Nebenwirkungen verbunden ist. Daher wäre es erstrebenswert den Nichtansprechern diese Nebenwirkungen zu ersparen. Gleichzeitig könnte man den Nichtansprechern frühzeitig andere Therapieformen, wie z.B. *small-molecule VEGF-inhibitor* Therapie (Sunitinib bzw. Sofarenib) anbieten. Um diese Hypothese testen zu können müsste eine große Patientenkohorte, inklusive Patienten mit IL-2 Therapie, untersucht werden. Die jetzige Methode zur Unterscheidung von Tumoren mit hohem und niedrigem NK-Anteil beruht auf der durchflusszytometrischen Analyse von TIL, die aus frischem post-operativem Gewebe isoliert wurde.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zu Quantifizierung von NK-Zellen lassen sich möglicherweise auch auf andere Gewebe und Pathologien übertragen. Neben ihrer Bedeutung in Viruserkrankungen, wie HIV und HCV, spielen NK-Zellen auch eine Rolle in Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, wo sie mit einer Remission der Krankheit, und Psoriasis, wo sie mit einer Verstärkung der Entzündungsreaktion assoziiert werden [20;21;84]. Die hier analysierten Marker sind möglicherweise auch geeignet in diesen Geweben den Gehalt an NK-Zellen zu bestimmen. Weiterhin ist eine Verwendung im adoptiven NK-Zelltransfer zur Therapie solider Tumore denkbar, um zu bestimmen, wieviele NK-Zellen im Gewebe ankommen. Bei der Übertragung der Methodik und Ergebnisse auf andere Gewebetypen ist zu bedenken, dass die hier verwendeten Daten zu CX3CL1 und CX3CR1 möglicherweise spezifische für das Nierenzellkarzinom sein könnten und andere Chemokin/Rezeptor-System bei anderen Organen eine übergeordnete Rolle spielen könnten. So ist für Psoriasis neben CX3CR1/CX3CL1 auch ein Zusammenhang zwischen dem NK-Zellinfiltrat und der Expression von CCL5 und CXCL10 beschrieben, der in unseren Untersuchungen nicht beobachtet werden konnte. Da vor allem NKp46 aber auch Perforin NK-zellspezifische Marker sind, sollten sie jedoch unabhängig vom Gewebetyp oder der untersuchten Pathologie sein.

## 6 Zusammenfassung

In der Therapie des metastasierenden klarzelliges Nierenzellkarzinoms spielt die systematische Gabe von IL-2 eine wichtige Rolle, da sie in einem Teil der Patienten zu langanhaltender Tumorregression und Langzeitüberleben führt. Wegen starke Nebenwirkungen und signifikanter Morbidität und Mortalität der IL-2 Therapie, ist es erstrebenswert Therapieansprecher von Nicht-Ansprechern zu unterscheiden, um den Nicht-Ansprechern die Beeinträchtigung der Lebensqualität zu ersparen und ihnen frühzeitig andere Therapieformen anzubieten. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass sich Tumore des klarzelliges Nierenzellkarzinoms anhand des durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen NK-Anteils im Lymphozyteninfiltrat in NK<sup>high</sup> (>20% NK-Zellen in tumor-infiltrierenden Lymphozyten) und NK<sup>low</sup> (<20% NK-Zellen) Tumoren einteilen lassen. Die NK-Zellen der NK<sup>high</sup>-Tumoren erlangten bei Kultur mit IL-2 zytotoxische Aktivität, während die NK-Zellen der NK<sup>low</sup>-Tumoren funktionell inaktiv blieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumoren dieser beiden Gruppen mittels quantitativer qRT-PCR untersucht. Es wurde gezeigt, dass NK<sup>high</sup>-Tumoren höhere Transkriptmengen an NKp46, Perforin, CX3CR1 und CX3CL1 hatten als die NK<sup>low</sup>-Tumoren. Die Einteilung entsprechend hoher und niedriger Transkriptmengen korrelierte mit der durchflusszytometrischen Einteilung der Tumoren in NK<sup>high</sup>- und NK<sup>low</sup>-Tumore. Als entscheidend erwies es sich das entsprechend passende Haushaltsgen für die Normalisierung der qRT-PCR-Daten anzuwenden. ROC- und Fisher's Exakt Testverfahren ergaben hohe Sensitivität und Spezifität und gute Brauchbarkeit für die auf der Transkriptmenge basierte Klassifizierung der Nierenzellkarzinome. Im Vergleich zur univariaten Datenanalyse erhöhte sich die Signifikanz der Klassifizierung bei Kombination der Marker in einer multivariaten Datenanalyse. Außerdem zeigte sich ein signifikant längeres Überleben der Patienten, deren Tumore eine hohe CD2-normalisierten CX3CR1-Transkriptmenge hatten. Basierend auf den hier validierten Markern und Ergebnissen kann nun zukünftig Archivmaterial von großen Patientenkohorten, einschließlich Patienten mit IL-2 Therapie, auf ihren NK-Zellanteil analysiert werden und die Hypothese getestet werden, ob der Anteil an NK-Zellen mit dem Ansprechen auf eine IL-2 Therapie korreliert.

Weiterhin wurde gezeigt, dass das Chemokin CCL5 in NK-Zellen im Unterschied zu T-Zellen konstitutiv produziert wird. Die konstitutive Expression von CCL5 wird über den JNK-MAPK Signalweg reguliert. Ein gewisser Anteil des CCL5-Proteins lag in NK-Zellen gespeichert vor und wurde bei Stimulation sezerniert. Durch konfokale Lasermikroskopie wurde gezeigt, dass CCL5 in NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen nicht in den lytischen Granula gespeichert ist. Erstmals

wurde in dieser Arbeit eine Kollokalisierung von CCL5 mit einem bestimmten endosomalen Kompartiment, welches Rab5-Proteine enthält, nachgewiesen. Apoptotische Zellen, die CCL5 auf der Oberfläche tragen, wurden verstärkt von Makrophagen phagozytiert. Die CCL5-vermittelte erhöhte Phagozytose war nicht vom Rezeptor CCR5 abhängig, da WT-Mausmakrophagen und CCR5<sup>-/-</sup> Mausmakrophagen identische Bevorzugung der CCL-positiven apoptotischen Zellen zeigten. Es gilt zu klären, ob die CCL5-vermittelte Reaktion über den Rezeptor CCR1 vermittelt wird.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Janeway, Charles A. Jr Travers, Paul Walport, Mark Shlomchik, Mark. Immunobiology, The Immune System in Health and Disease. . Garland Science, 2008.
- [2] Cooper MA, Fehniger TA & Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* (2001) **22**: pp. 633-640.
- [3] Orange JS & Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin. Immunol.* (2006) **118**: pp. 1-10.
- [4] Walzer T, Jaeger S, Chaix J & Vivier E. Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr. Opin. Immunol.* (2007) **19**: pp. 365-372.
- [5] Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* (2008) **112**: pp. 461-469.
- [6] Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* (2002) **71**: pp. 173-183.
- [7] Ljunggren H & Malmberg K. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol.* (2007) **7**: pp. 329-339.
- [8] Bryceson YT, March ME, Ljunggren H & Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.* (2006) **214**: pp. 73-91.
- [9] Cheent K & Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* (2009) **126**: pp. 449-457.
- [10] Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C & Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.* (2001) **181**: pp. 203-214.
- [11] Hyakudomi M, Matsubara T, Hyakudomi R, Yamamoto T, Kinugasa S, Yamanoi A, Maruyama R & Tanaka T. Increased expression of fractalkine is correlated with a better prognosis and an increased number of both CD8+ T cells and natural killer cells in gastric adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* (2008) **15**: pp. 1775-1782.
- [12] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S & Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* (2000) **88**: pp. 577-583.
- [13] Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñil M & Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* (2002) **35**: pp. 23-28.

- [14] Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA & Moreno M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* (1997) **79**: pp. 2320-2328.
- [15] Jacobs R, Pawlak CR, Mikeska E, Meyer-Olson D, Martin M, Heijnen CJ, Schedlowski M & Schmidt RE. Systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients differ from healthy controls in their cytokine pattern after stress exposure. *Rheumatology (Oxford)* (2001) **40**: pp. 868-875.
- [16] Martin MP, Nelson G, Lee J, Pellett F, Gao X, Wade J, Wilson MJ, Trowsdale J, Gladman D & Carrington M. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J. Immunol.* (2002) **169**: pp. 2818-2822.
- [17] Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little A, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WMC, Thomas DL & Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* (2004) **305**: pp. 872-874.
- [18] Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, Carrington M & Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* (2008) **23**: pp. 972-976.
- [19] Chao KH, Wu MY, Chen CD, Yang JH, Yang YS & Ho HN. The expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells and activation status of CD4+ and CD8+ T cells in the decidua of normal and abnormal early pregnancies. *Hum. Immunol.* (1999) **60**: pp. 791-797.
- [20] Morandi B, Bramanti P, Bonaccorsi I, Montalto E, Oliveri D, Pezzino G, Navarra M & Ferlazzo G. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol. Res.* (2008) **57**: pp. 1-5.
- [21] Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pità O, Girolomoni G & Cavani A. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur. J. Immunol.* (2006) **36**: pp. 118-128.
- [22] Mosser DM & Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* (2008) **8**: pp. 958-969.
- [23] Stein JV & Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* (2005) **116**: pp. 1-12.

- [24] Appay V, Brown A, Cribbes S, Randle E & Czaplewski LG. Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties. Characterization of nonaggregating, noninflammatory RANTES mutants. *J. Biol. Chem.* (1999) **274**: pp. 27505-27512.
- [25] Song A, Nikolcheva T & Krensky AM. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* (2000) **177**: pp. 236-245.
- [26] Swanson BJ, Murakami M, Mitchell TC, Kappler J & Marrack P. RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity* (2002) **17**: pp. 605-615.
- [27] Catalfamo M, Karpova T, McNally J, Costes SV, Lockett SJ, Bos E, Peters PJ & Henkart PA. Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity* (2004) **20**: pp. 219-230.
- [28] Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O & Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2004) **24**: pp. 34-40.
- [29] Pallandre JR, Krzewski K, Bedel R, Ryffel B, Caignard A, Rohrlich PS, Pivot X, Tiberghien P, Zitvogel L, Strominger JL & Borg C. Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood* (2008) **112**: pp. 4420-4424.
- [30] Tsou CL, Haskell CA & Charo IF. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**: pp. 44622-44626.
- [31] Guo J, Chen T, Wang B, Zhang M, An H, Guo Z, Yu Y, Qin Z & Cao X. Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1. *Immunol. Lett.* (2003) **89**: pp. 1-7.
- [32] Vuky J & Motzer R. Cytokine therapy in renal cell cancer. *Urol. Oncol.* (2000) **5**: pp. 249-257.
- [33] Treiber,U. Zaak,D.. Manual Urogenitale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München (Ed.). W.Zuckschwerdt Verlag, 2008.
- [34] Bleumer I, Oosterwijk E, De Mulder P & Mulders PFA. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* (2003) **44**: pp. 65-75.
- [35] Wong MKK. The current role of immunotherapy for renal cell carcinoma in the era of targeted therapeutics. *Curr Oncol Rep* (2008) **10**: pp. 259-263.
- [36] Rini BI. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions. *Clin. Cancer Res.* (2007) **13**: pp. 1098-1106.

- [37] de Riese W, Goldenberg K, Allhoff E, Stief C, Schlick R, Liedke S & Jonas U. Metastatic renal cell carcinoma (RCC): spontaneous regression, long-term survival and late recurrence. *Int Urol Nephrol* (1991) **23**: pp. 13-25.
- [38] Schleyen JS, Baur N, Kammerer R, Nelson PJ, Rohrmann K, Gröne EF, Hohenfellner M, Haferkamp A, Pohla H, Schendel DJ, Falk CS & Noessner E. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* (2006) **12**: pp. 718-725.
- [39] Gong JH, Maki G & Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* (1994) **8**: pp. 652-658.
- [40] Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R & Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp. Hematol.* (1996) **24**: pp. 406-415.
- [41] Yodoi J, Teshigawara K, Nikaido T, Fukui K, Noma T, Honjo T, Takigawa M, Sasaki M, Minato N, Tsudo M & et al.. TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J. Immunol.* (1985) **134**: pp. 1623-1630.
- [42] Stordeur P, Zhou L & Goldman M. Analysis of spontaneous mRNA cytokine production in peripheral blood. *J. Immunol. Methods* (2002) **261**: pp. 195-197.
- [43] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R & Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* (2001) **25**: pp. 386-401.
- [44] Mocellin S, Provenzano M, Rossi CR, Pilati P, Nitti D & Lise M. Use of quantitative real-time PCR to determine immune cell density and cytokine gene profile in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Methods* (2003) **280**: pp. 1-11.
- [45] Hüsler J & Zimmermann H. Statistische Prinzipien für medizinische Projekte. . Hans Huber, 2006.
- [46] Taylor JMG, Ankerst DP & Andridge RR. Validation of biomarker-based risk prediction models. *Clin. Cancer Res.* (2008) **14**: pp. 5977-5983.
- [47] Marçais A, Tomkowiak M, Walzer T, Coupet C, Ravel-Chapuis A & Marvel J. Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* (2006) **36**: pp. 2745-2754.
- [48] Drexler HG & Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of natural killer cell leukemia-lymphoma. *Leukemia* (2000) **14**: pp. 777-782.

- [49] Kumar D, Hosse J, von Toerne C, Noessner E & Nelson PJ. JNK MAPK pathway regulates constitutive transcription of CCL5 by human NK cells through SP1. *J. Immunol.* (2009) **182**: pp. 1011-1020.
- [50] Chen X, Allan DSJ, Krzewski K, Ge B, Kopcow H & Strominger JL. CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2006) **103**: pp. 10346-10351.
- [51] Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K & Strominger JL. Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2007) **104**: pp. 6329-6334.
- [52] Song A, Chen YF, Thamatrakoln K, Storm TA & Krensky AM. RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity* (1999) **10**: pp. 93-103.
- [53] Ahn Y, Huang B, McPherson L, Clayberger C & Krensky AM. Dynamic interplay of transcriptional machinery and chromatin regulates "late" expression of the chemokine RANTES in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* (2007) **27**: pp. 253-266.
- [54] Nikolcheva T, Pyronnet S, Chou S, Sonenberg N, Song A, Clayberger C & Krensky AM. A translational rheostat for RFLAT-1 regulates RANTES expression in T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* (2002) **110**: pp. 119-126.
- [55] Huang B, Ahn Y, McPherson L, Clayberger C & Krensky AM. Interaction of PRP4 with Kruppel-like factor 13 regulates CCL5 transcription. *J. Immunol.* (2007) **178**: pp. 7081-7087.
- [56] Anz D. Aspekte der antitumoralen Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen und Betrachtung ihres Zusammenspiels mit Makrophagen und dendritischen Zellen. LMU-München. 2006.
- [57] Skrablin P. Tumormilieu-induzierte Inaktivierung zytotoxischer Lymphozyten. LMU-München. 2007.
- [58] Hosse J. Einfluß von Tumorzellmenge und Zytokinen auf den Zytotoxingehalt zytotoxischer T-Lymphozyten. *Diplomarbeit* (2005) **LMU-München**: .
- [59] Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC & Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* (2000) **21**: pp. 228-234.
- [60] Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L & Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) **100**: pp. 4120-4125.

- [61] Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L, Moretta A & Vitale M. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* (2006) **108**: pp. 4118-4125.
- [62] Yamashita K, Imaizumi T, Hatakeyama M, Tamo W, Kimura D, Kumagai M, Yoshida H & Satoh K. Effect of hypoxia on the expression of fractalkine in human endothelial cells. *Tohoku J. Exp. Med.* (2003) **200**: pp. 187-194.
- [63] Riesenberger R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, Castro M, Kammerer R, Takikawa O, Hatz RA, Stief CG, Hofstetter A & Zimmermann W. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* (2007) **13**: pp. 6993-7002.
- [64] Popov A, Abdullah Z, Wickenhauser C, Saric T, Driesen J, Hanisch F, Domann E, Raven EL, Dehus O, Hermann C, Eggle D, Debey S, Chakraborty T, Krönke M, Utermöhlen O & Schultze JL. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J. Clin. Invest.* (2006) **116**: pp. 3160-3170.
- [65] Imaizumi T, Yoshida H & Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J. Atheroscler. Thromb.* (2004) **11**: pp. 15-21.
- [66] Zou J, Han Y & So S. Overview of artificial neural networks. *Methods Mol. Biol.* (2008) **458**: pp. 15-23.
- [67] Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M & Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin. Cancer Biol.* (2004) **14**: pp. 155-160.
- [68] Zerial M & McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2001) **2**: pp. 107-117.
- [69] Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H & Ohtani H. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* (2001) **61**: pp. 5132-5136.
- [70] de Visser KE, Eichten A & Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* (2006) **6**: pp. 24-37.
- [71] Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* (2004) **4**: pp. 540-550.
- [72] Balkwill F, Charles KA & Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* (2005) **7**: pp. 211-217.

- [73] Hagemann T, Balkwill F & Lawrence T. Inflammation and cancer: a double-edged sword. *Cancer Cell* (2007) **12**: pp. 300-301.
- [74] Mantovani A, Allavena P, Sica A & Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* (2008) **454**: pp. 436-444.
- [75] Harrison ML, Obermueller E, Maisey NR, Hoare S, Edmonds K, Li NF, Chao D, Hall K, Lee C, Timotheadou E, Charles K, Ahern R, King DM, Eisen T, Corringham R, DeWitte M, Balkwill F & Gore M. Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J. Clin. Oncol.* (2007) **25**: pp. 4542-4549.
- [76] Nestle FO & Conrad C. The IL-12 family member p40 chain as a master switch and novel therapeutic target in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* (2004) **123**: p. xiv-xv.
- [77] Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA & Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* (2006) **442**: pp. 461-465.
- [78] Thomas DA & Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* (2005) **8**: pp. 369-380.
- [79] Tögel F, Isaac J, Hu Z, Weiss K & Westenfelder C. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int.* (2005) **67**: pp. 1772-1784.
- [80] Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KEJ, Machtens S, Mengel M, Probst-Kepper M, Franzke A, Wollensak T, Gatzlaff P, Atzpodien J, Buer J & Lauber J. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br. J. Cancer* (2002) **86**: pp. 1250-1256.
- [81] Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, Belperio JA & Strieter RM. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol. Cancer* (2006) **5**: p. 56.
- [82] Gutwein P, Schramme A, Sinke N, Abdel-Bakky MS, Voss B, Obermüller N, Doberstein K, Koziolok M, Fritzsche F, Johannsen M, Jung K, Schaidler H, Altevogt P, Ludwig A, Pfeilschifter J & Kristiansen G. Tumoural CXCL16 expression is a novel prognostic marker of longer survival times in renal cell cancer patients. *Eur J Cancer* (2009) **45**: pp. 478-489.
- [83] Nishimura M, Umehara H, Nakayama T, Yoneda O, Hieshima K, Kakizaki M, Dohmae N, Yoshie O & Imai T. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J. Immunol.* (2002) **168**: pp. 6173-6180.

- [84] Jacobs R, Heiken H & Schmidt RE. Mutual interference of HIV and natural killer cell-mediated immune response. *Mol. Immunol.* (2005) **42**: pp. 239-249.

## 8 Anhang

### 8.1 **JNK MAPK Pathway Regulates Constitutive Transcription of CCL5 by Human NK Cells through SP-1**

Dilip Kumar, Judith Hosse, Christine von Toerne, Elfriede Noessner, and Peter J. Nelson

*The Journal of Immunology*, 2009, 182: 1011–1020.

## 9 Abkürzungen

7AAD	7-Aminoactinomycin D
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Cyanin-5
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Fitc	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
GMP-17	<i>granule membrane protein of 17 kD</i>
HLA	human leukocyte antigen (humanes Leukozytenantigen)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitäts-Komplex)
MAPK	<i>mitogen-activated-protein kinase</i>
M $\Phi$	Makrophage

## Abkürzungen

---

pNK	primäre natürliche Killerzellen
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pMHC	MHC-Peptid-Komplexe
qRT-PCR	<i>quantitativ real time polymerase chain reaction</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RCC	<i>renal cell carcinoma</i> (Nierenzellkarzinom)
mRNA	messenger ribosomal nucleic acid
rRNA	ribosomal ribosomal nucleic acid
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SSC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreuung)
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> (Transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$ )
TIL	tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## 10 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Bei Frau Prof. Dolores Schendel möchte ich mich bedanken, dass ich an ihrem Institut meine Doktorarbeit anfertigen durfte.

Mein besonderer Dank geht an meine Doktormutter und meinen Doktorvater Elfriede Nößner und Peter Nelson, die mir nicht nur die Arbeit an diesem spannenden Thema ermöglicht sondern auch mich mit vollem Einsatz bis zu Letzt unterstützt haben. Ihr Engagement hat mich immer angespornt mein Bestes zu geben.

Ich war in der glücklichen Lage zwei Arbeitsgruppen an zu gehören. Hiermit möchte ich mich bei der AG Nelson und bei der AG Nößner für die gute Atmosphäre, die Unterstützung, den Kaffee, die Gummibärchen und für die gemeinsamen Mojitos bedanken. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da wart.

Bei Bruno Luckoff möchte ich mich für die Zurverfügungstellung der Mausmakrophagen bedanken.

Dem gesamten IMI möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bedanken. Vor allem Josef hat mit seinem schier unendlichen Wissen über FACS-Analyse und Antikörper wesentlich zu meiner Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich auch dem EU-Grand INNOCHEM für die Finanzierung meiner Arbeit

Meiner Familie und meinem Liebsten danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen.

## 11 Lebenslauf

Name	Judith Hosse
Geburtsort	Bad Homburg v.d.H.
Geburtsdatum	24.10.1977
Staatsangehörigkeit	deutsch
1997	Abitur am Gymnasium Weilheim
1997 – 1999	Ausbildung zur chemisch-technischen Assistentin (CTA) am Institut Dr. Flad in Stuttgart
1999 – 2005	Studium der Biologie an der Biologischen Fakultät der LMU-München; Hauptfach: Zellbiologie (1,0), Nebenfächer: Immunologie (1,3), Genetik (1,3), med. Microbiologie (1,3)
2004 – 2005	Diplomarbeit am Institut für molekulare Immunologie der GSF-München; Titel: Einfluss von Tumorzellmenge und Zytokinen auf den Zytotoxingehalt zytotoxischer T-Lymphozyten (1,1)
2005 – 2009	Doktorarbeit an der LMU-München in Zusammenarbeit mit der HMGU-München teilweise finanziert über den EU- Grand INNOCHEM (80536011)
Arbeitserfahrung:	
08/99 – 10/99	CTA in der Gruppe für Gentechnik, Roche Diagnostic Penzberg
03/00 – 5/00	CTA in der HIV-Testentwicklung, Roche Diagnostic Penzberg
09/00 – 11/00	CTA in der HCV-Testentwicklung, Roche Diagnostic Penzberg
02/03 – 08/03	CTA in der Qualitätskontrolle der Immunologie und Zellbiologie, Roche Diagnostic Penzberg
02/04 – 04/04	CTA in der Testentwicklung für Infektionskrankheiten, Roche Diagnostic Penzberg