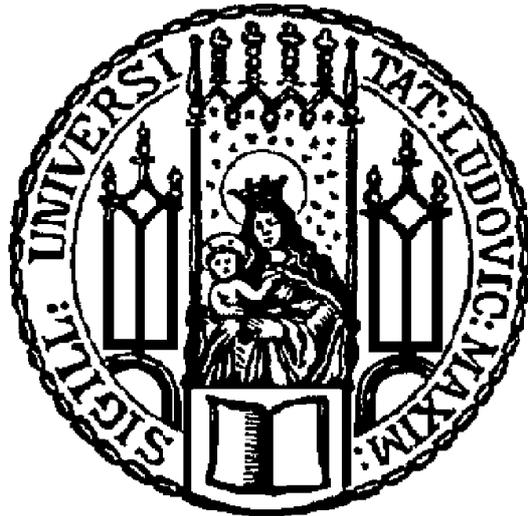


**Tumorbedingte Störungen der funktionellen Kapazität
tumorinfiltrierender natürlicher Killer- und T-Zellen:
Nachweis der Funktionsdefizite und Evaluation von
Gegenmaßnahmen**



Petra U. Prinz

**Tumorbedingte Störungen der funktionellen Kapazität
tumorinfiltrierender natürlicher Killer- und T-Zellen:
Nachweis der Funktionsdefizite und Evaluation von
Gegenmaßnahmen**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften



Angefertigt am
Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz-Zentrum München
unter der Leitung von Prof. Dr. Dolores J. Schendel
und der Betreuung von PD Dr. Elfriede Nößner

vorgelegt von

Petra U. Prinz

München, den 2. September 2010

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Josef Mautner
Mitgutachter: Frau PD Dr. Angelika Böttger
Herr Prof. Dr. Heinrich Jung

Dissertation eingereicht am: 02.09.2010
Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Das Immunsystem	3
2.2	T-Lymphozyten	4
2.2.1	Subgruppen der T-Zellen	4
2.2.2	Der T-Zellrezeptor	5
2.3	Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)	5
2.3.1	Subgruppen der NK-Zellen	6
2.3.2	Rezeptoren der NK-Zellen	7
2.4	Die Effektorfunktion der NK- und T-Zellen	12
2.4.1	Sekretorische Aktivität	12
2.4.2	Zytotoxische Aktivität	13
2.4.3	Signaltransduktion in T- und NK-Zellen	14
2.5	Myeloische Zellen	15
2.6	Das humane Nierenzellkarzinom	16
2.7	Tumorinfiltrierende Lymphozyten	19
3	ARBEITSPROGRAMM DER VORLIEGENDEN ARBEIT	21
4	MATERIAL	22
4.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	22
4.2	Chemikalien und fertige Lösungen	23
4.3	Zellkultur	25
4.3.1	Verbrauchsmedien und Zusätze	25
4.3.2	Medien	26
4.3.3	Pufferlösungen	28
4.4	Zellen	29
4.5	Blutproben	31
4.6	Antikörper	32
4.6.1	Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie	32
4.6.2	Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie	34
4.6.3	Antikörper zur Stimulation von T-Zellen	35
4.7	Patientenmaterial	35
4.7.1	Unbehandelte RCC-Patienten	35
4.7.2	Sunitinibbehandelte RCC-Patienten	36

4.8	Multiplex-Analyse: Phosphoproteinbestimmung (BIO-RAD).....	37
5	METHODEN	38
5.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur	38
5.1.1	Kultivierung humaner und muriner Zelllinien sowie primärer Zellen.....	38
5.1.2	Bestimmung der Zellzahl	38
5.1.3	Kryokonservierung von Zellen	38
5.1.4	Auftauen von Zellen.....	39
5.1.5	Kultivierung adhärenter Zelllinien	39
5.1.6	Kultivierung von Suspensionszellen	40
5.1.7	Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen	40
5.1.8	Gewinnung von Tumorzellkulturüberstand für die Differenzierung von Monozyten zu tumorinduzierten DZ (RCC-DZ)	41
5.2	Arbeiten mit Vollblut und Geweben.....	41
5.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMZ)	42
5.2.2	Negative Isolierung von Natürlichen Killerzellen aus PBMZ.....	42
5.2.3	Positive Isolierung von Monozyten aus PBMZ	43
5.2.4	Positive Isolierung von CD8 ⁺ und CD56 ⁺ Zellen aus PBMZ und TIL.....	44
5.2.5	Generierung von klassischen DZ und RCC-DZ.....	44
5.2.6	Anlegen von 24 Std. Kokulturen mit myeloischen Zellen	44
5.2.7	Isolierung von Leukozyten aus Tumor- und Normalnierengewebe	45
5.2.8	Kultivierung von TIL	46
5.2.9	Gewinnung von löslichen Tumormilieufaktoren zur Kultivierung von NK-Zellen	46
5.2.10	Fixierung von Tumorzellen.....	47
5.3	In-vitro-Modellkultursysteme	47
5.3.1	In-vitro-Kokultivierungsmodell.....	47
5.3.2	In-vitro-3D-Tumormodell	48
5.4	Funktionelle Versuche	49
5.4.1	CD3-Beladung der P815-Zelllinie	49
5.4.2	Stimulation von T- und NK-Zellen.....	49
5.4.3	Nachweis der CD107-Oberflächenmobilisierung.....	50
5.4.4	Nachweis intrazellulärer Zytokine	51
5.4.5	Nachweis der Chromfreisetzung nach Zellyse der Zielzellen (Chromfreisetzungstest) .	51
5.5	Durchflusszytometrie	52
5.5.1	Prinzip	52
5.5.2	Nachweis von Oberflächenmarkern mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern.....	54
5.5.3	Nachweis von intrazellulären Antigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern.....	55
5.5.4	Die verschiedenen Färbekombinationen	55
5.5.5	Fluoreszenzmarkierung von phosphorylierten Proteinen	57
5.5.6	Messung der Proben und Auswertung der Daten	58
5.6	Phosphoproteinbestimmung mittels Bio-Plex	58

5.6.1	Prinzip der Multiplex-Analysen	58
5.6.2	Durchführung der Phospho-Plex Analyse.....	59
5.6.3	Messung und Auswertung	60
5.7	Statistische Analysen.....	60
5.7.1	Mann-Whitney-U Test.....	60
5.7.2	Kruskal-Wallis-Test.....	61
5.7.3	Post-Hoc Test (ANOVA).....	61
5.7.4	Korrelationsanalyse nach Spearman.....	61
6	ERGEBNISSE	62
6.1	Analyse der tumor- und normalniereninfiltrierenden Lymphozyten.....	62
6.1.1	Strategie der Auswahlfensterpositionierung	62
6.1.2	Zusammensetzung der TIL und NIL	64
6.1.3	Funktionelle Analyse der CD3 ⁺ CD8 ⁺ und NK-Zellen mittels des CD107- Mobilisierungsverfahrens	66
6.1.4	Nachweis der Zytotoxine in NK- und CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen	68
6.1.5	Analyse der Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen.....	70
6.1.6	Analyse der Oberflächenrezeptoren auf CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen.....	72
6.2	Reversion der aufgezeigten Defizite in TIL durch IL-2-Kultivierung.....	74
6.2.1	Vergleich der Zytotoxine und funktionellen Aktivität der NK- und CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen in TIL vor und nach IL-2-Kultivierung	74
6.2.2	Vergleich der Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen der TIL vor und nach IL-2- Kultivierung.....	76
6.2.3	Vergleich der Oberflächenrezeptoren der CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen der TIL vor und nach IL-2- Kultivierung.....	77
6.3	Korrelationsanalysen zwischen exprimierten Markern, Subtypenzusammensetzung und funktioneller Aktivität in TIL.....	79
6.4	Analyse der TIL von sunitinibbehandelten Patienten.....	81
6.5	Evaluierung von In-vitro-Tumormodellen	84
6.5.1	In-vitro-Kokultivierung mit hoher Tumorzellanzahl	84
6.5.2	In-vitro-3D-Tumormodell.....	91
6.6	Myeloische Zellen und deren Einfluss auf Effektorzellen.....	93
6.6.1	Generierung der RCC-DZ im In-vitro-3D-Tumormodell.....	95
6.6.2	Einfluss der dendritischen Zellen auf NK-Zellen.....	96
6.6.3	Einfluss der dendritischen Zellen auf zytotoxische T-Zellen.....	99
6.7	Untersuchung wichtiger Signalmoleküle in den Effektorzellen der TIL	106
6.7.1	Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von LCK in T- und NK-Zellen	106
6.7.2	Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von PLC- γ 2 in T-Zellen.....	107
6.7.3	Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von ERK in T- und NK-Zellen	108
6.7.4	Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von AKT in T- und NK-Zellen	110

6.7.5	Überprüfung der Spezifität des durchflusszytometrischen Fluoreszenzsignals des phosphospezifischen ERK- bzw. AKT-Antikörpers	111
6.7.6	Bio-Plex™ Phosphoproteinbestimmung in T- und NK-Zellen der TIL	112
6.7.7	Analyse des Diazylglyzerols in T- und NK-Zellen der TIL	114
6.7.8	Durchflusszytometrische Analyse der ERK-Phosphorylierung der kultivierten T- und NK-Zellen der TIL nach Stimulation	118
6.7.9	Durchflusszytometrische Analyse der AKT-Phosphorylierung der kultivierten T- und NK-Zellen der TIL nach Stimulation	119
6.7.10	Bestimmung der p27kip-Expression in den Effektorzellen unkultivierter und kultivierter TIL	120
7	DISKUSSION	122
7.1	Gewebeprobe	122
7.2	Ex-vivo-Untersuchung des Lymphozyteninfiltrats	123
7.2.1	Isolierung der TIL und NIL	123
7.3	Die Leukozytensubpopulationen der TIL und NIL	125
7.4	Charakterisierung der T- und NK-Zellen in TIL und NIL	126
7.5	Induktion des NK-TIL Phänotyps bei NK-Zellen gesunder Spender durch tumormilieuadaptierte In-Vitro-Kultur	129
7.6	Induktion von 2B4 und Verlust von SAP in NK-Zellen als ein Mechanismus der funktionellen Inhibition im Tumormilieu.....	131
7.7	Tumormilieuinduzierte RCC- DZ zeigen keine inhibitorischen Effekte auf NK- und zytotoxische T-Zellen.....	132
7.8	Defekte in der Phosphorylierung distaler Signalproteine in Effektorzellen der TIL	133
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	137
9	LITERATURVERZEICHNIS	139
	DANKSAGUNG	148
	ERKLÄRUNG.....	150
	CURRICULUM VITAE.....	151

1 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl das Nierenzellkarzinom (RCC, engl.: renal cell carcinoma) reichlich von CD8⁺ T- und NK-Zellen infiltriert ist, kommt es meist nicht zu einer Tumorabstoßung. Die aus Tumoren isolierten T- und NK-Zellen zeigen direkt nach Isolierung aus dem Tumor keine Effektorfunktion, gewinnen jedoch oftmals nach Kultivierung und Zugabe von IL-2 lytische Funktion gegenüber Tumorzellen. Dies deutet auf eine Inaktivierung der Lymphozyten durch das Tumormilieu hin. Ziel der Arbeit war es, die Funktionsdefizite der Lymphozyten im Nierenzellkarzinom und die zu Grunde liegenden Mechanismen zu identifizieren.

Es wurden Leukozyten aus RCC (TIL) und aus nichtmalignem Gewebe der Niere (NIL) isoliert und mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie analysiert. TIL hatten vergleichbare Anteile an T- und NK-Zellen wie NIL und PBMZ (periphere Blut mononukleäre Zellen), jedoch hatten TIL mehr CD3⁺CD8⁺ Zellen und dadurch ein verschobenes CD4:CD8 Verhältnis im Vergleich zu PBMZ und NIL.

Bei Stimulation waren die CD3⁺CD8⁺ bzw. NK-Zellen der TIL nicht in der Lage lytische Granula an die Oberfläche zu mobilisieren. Beide Effektorzellgruppen der TIL zeigten erniedrigte Anteile an Perforin- und Granzym B-positiven Zellen. Die NK-Zellen der TIL hatten weniger NKp46-positive Zellen, aber gleich viele NKG2D- und 2B4-positive Zellen wie die NK-Zellen der NIL. NKp44- und CD69-positive Zellen waren in TIL erhöht. Die CD3⁺CD8⁺ Zellpopulation der TIL enthielt im Vergleich zu NIL weniger NKG2D- und CD57-positive Zellen.

Nach Kultivierung der TIL konnten mehr CD3⁺CD8⁺ und NK-Zellen zur Degranulation stimuliert werden. Bei CD3⁺CD8⁺ Zellen war IL-2 im Kultivierungsmedium nötig, bei NK-Zellen dagegen nicht. Die defizitäre Expression von Perforin und Granzym B bei CD3⁺CD8⁺ und NK-Zellen, sowie von NKp46 bei NK-Zellen, konnte durch IL-2-Kultivierung revertiert werden.

Die Untersuchung der Signalkaskade in T- und NK-Zellen ergab, dass die Phosphorylierung der proximalen Signalproteine LCK, ZAP70 und PLC- γ 2 nach Stimulation bei TIL, NIL und PBMZ vergleichbar war. Dagegen war die Phosphorylierung von ERK, AKT, I κ B und GSK3 in T- und NK-Zellen der stimulierten TIL reduziert. IL-2-Kultivierung erhöhte das konstitutive Phosphorylierungsniveau von ERK und AKT in den Effektorzellen der TIL und durch Stimulation wurde die Phosphorylierung weiter gesteigert auf ein vergleichbares Niveau wie bei T- und NK-Zellen der PBL bzw. NIL. Die Menge des zellzyklusarretierenden Proteins p27kip war in T- und NK-Zellen der TIL nach IL-2-Kultivierung reduziert.

Die Effektorzellen der TIL wiesen mehr Diazylglyzerolkinase (DGK) auf als die Zellen der NIL. Die Stimulation in Anwesenheit des DGK-Inhibitors erhöhte den Anteil degranulierender

Effektorzellen in TIL. Im In-vitro-Modell konnte durch DGK-Inhibition die funktionelle Inhibierung der Effektorzellen durch das Tumormilieu verhindert werden.

Der NK-TIL-Phänotyp mit Abregulation von NKp46-, Perforin- und Granzym B-positiven NK-Zellen und Induktion von CD69 konnte in vitro in einem 3D-Sphäroidkultursystem nachvollzogen werden. Im In-vitro-Suspensionskokultursystem mit hoher Tumorzellzahl wurde der NK-TIL-Phänotyp partiell erreicht. Es blieb die Abregulation des Granzym B und die Induktion des CD69 aus. In beiden In-vitro-Kokultivierungsmodellen wurde die 2B4-Expression einhergehend mit Verlust des SAP-Proteins induziert, was einen möglichen Mechanismus des Tumormilieus darstellt, funktionsinhibierbare NK-Zellen zu induzieren.

Auch dendritische Zellen (DZ) waren Bestandteil der TIL. Diese zeigten durch das Tumormilieu veränderte Eigenschaften im Vergleich zu konventionellen DZ. Zudem wurde gezeigt, dass sie anders als myeloische Suppressorzellen die lytische Aktivität, die Granulaexozytose und die Zytokinproduktion von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen nicht inhibieren und keine T-Zellapoptose auslösen.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein sehr komplexes System, das aus verschiedenen Organen, Geweben, Zellen und Molekülen besteht. Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und –fremden oder gefährlichen Bestandteilen (Matzinger, 2002). Es schützt den Körper vor Krankheitserregern, wie Viren und Bakterien, und stellt gleichzeitig sicher, dass es zu keiner Immunreaktion gegen Komponenten des eigenen Körpers kommt. Darüber hinaus besitzt es die Fähigkeit, krankhaft veränderte (z.B. entartete) Zellen zu erkennen und zu beseitigen. Prinzipiell kann das humane Immunsystem in die beiden Bereiche des natürlichen oder angeborenen Immunsystems und des erworbenen oder adaptiven Immunsystems unterteilt werden. Diese beiden Gruppen arbeiten mit unterschiedlichen Mechanismen, da das angeborene Immunsystem erregereübergreifend und das adaptive Immunsystem erregerspezifisch ist. Ersteres umfasst Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DZ), Granulozyten sowie natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) und entwickelt seine Wirkung unmittelbar nachdem der Erreger die Epithelschicht überwunden hat. Das Epithel ist die erste mechanische Barriere, die durch den festen Verbund der Zellen und dem kontinuierlichen Strom von Flüssigkeiten oder Luft über das Epithelium ein Eindringen von Krankheitserregern verhindert. Zusätzlich wird das Wachstum der Bakterien durch Enzyme, antibakterielle Peptide, sowie den sauren pH-Wert der Epitheloberfläche auf chemische Weise gehemmt. Ist diese erste Barriere überwunden, so kommen die Pathogene in Kontakt mit Zellen des angeborenen Immunsystems. Pathogene können anhand der Expression verschiedener pathogener Strukturen, den PAMPs (engl.: pathogen associated molecular patterns), in Gruppen eingeteilt werden. Diese Gruppen werden über spezifisch auf diese PAMPs ausgerichtete Rezeptoren, die sogenannten „pattern recognition receptors“ (PRRs), die von Immunzellen exprimiert werden, erkannt (Arnon et al., 2004). Hierzu gehören membranständige Rezeptoren, wie Toll-like-, Mannose- und Scavenger-Rezeptoren und zytoplasmatische PRRs, wie die NOD-like Rezeptoren. Nach Bindung einer Zielstruktur kommt es zur Transkription spezifischer Gene, wie z.B. proinflammatorischer Zytokine, die als Zellkommunikationssystem eine wichtige Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem darstellen und die Differenzierung und Proliferation von Zellen beeinflussen können. Scheitert die angeborene Immunantwort, so kommt die adaptive zum Zuge, die spezifisch gegen den Erreger gerichtet ist und ein Gedächtnis ausbildet, um bei erneuter

Konfrontation mit demselben Erreger schnell reagieren und gegebenenfalls eine erneute Infektion verhindern kann. Hier sind als wichtigste Zelltypen die T- und B-Zellen zu nennen. In lymphatischen Geweben, wie Lymphknoten und Milz, werden sie von DZ und Makrophagen aktiviert, welche im peripheren Gewebe „Fremdkörper“ aufgenommen haben, dann in die Lymphknoten abgewandert sind, um dort die Fremdkörper den T- und B-Zellen über Haupt-Histokompatibilitäts-Moleküle (MHC) zu präsentieren. Daraufhin sind Lymphozyten in der Lage, spezifisch auf nahezu jedes Antigen zu reagieren. Durch diese gezielte Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen entsteht ein spezifisches und langlebiges immunologisches Gedächtnis, welches dem Organismus dazu verhilft auf eine zweite Exposition mit demselben Antigen schneller zu reagieren (Janeway et al., 2008).

2.2 T-Lymphozyten

Sowohl T- als auch B-Lymphozyten (T- bzw. B-Zellen) entstehen im Knochenmark, reifen jedoch an unterschiedlichen Orten aus. Im Gegensatz zu B-Zellen, die im Knochenmark reifen, migrieren die Vorläufer T-Zellen (T für Thymus-abhängig) zur weiteren Entwicklung in den Thymus. Nach vollständiger Reifung gelangen beide Lymphozytenarten über den Blutstrom in die peripheren lymphoiden Organe.

2.2.1 Subgruppen der T-Zellen

Bisher wurden verschiedene T-Zelluntergruppen entdeckt, die unterschiedliche Funktionen aufweisen. T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen), die auch als $CD4^+$ T-Zellen bekannt sind, da sie das $CD4$ -Molekül auf ihrer Oberfläche tragen, unterstützen andere weiße Blutzellen in immunologischen Prozessen. So sind sie beispielsweise an der Reifung von B-Zellen zu Plasmazellen oder an der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen beteiligt. $CD4^+$ T-Zellen erkennen Peptide über MHC-II-Moleküle, die von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert werden. Nach ihrer Aktivierung proliferiert diese T-Zell-Subgruppe und sezerniert Zytokine, um die Immunantwort zu regulieren bzw. zu unterstützen. Innerhalb der T-Helfer-Zellen ist eine weitere Unterteilung in Untergruppen möglich. Beschrieben sind T_H1 -, T_H2 -, T_H3 - und T_H17 -Zellen, die unterschiedliche Zytokine produzieren und damit verschiedene Arten an Immunreaktionen auslösen.

Die zytotoxischen T-Zellen (ZTL) exprimieren das $CD8$ -Molekül auf ihrer Oberfläche und sind an der Zerstörung von virusinfizierten und Tumorzellen beteiligt. Sie erkennen ihre Antigene über MHC-I-Moleküle, die von allen Zellen im Körper exprimiert werden.

Als dritte Hauptgruppe der T-Zellen sind die T-regulatorische Zellen (Tregs) zu nennen, die früher als Suppressor-Zellen bekannt waren. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, unerwünschte Immunantworten zu verhindern. Diese können sich beispielsweise gegen Selbstantigene

(Autoimmunität) oder harmlose Fremdantigene (Allergie, Transplantat, Fetus) richten. Eine weitere Rolle spielen die Treg-Zellen bei der Beendigung erfolgreicher Immunreaktionen. Marker, die dieser Zellgruppe zugeordnet werden können, sind die Oberflächenmoleküle CD4, CD25 und der Transkriptionsfaktor Foxp3.

2.2.2 Der T-Zellrezeptor

Bei der Mehrzahl der peripheren T-Zellen ist der T-Zellrezeptor (TZR) ein Heterodimer aus einer α - und β -Kette. Einige T-Zellen (5-10 %) bilden einen $\gamma\delta$ -TZR mit den γ - und δ -Ketten als Untereinheiten aus. Der TZR-Komplex besteht aus mehreren Komponenten, wobei der durch die beiden – mit einer Disulfidbrücke verbundenen – Polypeptidketten gebildete TZR die antigenerkennende Einheit darstellt. Die beiden Ketten lassen sich in eine variable (V-Domäne) und eine konstante Region unterteilen, wobei die V-Domäne die Antigenbindungsstelle bildet. Diese wird von mehreren Gensegmenten kodiert und ist für jeden Zellklon individuell verschieden. Durch die Variation im Bereich der V-Region sind die TZR in der Lage viele unterschiedliche Strukturen zu erkennen und entsprechend darauf zu reagieren. Nach Bindung des TZR an den MHC-Peptid-Komplex (pMHC) der Zielzelle erfolgt die Aktivierung der T-Zelle, die daraufhin Zytokine produziert und proliferiert. Durch die Ausbildung gleicher TZR bei allen Tochterzellen wird die Anzahl antigenspezifischer T-Zellen drastisch erhöht. Die Aktivierung über den TZR ruft eine Kaskade an biochemischen Reaktionen hervor. Allerdings sind TZR-Heterodimere nicht in der Lage Aktivierungssignale selbstständig weiterzuleiten, da sie nur über kurze zytoplasmatische Domänen ohne Kinaseaktivität verfügen. Die Signaltransduktion wird von entsprechenden Komponenten des, mit dem TZR assoziierten, CD3-Komplexes bewerkstelligt. Der CD3-Komplex besteht aus vier invarianten akzessorischen Polypeptidketten, von denen sich jeweils zwei zu Heterodimeren (ϵ - δ , γ - ϵ) formieren. Daneben existiert ein Homodimer zweier ζ -Ketten, welches einen langen zytoplasmatischen Bereich besitzt. Für die Signalweiterleitung beinhaltet jede der ζ -Ketten ITAM-Motive (engl.: immunoreceptor tyrosine based motif), die durch Tyrosinkinase phosphoryliert werden und somit eine Signaltransduktionskaskade auslösen können (Janeway et al., 2008).

2.3 Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)

NK-Zellen sind große, granuläre Lymphozyten, die im Gegensatz zu T-Zellen zum angeborenen Immunsystem gehören. Der Hauptunterschied zu T- und B-Lymphozyten ist primär dieser, dass sie weder T-Zell- noch B-Zell-Rezeptoren (TZR/BZR) für die Erkennung eines Antigens aufweisen, sondern über eine Vielzahl aktivierender bzw. inhibierender Rezeptoren reguliert werden. Das dynamische Gleichgewicht der Signale über aktivierende

und inhibierende Rezeptoren ist somit maßgeblich für den Aktivierungszustand der NK-Zellen (Lanier, 1998; Moretta et al., 2002). Die Hauptfunktion der NK-Zellen ist das Abtöten von infizierten und entarteten Zellen. Dies geschieht durch die Induktion von Apoptose, indem NK-Zellen ebenso wie ZTL nach Erkennung ihrer Zielzellen zytotoxische Moleküle, wie Perforin und Granzyme ausschütten. Eine weitere Möglichkeit Apoptose zu induzieren, ist über den rezeptorvermittelten Fas-Ligand- bzw. TRAIL- (engl.: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) Weg (Trapani et al., 2002). Neben der direkten Lyse von Zellen können NK-Zellen auch Zytokine und Chemokine freisetzen, u.a. IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10, RANTES (CCL-5), MIP-1 α (CCL-3) und -1 β (CCL-4) und damit, ähnlich wie T-Zellen, die nachfolgende Immunantwort beeinflussen, indem sie eine pro- oder anti-inflammatorische Richtung vorgeben (Cooper et al., 2001; Robertson, 2002). Gegenüber normalen, gesunden Zellen weisen NK-Zellen eine Art „Toleranz“ auf (Selbsttoleranz), d.h. sie attackieren gesundes Gewebe in der Regel nicht.

2.3.1 Subgruppen der NK-Zellen

Die NK-Zellen, welche CD3-negativ und CD56-positiv (NCAM) sind, werden in unterschiedliche Subtypen untergliedert (Orange et al., 2006), wobei die gängigste Einteilung die in zwei Hauptgruppen ist. Hier werden die NK-Zellen anhand ihrer Expressionsdichte von CD56 und Fc γ -Rezeptor III (CD16) unterteilt (Abb. 2-1) (Lanier et al., 1986).

NK-Zellen mit hoher Expression von CD56 und niedriger oder fehlender Expression von CD16 (CD56^{hoch} CD16^{+/-}) machen etwa 10 % der NK-Zellen im Blut aus. Sie verfügen über ein schwaches zytotoxisches Potential, können aber hohe Mengen an Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , sezernieren (Jacobs et al., 1992; Cooper et al., 2001).

Durch die zytokinvermittelte Beeinflussung der nachfolgenden spezifischen Immunantwort wird den CD56^{hoch} NK-Zellen eher eine regulatorische Funktion zugeschrieben. Hauptsächlich wird das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A - selten Killerzell-immunglobulinähnliche Rezeptoren (KIR) bzw. immunglobulinähnliche Transkripte 2 (ILT2) - von dieser Subgruppe exprimiert.

Der CD56^{hoch} CD16^{+/-} NK-Subgruppe gegenüber stehen die NK-Zellen mit niedriger Expression von CD56 und hoher Expression des CD16 (CD56^{niedrig} CD16⁺). Sie stellen 90 % der NK-Zellen im Blut dar und gelten als die zytotoxischen NK-Zellen, da sie viel mehr Perforin in ihren Granulen haben wie CD56^{hoch} NK-Zellen (Jacobs et al., 2001).

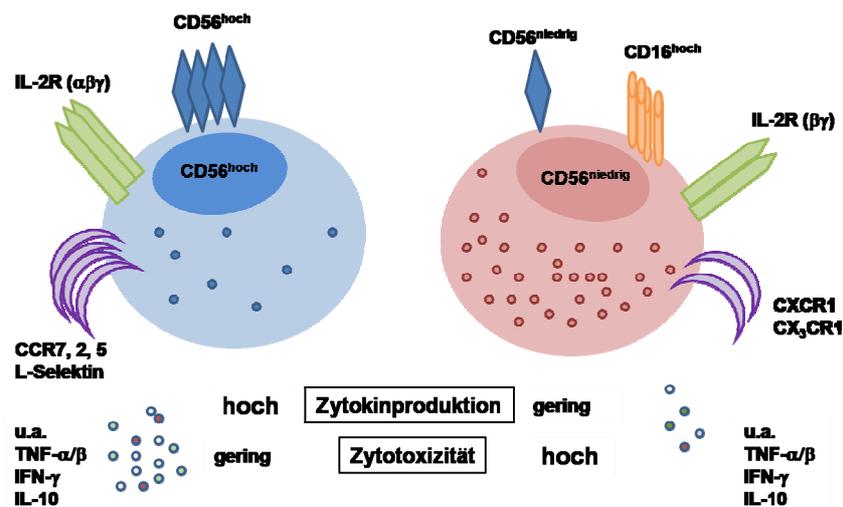


Abb. 2-1: Überblick über die Rezeptoren und Eigenschaften der (a) CD56^{hoch} bzw. (b) CD56^{niedrig} NK-Zellen (modifiziert nach (Cooper et al., 2001))

Die beiden NK-Zell-Subpopulationen unterscheiden sich vor allem in der Expression von CD56 und CD16. Aufgrund der höheren Expression von zytotoxischen Granula in den CD56^{niedrig} NK-Zellen wird ihnen vorrangig zytotoxische Aktivität zugeschrieben, wohingegen CD56^{hoch} NK-Zellen vor allem für eine Zytokinproduktion verantwortlich sein sollen.

Der aktivierende Rezeptor NKG2D und die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NZR; NKp30, NKp44, NKp46) zeigen eine vergleichbare Expression auf beiden Subgruppen (Bauer et al., 1999; Sivori et al., 2000). Beide Gruppen exprimieren ein unterschiedliches Repertoire sowohl an Zytokin- und Chemokinrezeptoren als auch an Adhäsionsmolekülen. So werden beispielsweise CCR7 (CC-Chemokin Rezeptor 7) und CD62L (L-Selektin), welche für die Migration in die sekundären lymphatischen Organe nötig sind, hauptsächlich von CD56^{hoch} NK-Zellen exprimiert. Dadurch wird diese Subgruppe in Lymphknoten (75 % der NK-Zellpopulation) und Milz (50 % der NK-Zellpopulation) in höherer Frequenz gefunden als im Blut (Frey et al., 1998).

2.3.2 Rezeptoren der NK-Zellen

NK-Zellen können zwischen infizierten bzw. entarteten und gesunden Zellen unterscheiden. Da sich der Aktivierungszustand einer NK-Zelle auf die Gesamtheit der eingehenden Signale bezieht, unterliegt er einem fein regulierten Gleichgewicht. Die HLA-Klasse-I-Moleküle interagieren mit inhibierenden Rezeptoren auf NK-Zellen, wodurch ein inhibitorischer Signalweg ausgelöst wird. Dadurch sind HLA-Klasse-I-positive körpereigene Zellen vor einem Angriff durch NK-Zellen geschützt. Zellen, die aufgrund einer Virusinfektion oder Transformation ihre HLA-Expression reduziert oder verloren haben und somit einer ZTL-

Erkennung entgehen würden, können von NK-Zellen eliminiert werden, da das Wegfallen des inhibierenden HLA-Klasse-I-Signals eine Aktivierung der NK-Zellen ermöglicht. Dieses Konzept der NK-Zellregulation wurde von Klas Kärre in seiner „missing self“-Hypothese formuliert (Ljunggren et al., 1990).

Zusätzlich zu dem Verlust von HLA-Klasse-I-Molekülen tritt in transformierten oder virusinfizierten Zellen die Expression aktivierender Liganden – meist Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D – auf. Auf Grund dieser Stress-Liganden können NK-Zellen auch bei Anwesenheit inhibitorischer HLA-Moleküle aktiviert werden. Abb. 2-2 zeigt schematisch Mechanismen, die zur NK-Zell-Aktivierung führen können.

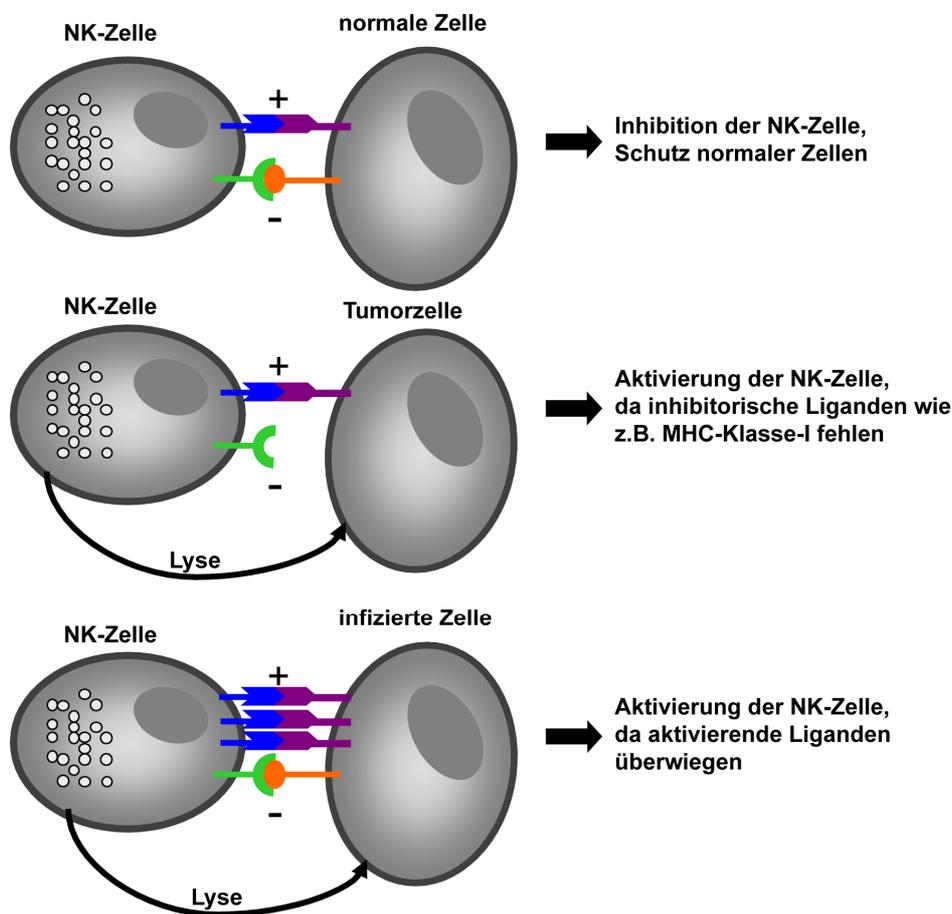


Abb. 2-2: Regulation der NK-Zellen durch aktivierende und inhibitorische Rezeptoren

Vereinfachte, schematische Darstellung der NK-Zell-Regulation. (a) inhibitorische (-) und aktivierende (+) Rezeptoren stehen miteinander im Gleichgewicht. So sind beispielsweise gesunde Zellen durch die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen (orange) geschützt. Werden diese auf Grund einer Transformation herunterreguliert (b), kommt es zur Aktivierung der NK-Zellen und zur Lyse der Zielzellen. (c) Überwiegen die aktivierenden Liganden gegenüber den inhibitorischen, so kann Zellyse, auch bei Anwesenheit von inhibitorischen Liganden, stattfinden (adaptiert von (Raulet et al., 2006)).

Erkannt werden die MHC-Klasse-I-Moleküle von Rezeptoren auf NK-Zellen, die sich in verschiedene Familien unterteilen lassen. So werden HLA-A, -B und -C Moleküle von Rezeptoren der „killer cell Ig-like“ Rezeptor Superfamilie (KIR) erkannt.

CD94, welches von allen NK-Zellen exprimiert wird, kann sowohl mit dem inhibitorischen NKG2A-Rezeptor, als auch mit dem aktivierenden Rezeptor NKG2C ein Heterodimer ausbilden. Diese beiden Heterodimere bilden zusammen mit dem NKG2D-Rezeptor die Gruppe der C-Typ-Lektin-Rezeptoren. Die Liganden des Homodimers NKG2D sind MICA (engl.: MHC class I chain-related gene, MIC) und MICB sowie die ULBPs (engl.: unique long 16-binding protein, ULBP), die sowohl von einigen Tumorzellen, als auch von infizierten Zellen exprimiert werden können (Cerwenka et al., 2003; Raulet, 2003). Die Expression der MHC-kodierten MIC-Moleküle wird durch Zellstress bzw. genotoxischen Stress, sowie virale und bakterielle Infektion induziert und ist mit einer malignen Transformation assoziiert (Raulet, 2003; Gasser et al., 2005). NKG2D ist mit dem Adaptormolekül DAP10 assoziiert, welches ein Bindungsmotiv für die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) besitzt und somit im phosphorylierten Zustand diese binden kann (Billadeau et al., 2003). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass *in vivo* eine antitumorale Immunreaktion ausgelöst werden kann, wenn Tumorzellen mit Liganden für NKG2D transfiziert wurden (Cerwenka et al., 2001).

Die einzigen für NK-Zellen spezifischen Marker sind die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NZR) NKp30 (CD337), NKp44 (CD334) und NKp46 (CD335), die alle zur Ig-Superfamilie gehören. Sie assoziieren mit unterschiedlichen Signaladaptormolekülen. So ist CD3 ζ mit NKp30, CD3 ζ -Fc ϵ RI γ mit NKp46 und DAP12 mit NKp44 assoziiert (Moretta et al., 2001). Die Signalweiterleitung erfolgt über die in den Adaptoren enthaltenen ITAMs, an welche SYK und ZAP70 Kinasen binden und somit zur Aktivierung der PI3-Kinase führen (Abb. 2-3). Die Liganden der NZR sind weitgehend unbekannt, jedoch ist eine Bindung von NKp44 und NKp46 an Hämagglutinin von Influenza-Viren beschrieben (Mandelboim et al., 2001; Arnon et al., 2004). Ebenso erkennen NZR Heparinsulfate auf ihren Zielzellen, von denen postuliert wird, dass sie als Zielstrukturen virusinfizierter Zellen fungieren, sowie bei der Abtötung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen (Bloushtain et al., 2004). Während NKp30 und NKp46 auf allen NK-Zellen exprimiert werden, wird NKp44 nur nach Aktivierung – z.B. durch IL-2 – induziert.

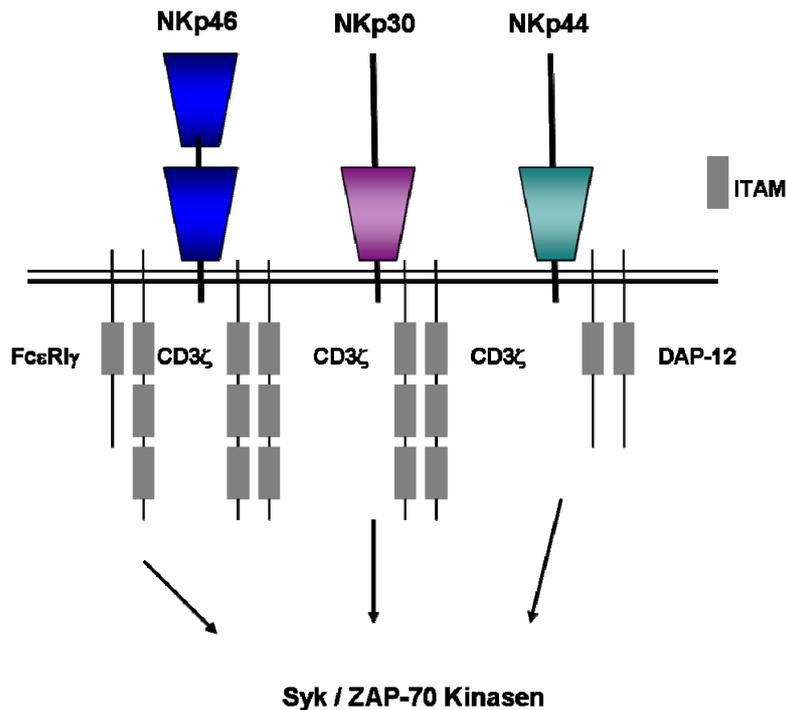


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren und deren Adaptormoleküle

NKp46, NKp30 und NKp44 gehören zu den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren. Sie assoziieren mit unterschiedlichen ITAM-enthaltenden Signaladaptormolekülen. So ist CD3ζ mit NKp30, CD3ζ-FcεRIγ mit NKp46 und DAP12 mit NKp44 assoziiert. Die Signalweiterleitung erfolgt über Syk und ZAP-70 Kinasen. ITAM = immunoreceptor tyrosine based motif

Die Rezeptoren 2B4 (CD244), NTB-A (NK-, T-, B-cell antigen), CRACC (CD2-like receptor-activating cytotoxic cells, CD319) und DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1, CD226) gehören zur Familie der SLAM-verwandten Rezeptoren (engl.: signaling lymphocyte activation molecule). Sie besitzen keine eigene ITAM-Domäne und sind nicht mit ITAM-enthaltenden Molekülen assoziiert (Stark et al., 2006). Stattdessen rekrutiert 2B4 das SLAM-assoziierte Protein (SAP) sowie Fyn mittels immuntirosinbasierter Schaltermotive (ITSM) (Chen et al., 2004; Eissmann et al., 2005) und leitet das Signal so in den PI3-Kinase-Weg ein. Der Ligand von 2B4 ist CD48, welches von hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Brown et al., 1998). Die Bindung von Liganden an die Rezeptoren 2B4, NTB-A und CRACC induziert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen (Stark et al., 2006). Studien haben aber auch gezeigt, dass 2B4 die NK-Zell-Effektorfunktion ebenfalls inhibieren kann. Ausschlaggebend hierfür ist, welches SH2-enthaltende Adaptorprotein an das Schaltermotiv in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors bindet. Mögliche Proteine sind SAP und EAT2 (engl: EWS-activated transcript 2), wobei 2B4-SAP-Fyn-Komplexe NK-Zellen aktivieren und 2B4-EAT2-Komplexe diese inhibieren (Abb. 2-4) (Veillette, 2006).

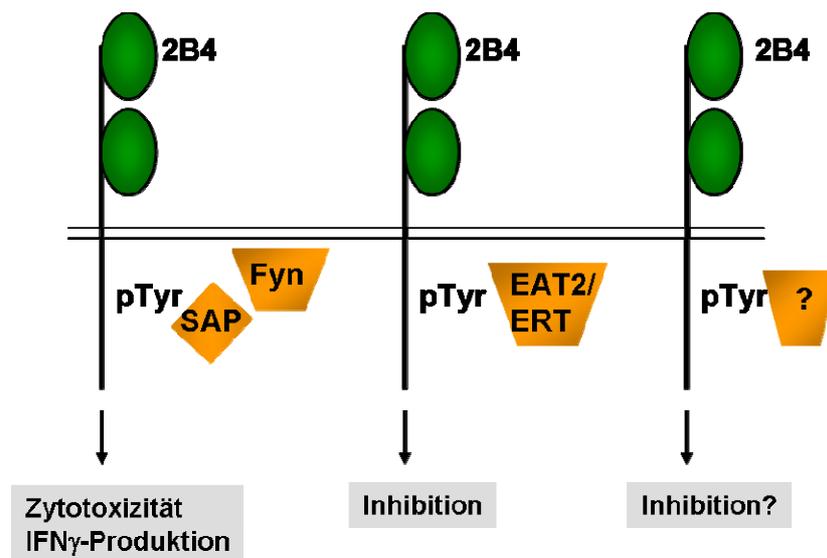


Abb. 2-4: Schematische Darstellung des 2B4-Rezeptors (CD244), dessen mögliche Adapterproteine und resultierende NK-Funktion (Veillette, 2006)

Der 2B4-Rezeptor besitzt ein Schaltermotiv (pTyr) in seiner zytosolischen Domäne, an welches verschiedene Adaptermoleküle binden können. Die Bindung von SAP und Fyn aktiviert die NK-Zelle, wohingegen die Bindung von EAT2/ERT oder von unbekannten Proteinen die NK-Zelle inhibiert.

Ein weiterer aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen ist der Fc γ -Rezeptor III (CD16), durch welchen sie zur antikörpervermittelten Zytotoxizität (ADCC) befähigt sind. Dabei binden Antikörper von opsonierten Partikeln mit ihrem Fc-Teil an CD16 und lösen so eine Quervernetzung der Rezeptoren aus, welche die NK-Zellen über CD3 ζ aktiviert. Eine höhere Dichte von CD16 auf der Oberfläche ist dabei charakteristisch für NK-Zellen mit höherer zytotoxischer Aktivität (Perussia, 1998).

Abschließend zeigt Abb. 2-5 eine Übersicht der inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen und deren Liganden.

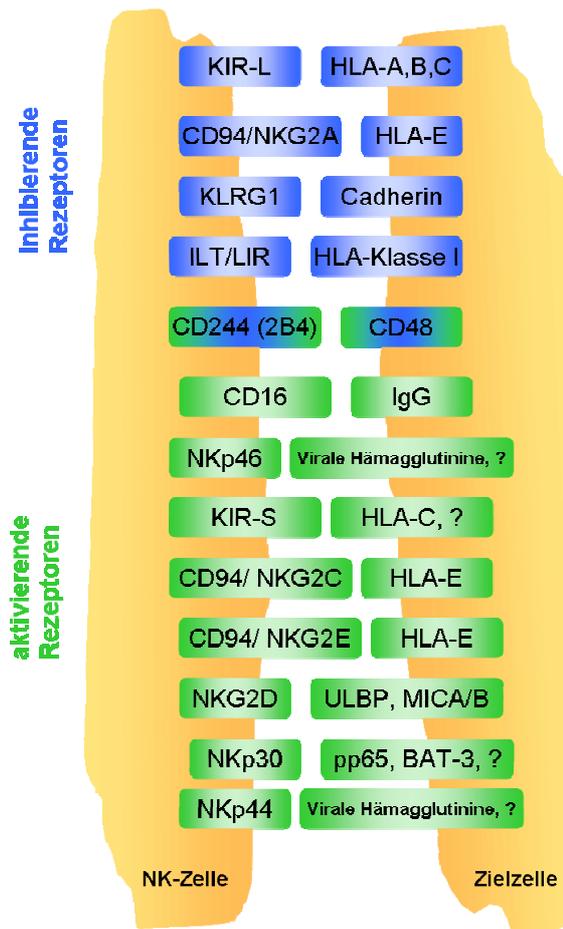


Abb. 2-5: Übersicht verschiedener NK-Zellrezeptoren

Gezeigt ist eine Auswahl der aktivierenden (grün) und inhibierenden (blau) Rezeptoren auf NK-Zellen und deren Liganden auf Zielzellen. Der 2B4-Rezeptor (blaugrün) kann sowohl aktivierend als auch inhibierend sein.

2.4 Die Effektorfunktion der NK- und T-Zellen

2.4.1 Sekretorische Aktivität

Die Aktivierung der NK-Zellen resultiert in der Ausführung unterschiedlicher Effektormechanismen. So sezernieren NK-Zellen eine Reihe wichtiger Zytokine und Chemokine und beeinflussen somit den Verlauf einer Immunreaktion. Sie produzieren beispielsweise $\text{IFN-}\gamma$, welches die Differenzierung von T-Helfer-Zellen anregt, eine starke antimycobakterielle und antivirale Wirkung aufweist und die MHC-Expression steigert (Rock et al., 2002). Die virale Replikation in infizierten Zellen kann durch $\text{IFN-}\alpha$ und $\text{IFN-}\beta$ gehemmt werden. Weitere wichtige von NK-Zellen produzierte Zytokine sind $\text{TNF-}\alpha$, welches zu

Beginn wichtiger proinflammatorischer Zytokinkaskaden steht (O'Shea et al., 2002), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), IL-5, -6, -10, und -13 sowie die Chemokine CCL-3, CCL-4 und CCL-5 (Cooper et al., 2001).

Ebenso wie die NK-Zellen produzieren die zytotoxischen T-Zellen nach Zielzellerkennung entzündungsfördernde Zytokine wie IFN- γ und TNF- α . Da IFN- γ die MHC-Expression auf entarteten und virusinfizierten Zellen erhöhen kann, führt dies zu einer verstärkten Aktivierung der ZTL und somit zu einer Verstärkung der weiteren Immunantwort (Gastl et al., 1996).

2.4.2 Zytotoxische Aktivität

Neben der Zytokinsekretion ist die Zytotoxizität – Induktion von Selbsttot (Apoptose) - eine weitere wichtige Effektorfunktion der NK- und T-Zellen. Dies kann einerseits durch die Interaktion des Rezeptors Fas (CD95, Todesrezeptor), welcher sich auf Zielzellen befindet, mit dem Fas-Liganden (CD95-L) auf ZTL bzw. NK-Zellen oder andererseits durch die Ausschüttung zytotoxischer Effektormoleküle erfolgen (Barry et al., 2002). Hierbei werden Granula, welche mit lytischen Proteinen, wie Perforin und Granzymen, gefüllt sind, durch gerichtete Exozytose in die immunologische Synapse entleert und lösen nach Aufnahme in die Zielzelle Apoptose aus (Trapani et al., 2002; Bossi et al., 2005). Im Gegensatz zu den T-Zellen, in welchen die lytischen Proteine induziert werden müssen, werden von den NK-Zellen die lytischen Proteine konstitutiv exprimiert und gespeichert (Trapani, 2001). Polyperforin, welches in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen aus Perforinmonomeren entsteht, erzeugt Löcher in der Membran der Zielzellen, was das Eindringen der apoptoseeinleitenden Granzyme und die Zerstörung der Zellintegrität zur Folge hat (Krahenbuhl et al., 1991; Shi et al., 1992). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Perforin in physiologischer Konzentration keine Poren in der Plasmamembran der Zielzelle bildet, sondern zusammen mit Granzymen über Endozytose in die Endosomen aufgenommen wird und dort durch Membranzerstörung die Freisetzung der Granzyme in die Zielzelle ermöglicht (Froelich et al., 1996; Metkar et al., 2002). Die in das Zytosol gelangten Granzyme lösen eine Signalkaskade aus, die letztendlich in Apoptose in der Zielzelle resultiert (Lieberman, 2003). Die Exozytose sekretorischer Lysosomen - auch Degranulation genannt - kann durch den Nachweis der lysosomalen Membranglykoproteine CD107a und CD107b (LAMP1 und LAMP2) auf der Zelloberfläche untersucht werden. Dazu wird eine CD107-Oberflächenfärbung mit NK-Zellen und ZTL durchgeführt, welche positiv ist, wenn die Zellen nach Stimulation degranuliert haben (Bryceson et al., 2005).

2.4.3 Signaltransduktion in T- und NK-Zellen

Die Signaltransduktionswege in T- bzw. NK-Zellen führen zur Transkriptionsaktivierung, die für Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktionen (wie Zytokinproduktion) notwendig ist, oder zur Reorganisation des Zytoskeletts.

Abb. 2-6 zeigt die für diese Arbeit relevanten Signalkaskaden in schematischer und vereinfachter Darstellung. Die Signaltransduktion wird bei T-Zellen über den TZR und bei NK-Zellen über die aktivierenden Rezeptoren (z. B. NZR, NKG2D) initiiert. Die Phosphorylierung durch Phosphotyrosinkinase (PTK) der ITAM-Domänen in CD3 ζ -Ketten, DAP12 oder FC ϵ R1 γ , stellt den ersten Schritt der T- bzw. NK-Zellaktivierung dar. Vorab wurden Fyn und die PTK der Src-Familie LCK durch CD45 (dem gemeinen Leukozytenantigen, welches intrazelluläre Thyrosinphosphatase-Aktivität aufweist) aktiviert. Dieser Vorgang erlaubt es nun Proteinen, die spezifische Tyrosinphosphat-Bindungseigenschaften haben (sogenannte Src-Homologien-2(SH2)-Domänen), an die phosphorylierten ITAMs zu binden. Hierbei spielt die ZAP70-PTK eine wichtige Rolle. Sie bindet an die phosphorylierten ITAMs und wird dabei von LCK phosphoryliert und aktiviert. Die aktivierte Kinase unterstützt nun die weiteren intrazellulären Signalereignisse. Dabei wird LAT (engl.: linker of activation in T cells) phosphoryliert, welches mit der Plasmamembran assoziiert ist und als eine Brücke bei der Weiterleitung der Aktivierungssignale von der Zellmembran ins Innere der Zelle fungiert. Dieses Protein ist nach der Phosphorylierung eine wichtige Bindungsstelle für verschiedene Proteine mit SH2-Domänen, wie zum Beispiel SOS, GRB2, Phospholipase C- γ (PLC- γ), und SLP-76, wodurch sich ein wichtiger Signalkomplex ausbildet. Nach Phosphorylierung und Aktivierung der PLC- γ katalysiert diese die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-trisphosphat (IP₃). IP₃ bewirkt einen erheblichen Anstieg von Kalziumionen in der Zelle. Hierdurch können kalziumabhängige Enzyme, z.B. das Kalziumbindungsprotein Calmodulin, aktiviert werden. Durch die Mitwirkung von DAG und dem intrazellulären Kalziumanstieg wird eine weitere Signalkaskade in Gang gesetzt, welche die Proteinkinase C (PKC β 2), eine Serin/Threonin-Phosphokinase, aktiviert. PKC wiederum induziert über die Phosphorylierung von AKT die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor kappa B). DAG führt auch zur Aktivierung von Ras, welches nun in der Lage ist, eine Kaskade von Proteinkinase, die MAP-Kinasen (engl.: mitogen-activated protein kinase) zu denen auch ERK (engl.: extracellular signal-regulated kinase) zählt, zu aktivieren. Dies hat die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (engl.: activating protein 1) zur Folge. Die PI3-Kinase (PI3K) wird meist durch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptortyrosinkinasen, aber auch durch Ras oder PKC aktiviert. PI3K phosphoryliert PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und produziert PI(3,4,5)P₃

(Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat), über welche dann AKT aktiviert wird. Von AKT gehen verschiedene Signalwege aus, die Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Transkription und Translation regulieren. Einer davon ist die Phosphorylierung von GSK3 (engl.: glycogen synthase kinase 3), welche durch AKT-vermittelte Phosphorylierung deaktiviert wird und so den Verbleib des Transkriptionsfaktors NFAT (engl.: nuclear factor of activated T-cells) im Nukleus ermöglicht. Ein anderer Signalweg ist die Phosphorylierung von I κ B (engl.: inhibitor of kappa B), welches nach Phosphorylierung degradiert wird und die Aktivierung von NF κ B erlaubt.

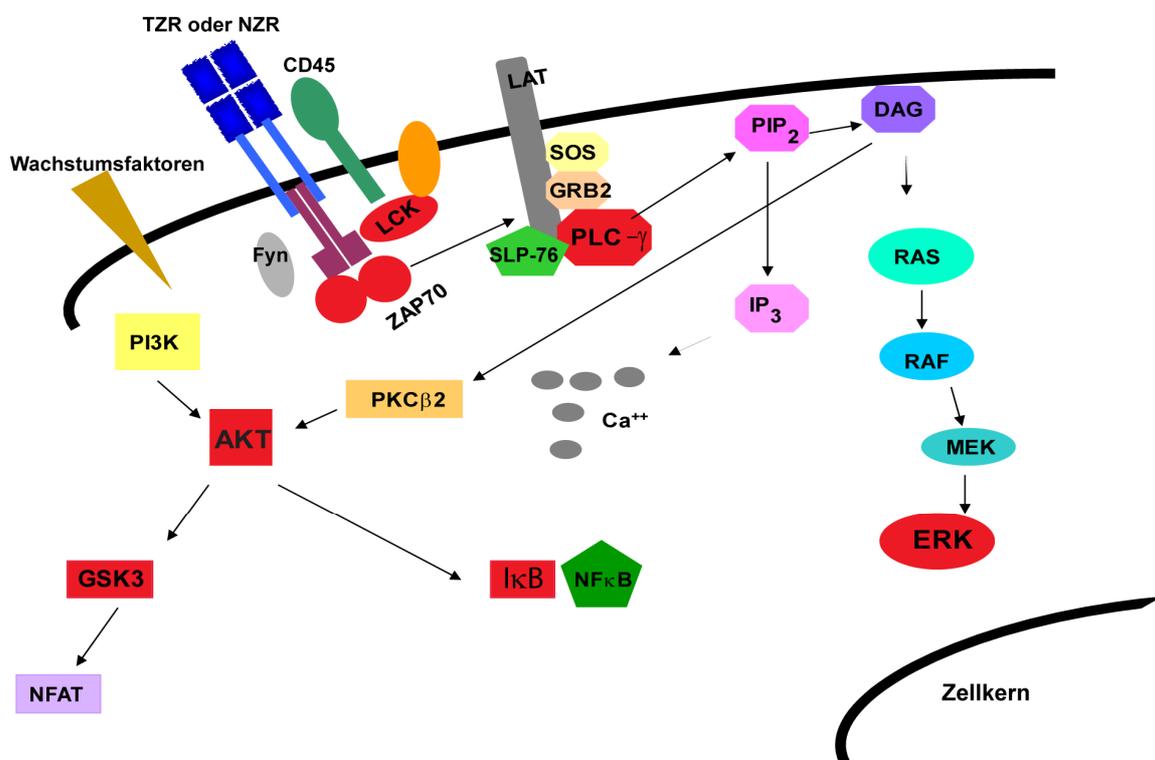


Abb. 2-6: Schematische und vereinfachte Darstellung der Signalwegen in T- und NK-Zellen (Beschreibung siehe Text)

In rot sind die Proteine hervorgehoben, deren Phosphorylierung nach Stimulation in dieser Arbeit untersucht wurden.

2.5 Myeloische Zellen

Neben den T- und NK-Zellen stellen myeloische Zellen einen weiteren wichtigen Zelltyp des Immunsystems dar. Konventionelle myeloische dendritische Zellen (DZ) befinden sich als unreife DZ in peripheren Geweben, wo sie extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen, diese prozessieren und als Peptide auf ihrer Oberfläche im

HLA- (humanes Leukozytenantigen) Kontext präsentieren. Durch proinflammatorische Zytokine reifen DZ, verlassen das Gewebe und wandern in den Lymphknoten, wo sie mit T-Zellen in Kontakt treten. Nun können sie eine spezifische Immunantwort gegenüber dem präsentierten Peptid induzieren, indem sie T-Zellen mit dem passenden TZR aktivieren. Dies geschieht durch die TZR-MHC-Peptid-Interaktion (pMHC) zusammen mit Signalen über kostimulatorische Moleküle und die Sekretion von Zytokinen wie IL-12.

Auch im Tumorkontext spielen myeloische Zellen eine wichtige Rolle. Sie können beispielsweise durch Förderung der Angiogenese und Abbau des Stromas das Tumorstadium begünstigen. Durch Tumorfaktoren wird eine Differenzierung myeloischer Zellen zu Suppressorzellen begünstigt. In murinen und humanen Tumoren wurden tumorassoziierte Makrophagen (TAM) beschrieben, die durch die Produktion inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , TNF α und IL-6 das Überleben des Tumors fördern (Balkwill et al., 2005). Des Weiteren sind MDSC (engl.: myeloid derived suppressor cells) beschrieben, die durch Zellkontakt oder lösliche Faktoren wie NOS (Nitrit-Oxid-Synthase) und ARG (Arginase) tumorspezifische Immunantworten unterdrücken können (Nagaraj et al., 2009).

2.6 Das humane Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (engl.: renal cell carcinoma, RCC) geht vom proximalen Tubulusepithel der Niere aus und ist daher ein epithelialer Tumor. Er ist mit einer Häufigkeit von etwa 3 % aller Tumoren im Erwachsenenalter der dritthäufigste Tumor der Harnwege und steht an sechster Stelle aller krebisbedingten Todesursachen. Dennoch ist er ein vergleichsweise seltener Tumor mit vielfältiger Klinik, der häufig erst spät entdeckt wird. Männer erkranken mit einem Verhältnis von 3:2 häufiger am Nierenzellkarzinom als Frauen. Meist wird die Erkrankung zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr diagnostiziert. In Europa treten etwa 30.000 Neuerkrankungen pro Jahr auf.

Im „Heidelberger Workshop“ wurden fünf Hauptgruppen der Nierenzellkarzinome klassifiziert: klarzelliges (70 % aller Nierentumore), papilläres (10-15 % aller Nierentumore), chromophobes (5 % aller Nierentumore), medulläres (<1 % aller Nierentumore) und unklassifiziertes Nierenzellkarzinom (4-5 % aller Nierentumore).

Die Klassifikation und Stadieneinteilung, sowie der histologisch beurteilte Grad der Tumordifferenzierung für das klarzellige Nierenzellkarzinom sind in Tabelle 2-1 dargestellt (Oberneder, 2003).

Tabelle 2-1: Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach den Richtlinien des Union International Contre le Cancer (UICC), Stand 2003 (Quelle: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Urogenitale Tumoren, Tumorzentrum München)

T: Primärtumor			
pTx	Primärtumor kann nicht eingestuft werden		
pT0	Kein Nachweis eines Primärtumors		
pT1	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 7 cm, auf die Niere begrenzt		
- pT1a	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 4 cm, auf die Niere begrenzt		
- pT1b	Primärtumor größer als 4 cm, aber maximal 7 cm im größten Durchmesser, auf die Niere begrenzt		
pT2	Primärtumor mit einem Durchmesser von mehr als 7 cm, auf die Niere begrenzt		
pT3	Tumor dehnt sich in große Venen aus oder invadiert die ipsilaterale Nebenniere oder perirenales Gewebe, durchbricht aber nicht die Gerota'sche Faszie		
- pT3a	Tumor invadiert die ipsilaterale Nebenniere oder perirenales Gewebe, durchbricht aber nicht die Gerota'sche Faszie		
- pT3b	Tumor dehnt sich makroskopisch in die Nierenvene oder die V.cava aus		
pT4	Tumor durchbricht die Gerota'sche Faszie		
N: Regionale Lymphknoten (hilär, abdominal paraaortal und paracaval)			
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
N0	Kein Anhalt für regionale Lymphknotenmetastasen		
N1	Singuläre regionale Lymphknotenmetastasen		
N2	Mehr als eine regionale Lymphknotenmetastase		
M: Fernmetastasen			
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden		
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen		
M1	Nachweis von Fernmetastasen		
Stadiengruppierung			
Stadium I	pT1	N0	M0
Stadium II	pT2	N0	M0

Stadium III	pT3	N0/1	M0
	pT1-3	N1	M0
Stadium IV	pT4	N0/1	M0
	jedes pT	N2	M0
	jedes pT	jedes N	M1
Histologisches Grading			
G1	gut differenziert		
G2	mäßig differenziert		
G3/G4	schlecht differenziert/undifferenziert		

Das Ausmaß der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose ist entscheidend für die Prognose. So führt das Vorliegen von Metastasen zu einer dramatischen Verschlechterung der Prognose. Die 5-Jahresüberlebensrate für das Stadium I liegt noch bei 90-100 %, für das Stadium II bei 75-95 %, für das Stadium III bei 60-70 % und für das Stadium IV nur noch bei 15-30 %. Leider werden die Tumoren oftmals erst in einem sehr späten Stadium diagnostiziert, da Symptome im frühen Stadium fehlen. Metastasen treten mit absteigenden Häufigkeiten in Lunge, Lymphknoten, Skelett, Leber und Nebennieren auf (Oberneder et al., 2003).

Therapiestandard ist die chirurgische Entfernung des Primärtumors und resektabler Metastasen, da das Nierenzellkarzinom eine hohe Resistenz sowohl gegen medikamentöse als auch gegen Strahlentherapie aufweist. In der Regel ist das metastasierte Nierenzellkarzinom nicht heilbar. Die radikale Nephrektomie kann bislang noch als Standardtherapie bezeichnet werden, auch wenn der Trend hin zu mehr limitierten, d.h. nierenerhaltenden Operationsverfahren geht.

Das Nierenzellkarzinom wird wie das Melanom zu der kleinen Gruppe der immunogenen Tumoren gezählt, da das RCC eine große Anzahl an tumorinfiltrierender Lymphozyten besitzt und einige Patienten auf Immuntherapie ansprechen. Bei 0,2-0,5 % der Tumoren sind spontane Remissionen von Primärtumor oder Metastasen zu beobachten, was auf eine Reaktion des Immunsystems gegen den Tumor zurückzuführen ist (De Riese et al., 1991). Dies und die Tatsache, dass gezeigt werden konnte, dass TIL nach Isolierung aus dem Tumor Aktivität gegen Tumorzellen besitzen können, lässt auf Erfolge durch Immuntherapien hoffen (Schendel et al., 1997). In den letzten Jahren wurden verschiedene Chemo- und Immuntherapieprotokolle angewandt, ohne die schlechte Prognose der Patienten wesentlich zu verbessern. In circa 6 % der Fälle konnte die alleinige Chemotherapie komplette Remissionen erreichen, wohingegen die Immuntherapie mit Interferon- α und/oder Interleukin-2 komplette Remissionen bei 10-20 % der Fälle erreichen konnte (Lopez

Hanninen et al., 1996). Die Hochdosis IL-2-Therapie konnte zwar längere komplette oder partielle Remissionen erreichen, jedoch gehen diese Vorteile mit einer signifikanten Zunahme der Toxizität einher. Inzwischen stellt die kombinierte Immun-Chemotherapie nach operativer Entfernung des Primärtumors die standardisierte und am häufigsten angewendete Behandlung des metastierten Nierenzellkarzinom in Deutschland dar. Bei dieser Therapie wird systemisch IFN- α , IL-2 und 5-Fluoruracil (Atzpodien et al., 1990) gegeben und es werden Ansprechraten von 20-30 % beschrieben, die bei etwa der Hälfte zu kompletten oder partiellen Remissionen des Tumors führten (Lopez Hanninen et al., 1996; Fishman et al., 2003). Weitere Studien zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen für das Nierenzellkarzinom beinhalten den adoptiven Transfer von in vitro aktivierten autologen T-Zellen, sowie die Verabreichung weiterer Zytokine, tumorspezifischer Antikörper oder Peptide, die jeweils eine Stimulation des Immunsystems gegen den Tumor bewirken sollen. Neuerdings laufen auch erfolversprechende Studien mit Tyrosinkinaseinhibitoren. Hierbei spielt die gezielte Inhibition des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) eine wichtige Rolle (Rini, 2007). Dies kann einerseits durch die Blockade des Liganden mittels monoklonaler Antikörper (Bevacizumab) oder durch die Blockade des Rezeptors mittels kleiner Moleküle (Sunitinib, Sofarenib), welche die Tyrosinkinasen inhibieren, geschehen. Mit der Sunitinibtherapie konnten Ansprechraten von über 31 % bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom erreicht werden (Rini, 2007), doch wurde bisher noch keine Heilung durch Tyrosinkinaseinhibitoren beobachtet werden. Zusätzlich kommt es zu einer schnellen Wiederkehr des Tumors nach Absetzen der Therapie.

Somit bleibt die Immuntherapie derzeit die einzige heilende Therapie. Da das wünschenswerte Ziel nur bei wenigen Patienten eintritt und zudem schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten, ist die Immuntherapie derzeit nicht als Standardtherapie einzusetzen. Ein besseres Verständnis der für eine Tumorabstoßung notwendigen immunologischen Effektorfunktionen ist nötig, um die Situation zu verbessern. Eine Möglichkeit das Wissen voranzutreiben ist die Analyse der tumorinfiltrierenden Lymphozyten, die im RCC zahlreich vorkommen, aber offensichtlich nicht zur Tumorabstoßung befähigt sind.

2.7 Tumorinfiltrierende Lymphozyten

Das Lymphozyteninfiltrat des Nierenzellkarzinoms beinhaltet T-Zellen und NK-Zellen (Schendel et al., 1997; Van den Hove et al., 1997; Schleyden et al., 2006), wohingegen B-Zellen selten zu finden sind. Neben den Lymphozyten sind auch myeloische Zellen - darunter Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DZ) - als Infiltrat im Nierenzellkarzinom beschrieben worden (Thurnher et al., 1996). Am ausführlichsten

charakterisiert sind bisher die infiltrierenden T-Zellen, wobei zahlenmäßig die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ überwiegen (Tomita et al., 1991; Nakano et al., 2001). Mehrere Forschergruppen konnten anhand funktioneller Analysen zeigen, dass einige infiltrierende CD8⁺ T-Zellen tumorspezifische Antigene in vitro erkennen und antigenexprimierende Tumorzellen lysieren können, wobei unverändertes Nierenparenchym nicht erkannt wurde (Koo et al., 1991; Finke et al., 1992; Schendel et al., 1993; Leisegang et al., 2010). In einem Fall waren die spezifischen T-Zellen auch nach einem Zeitraum von ca. 10 Jahren im peripheren Blut von Patienten nachzuweisen (Jantzer et al., 1998). Die Effektivität infiltrierender Lymphozyten konnten Rosenberg et al in einem Mausmodell zeigen, in dem durch adoptiven Transfer von TIL ein etablierter Tumors eliminiert wurde (Rosenberg et al., 1986).

Da im RCC trotz Infiltration mit tumorantigenspezifischen T-Zellen die Abstoßung des Tumors ausbleibt, lässt sich schließen, dass die Effektorfunktion tumorinfiltrierender Lymphozyten im Tumor unterbleibt. Um einem Angriff des Immunsystems zu entkommen, haben Tumore verschiedene Strategien entwickelt, die als Tumor-Escape-Mechanismen beschrieben werden. Es sind bereits verschiedene Tumormimmunevasionsmechanismen beschrieben und je nach Tumor kann der eine oder andere Mechanismus vorherrschen (Marincola et al., 2003).

So stellt sich die Frage, warum die Lymphozyten das RCC zwar so zahlreich infiltrieren und damit eine Veränderung des Normalzustandes zu erkennen scheinen, dort aber keine effiziente Zerstörung der Tumorzellen bewirken. Aus der Beobachtung, dass TIL nach der Entfernung aus dem Tumor reaktiv sein können, resultiert die Annahme, dass das Tumormilieu selbst für die Inaktivierung der Zellen vor Ort verantwortlich sein könnte.

Ein besseres Verständnis, wie die infiltrierenden Effektorzellen in bestimmten Tumortypen beeinflusst sind, wird entscheidend dazu beitragen die Immuntherapie erfolgreicher zu machen.

3 ARBEITSPROGRAMM DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Das Tumorgewebe des Nierenzellkarzinoms ist zahlreich von Lymphozyten infiltriert. Obwohl dies auf eine Erkennung des veränderten Normalzustandes hindeutet, wird die Ausbreitung des Tumors in den wenigsten Fällen verhindert. Trotz zahlreicher Untersuchungen bleibt die Rolle des Immunsystems bei Toleranz und Abstoßung des Nierenzellkarzinoms weitgehend ungeklärt. Die Charakterisierung des Lymphozyteninfiltrats ist einerseits für die Entwicklung neuer wirkungsvoller Immuntherapien und andererseits für das Verständnis bereits angewandter Therapien von entscheidender Bedeutung. Erste Analysen deuten darauf hin, dass die Effektorzellen im Tumor funktionell inaktiv sind, jedoch außerhalb des Tumormilieus reaktivierbar sein können. Allerdings sind bisher nur wenige Mechanismen beschrieben worden, die die funktionelle Inhibierung der Lymphozyten erklären könnten. Durch die Langzeitkultivierung der TIL, wie sie für die Identifikation von tumorspezifischen T-Zellen und Antigenen benötigt wird, können keine Rückschlüsse mehr über die Eigenschaften der Zellen im Tumorgewebe getroffen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Lymphozyteninfiltrat klarzelliger Nierenzellkarzinome charakterisiert werden. Mittels moderner Multi-Farben-Durchflusszytometrie wurden die NK-Zellen und zytotoxischen Lymphozyten der TIL direkt nach Isolierung aus dem Gewebe auf ihre funktionelle Aktivität und auf die Expression von Zytotoxinen und verschiedenen Oberflächenmarkern hin analysiert. Es wurden tumormilieubedingte Defizite aufgedeckt und Gegenmaßnahmen, die diese reversieren sollten, evaluiert. Um Defekte, die der funktionellen Inhibierung zu Grunde liegen, aufzudecken, wurden Signalkaskaden, also die Phosphorylierung bestimmter Signalproteine, durchflusszytometrisch analysiert. Das Wissen um die Ursachen für eine Inaktivierung der Lymphozyten in situ könnte in Zukunft dazu beitragen durch gezielte Stimulation bestimmter Zellpopulationen eine wirkungsvolle Abwehr des Tumors zu erreichen.

Um den Einfluss und die Auswirkungen des Tumormilieus auf NK-Zellen mechanistisch untersuchen zu können, wurden In-vitro-Modellsysteme entwickelt. Neben der Kultivierung im Beisein von hoher Tumorzellzahl wurde auch das Sphäroidsystem als ein dreidimensionales Kultursystem eingesetzt. Mit der Kenntnis der Mechanismen, die zu dem defizitären NK-Zell-Phänotyp führen, können Maßnahmen entwickelt werden, um die Effizienz immuntherapeutischer Strategien zu verbessern.

4 MATERIAL

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

GERÄT/VERBRAUCHSMATERIAL	HERSTELLER
40 µm Rundfilter	Becton Dickinson, Heidelberg
5 ml Spritzen (für Multistepper)	Eppendorf, Hamburg
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: 137 Caesium)	GammaCell 40, Ottawa, Kanada
Bodenplatten für ELISA (96-Loch)	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Deckgläschen	IDL, Nidderau
Durchflusszytometer, LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Dynal-Magnet MPC-50	Invitrogen, Karlsruhe
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorfcentrifuge	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen (5 ml mit Deckel, Polypropylen)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (klein, Polypropylen)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc, Wiesbaden
Kryostat	Leica Jung CM 3000
Lichtmikroskope (Leica DMLS)	Leica Microsystems, Heidelberg
LumaPlate TM -96 (Filterplatten für CML)	Canberra Packard, Dreieich
MACS Multistand (quadro MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Separation Columns; 25 LS	Miltenyi, Biotec, Bergisch Glattbach
Mehrkanalpipette	Dunn Labortechnik, Asbach
Mehrlochplatten (48- Loch)	Nunc, Wiesbaden
Mehrlochplatten (6-, 12- und 24- Loch)	Nunc, Wiesbaden

Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten, Glas	Peske OHG, München
Pipettenspitzen	Eppendorf/Gilson
Reagenzröhrchen (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenplatten (96-Loch)	PAA Laboratories, Cölbe
Sterilbank	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld
Szintillationsmessgerät (TOPCount)	Canberra Pckard, Dreieich
Transwell 24-Loch-Platten, Porengröße 0,4 µm	Costar, Corning (USA)
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Zellschaber (25 cm)	Greiner, München
Zellsieb Cellstrainer, 100 µM	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25/75/175 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugen für Zellkultur (Megafuge 2.0)	Heraeus Instruments, Hanau

4.2 Chemikalien und fertige Lösungen

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
1 N Salzsäure	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
⁵¹ Cr-Natrimchromat (185 MBq)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
BD Phosflow Cytofix Puffer ®	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Phosflow Perm Puffer II® bzw. III®	Becton Dickinson, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fixogum	Science Services, München
Humanserum (für die Durchflusszytometrie)	Cambrex Corporation, Wiesbaden
Immersionsöl Type F	Leica Microsystems, Wetzlar
Methanol	Merck, Darmstadt
Natronhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Propidiumjodid (PI)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Saponin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt (Main)
Vectashield	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching

4.3 Zellkultur

4.3.1 Verbrauchsmedien und Zusätze

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Accutase®	PAA Laboratories, Cölbe
Agarose (Seaplaque) für Sphäroidherstellung	Biozym, Oldendorf
AIM-V	Invitrogen, Karlsruhe
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen
ERK Inhibitor (PD 98059)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
AKT Inhibitor (Perifosine)	Selleck Chemicals, Houston
Ionomyzin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Diazylglyzerolkinase Inhibitor I (DGK-I)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNase I, Typ IV	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kollagenase IA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
HBSS (10x) ohne CaCl ₂ /MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS (1x) mit 1,26 mM CaCl ₂ /0,5 mM MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
NK-Zell-Negativisolierungs-Kit (Dynabeads untouched human NK cells)	Invitrogen, Karlsruhe
CD8 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD56 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CompBeads (anti Maus IgG, κ)	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ficoll® (Pancoll, Dichte 1,077 g/ml)	Pan Biotech, Aidenbach
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Golgi Stop	Becton Dickinson, Heidelberg

Heparin 2500 IE	Essex Pharma GmbH, München
Humanserum (verschiedener gesunder Spender)	IMI, Helmholtz Zentrum München
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Rekombinantes humanes GM-CSF, Leukine®	Promokine, Heidelberg
Rekombinantes humanes Interleukin-15 (PromoKin)	PromoCell GmbH, Heidelberg
Rekombinantes humanes Interleukin-2 (Proleukin)	Cancernova GmbH, Reute
Rekombinantes humanes Interleukin-4	Promokine, Heidelberg
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe

4.3.2 Medien

RPMI-Basismedium

RPMI 1640

2 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

1 mM nicht-essentielle Aminosäuren

LCL-Medium

RPMI-Basismedium

10% FKS

RCC-Medium

RPMI-Basismedium

12% FKS

T-Zellmedium

RPMI-Basismedium

7,5 % FKS

7,5 % Humanserum (HS)

50 U/ml IL-2

Kulturmedium für myeloische Zellen

AIM-V (serumfrei) + 2 mM L-Glutamin

Einfriermedium für eukaryotische Zellen

RPMI 1640 ohne Glutamin

20 % DMSO

CML-Medium

RPMI-Basismedium

15 % FKS

1x Penizillin/Streptomycin

Verdaupuffer zur Isolierung der TIL bzw. NIL

RPMI 1640

0,1 % BSA

1x Penizillin/Streptomycin

10 mM HEPES

Kollagenase IA, 218 U/ml

DNase I, 435 U/ml

TIL-Kultivierungsmedium

AIM-V

2 mM L-Glutamin

10 % Humanserum (HS)

50 U/ml IL-2

Kokulturmedium/Stimulationsmedium

AIM-V

2 mM L-Glutamin

10 % HS

Aktivierungsmedium für PBL bzw. NK-Zellen

AIM-V

2 mM L-Glutamin

10 % HS

100 - 500 U/ml IL-2

4.3.3 PufferlösungenTrypsin-EDTA-Lösung

2x Stocklösung Trypsin-EDTA

FACS-Puffer

1 % HS

2 mM EDTA

0,1 % Natriumazid

in PBS

MACS-Puffer

0,5 % HS

2 mM EDTA

in PBS

NK-Isolierungspuffer

0,1 % FKS

in PBS

Paraformaldehydlösung

1 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS

Saponinlösungen

0,1 % (w/v) bzw. 0,35 % (w/v) Saponin in PBS

2 % Humanserum

4.4 Zellen

BEZEICHNUNG	CHARAKTERISTIKA	KULTURMEDIUM	QUELLE
B-LCL-LAZ388	Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie	LCL-Medium	Mackenson, A.
Dendritische Zellen (klassische DZ)	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	AIM-V-Medium (GM-CSF, IL-4)	im Labor generiert
K562	humane Erythroleukämiezelllinie CCL-243™	LCL-Medium	ATCC, Rockville, Maryland, USA
KT-195	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2 ⁻	RCC-Medium	DKFZ, Heidelberg
NIL (Normalnieren-infiltrierende Leukozyten)	Gemisch aus Leukozyten, (Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten) Nierenzellen und Zelltrümmern (durch die mechanische Zerkleinerung und den enzymatischen Verdau entstanden)	nicht kultiviert	Patienten der Urologischen Klinik Dr. Castringius, Planegg oder urologische Klinik der LMU, München
NK-Zellen	Negativ isoliert aus PBMZ		gesunde Spender
P815	Maus-Mastozytom Zelllinie TIB-64™	LCL - Medium	ATCC, Rockville, Maryland, USA
PBL (periphere Blutlymphozyten)	CD14-depletierte PBMZ (mittels CD14-MACS Beads, siehe 4.2.3)		gesunde Spender
PBL-Pool	Gemisch von PBL aus vier gesunden Spendern		IMI, Helmholtz Zentrum Muenchen

PBMZ (periphere Blut mononukleäre Zellen)	isoliert aus Vollblutproben		gesunde Spender
RCC-26	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2-positiv	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München
RCC-53	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2-positiv	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München
TIL (tumor- infiltrierende Leukozyten)	Gemisch aus Leukozyten, (Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten) Tumorzellen und Zelltrümmern (durch die mechanische Zerkleinerung und den enzymatischen Verdau entstanden)	TIL-Kultivierungs- medium	Patienten der Urologischen Klinik Dr. Castringius, Planegg oder urologische Klinik der LMU, München
tumorinduzierte dendritische Zellen (RCC-DZ)	in vitro mit Kulturüberstand von RCC-26 zu Tumor dendritische Zellen differenzierte Monozyten	AIM-V-Medium mit 20 % Kultur- überstand von RCC-26	gesunde Spender
ZTL-Klon JB4	humane klonale ZTL Linie, allo-HLA-A2-reaktiv	T-Zellmedium	IMI, GSF
ZTL-Klon TIL26	isoliert aus RCC- Patient 26, HLA-A2-restringiert, tumorantigenspezifisch	T-Zellmedium	IMI, Helmholtz Zentrum Muenchen
ZTL-Klon TyrF8	humane klonale ZTL Linie, HLA-A*0201-restringiert, spezifisch für das Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ -Epitop	T-Zellmedium	Schrier, P., Leiden

4.5 Blutproben

Die in der 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.

4.6 Antikörper

4.6.1 Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

SPEZIFITÄT	MAR- KIERUNG	SPEZIES/ ISOTYP	KLON	HERSTELLER	EIN- SATZ	FÄR- BUNG
2B4 (CD244)	PE	Maus IgG1, κ	C1.7	Beckman Coulter	1:25	OF
Annexin V	FITC	Maus IgG1, κ	VAA-33	Biossource	1:20	OF
CD107a	FITC	Maus IgG1, κ	H4A3	BD	1:20	OF
CD107b	FITC	Maus IgG1, κ	H4B4	BD	1:20	OF
CD11c	FITC	Maus IgG1, κ	3.9	eBioscience	1:20	OF
CD11c	PE	Maus IgG1, κ	B-ly6	BD	1:25	OF
CD14	APC- Alexa Fluor 750	Maus IgG2a, κ	TuK4	Invitrogen	1:50	OF
CD14	Pacific Blue	Maus IgG2a, κ	M5E2	BD	1:25	OF
CD16	Alexa Fluor 700	Maus IgG1, κ	3G8	Bio Legend	1:20	OF
CD163	PerCP- Cy5.5	Maus IgG1, κ	GHI/G1	BioLegend	1:25	OF
CD163	PE	Maus IgG1, κ	GHI/61	BD	1:12	OF
CD19	APC- eFluor 780	Maus IgG1, κ	HIB19	eBioscience	1:20	OF
CD209	APC	Maus IgG2b, κ	DCN46	BD	1:10	OF
CD3	Pacific Blue	Maus IgG1, κ	UCHT1	BD	1:20	OF
CD3	APC-H7	Maus IgG1, κ	SK7	BD	1:20	OF
CD3	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	SK7	BD	1:20	OF

CD3 ζ (CD247)	FITC	Maus IgG2a, κ	G3	AbD Serotec	1:20	IZ
CD4	APC- eFluor 780	Maus IgG1, κ	RPA-T4	eBioscience	1:20	OF
CD45	PeCy7	Maus IgG1, κ	HI30	BD	1:50	OF
CD45	Amcyan	Maus IgG1, κ	2D1	BD	1:10	OF
CD48	FITC	Maus IgG1, κ	J4.57	Beckman Coulter	1:25	OF
CD56	APC	Maus IgG1, κ	N901	Beckman Coulter	1:20	OF
CD56	PE	Maus IgG1, κ	B159	BD	1:10	OF
CD57	FITC	Maus IgG1, κ	TB01	eBioscience	1:20	OF
CD69	FITC	Maus IgG1, κ	FN50	BD	1:20	OF
CD8 α	V500	Maus IgG1, κ	RPA-T8	BD	1:20	OF
CD8 α	AmCyan	Maus IgG1, κ	SK1		1:25	OF
CD8 α	Pacific Blue	Maus IgG1, κ	RPA-T8	BD	1:25	OF
CD8 α	PE	Maus IgG1, κ	RPA-T8	BD	1:50	OF
CD8 α	FITC	Maus IgG1, κ	HIT8a	BD	1:20	OF
DGK- α	unmarkiert	Kaninchen polyklonal		Santa Cruz	1:20	IZ
ERK	unmarkiert	Kaninchen polyklonal		Cell signalling	1:20	IZ
GMP-17	Cy5	Maus IgG1, κ	2G9A1 0F5	Immunotech	1:250	IZ
Granzym B	PE	Maus IgG1, κ	GB11	AbD Serotec	1:50	IZ
IFN- γ	APC	Maus IgG2b, κ	25723.1 1	BD	1:10	IZ
IFN- γ	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	4S.B3	BD	1:25	IZ
IL-2	APC	Ratte IgG2a, κ	MQ1- 17H12	BD	1:20	IZ

Isotyp	FITC	Maus IgG2b	G155-148	BD		1:25	IZ
NKG2D	APC	Maus IgG1, κ	1D11	BD		1:12	OF
NKp46	PE	Maus IgG1, κ	9E2	BD		1:5	OF
p27kip	unmarkiert	Maus IgG2b	225501	R&D Systems		1:100	IZ
pAKT (pS473)	PE	Maus IgG1, κ	M89-61	BD		1:2,5	IZ, F/P
Perforin	FITC	Maus IgG2b, κ	δ G9	BD		1:10	IZ
Perforin	PE	Maus IgG1, κ	B-D48	Santa Cruz		1:20	IZ
Perforin	unmarkiert	Maus IgG2b, κ	δ G9	BD		1:100	IZ
pERK (Thr 202/Tyr 204)	umarkiert	Kaninchen IgG	D13.14.4E	Cell signalling		1:300	IZ, F/P
pLCK (Y505)	PE	Maus IgG1, κ	4/LCK-Y505	BD		1:2,5	IZ, F/P
PLC- γ 2 (Y759)	PE	Maus IgG1, κ	K86-689.37	BD		1:2,5	IZ, F/P
SAP	unmarkiert	Kaninchen polyklonal		Santa Cruz		1:20	IZ
TNF- α	Alexa Fluor 700	Maus IgG1, κ	Mab11	BD		1:20	IZ

OF: Oberflächenfärbung, IZ: intrazelluläre Färbung (wenn nicht anders angegeben mit PFA und Saponin), F/P: BD Cytfix ®/Perm Puffer III ®

4.6.2 Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

SPEZIFITÄT	MARKIERUNG	SPEZIES	KLON	HERSTELLER	EINSATZ
Kaninchen	A488	Ziege	polyklonal	Molecular Probes	1:500
Kaninchen	A647	Ziege	polyklonal	Molecular Probes	1:500

Maus – IgG2b	A488	Ziege	polyklonal	Molecular Probes	1:500
Maus – IgG2b	A647	Ziege	polyklonal	Molecular Probes	1:500

4.6.3 Antikörper zur Stimulation von T-Zellen

SPEZIFITÄT	SPEZIES	KLON	HERSTELLER	EINSATZ
CD3	Maus IgG2a	OKT3	eigene Herstellung E. Kremmer	10 µg/1 x 10 ⁶ Zellen (P815-Beladung) bzw. 1 µg/µl (Quervernetzen)
F(ab) ₂ anti- Maus IgG	Ziege	polyklonal	Serotec	10 µg/ml

4.7 Patientenmaterial

4.7.1 Unbehandelte RCC-Patienten

Bei den untersuchten Tumorgeweben handelte es sich um den Primärtumor. Die in dieser Arbeit untersuchten Nierengewebe wurden von der Urologischen Abteilung des Klinikums Großhadern und der Urologischen Klinik Dr. Castringius in Planegg zur Verfügung gestellt. Alle Tumoren waren Nierenzellkarzinome des klarzelligen Typs. Von jedem Patienten wurde zusätzlich Normalgewebe der tumortragenden Niere asserviert.

PATIENT-ID TUMORGEWEBE	PATIENT-ID NORMALGEWEBE (TUMORTRAGENDE NIERE)	GESCHLECHT ¹	ALTER ² (JAHRE)	TNM – STADIUM ³
RCC27	NN27	M	67	pT3b pN0 Mx G3
RCC28	NN28	M	49	pT2 pN0 Mx G2
RCC30	NN30	M	53	pT3b pN0 Mx G2

RCC31	NN31	M	58	pT3b pNx Mx G2
RCC34	NN34	M	66	pT3b pN0 Mx G3
RCC35	NN35	W	65	pT3b pN2 Mx G3-4
RCC37	NN37	M	50	pT2 pNx Mx G2
RCC38	NN38	M	60	pT2 pNx Mx G3
RCC40	NN40	W	57	pT2 pNx Mx G3
RCC42	NN42	W	72	pT3 pN0 Mx G3
RCC43	NN43	W	67	pT3b pNx Mx G2
RCC44	NN44	M	65	pT3b pNx MX G2
RCC49	NN49	M	38	pT1b pN0 M0 G1
RCC50	NN50	W	62	pT3b pN1 Mx G2
RCC52	NN52	W	73	pT1b pN0 M0 G3
RCC54	NN54	W	65	pT1b pN0 M0 G2

¹ Geschlecht der Patienten. M=männlich, W=weiblich

² Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme

³ Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren nach den Richtlinien der Union International Contre le Cancer (UICC); T:Größe des Primärtumors, N:Status des Lymphknotenbefalls, M:Fernmetastasen, genaue Erklärung siehe Tabelle 2-1.

4.7.2 Sunitinibbehandelte RCC-Patienten

Die sunitinibbehandelten RCC-Patienten wurden im Rahmen der Pfizerstudie erst mit Sunitinib behandelt (Dr. Stähler, Urologische Klinik, LMU Großhadern) und anschließend wurde der Tumor entfernt. Somit war es möglich den Einfluss dieser Therapieform auf die tumorinfiltrierenden Leukozyten zu untersuchen. Die in dieser Arbeit untersuchten Tumorgewebe von sunitinibbehandelten Patienten wurden von der Urologischen Abteilung des Klinikums Großhadern zur Verfügung gestellt. Alle Tumoren waren Primärtumoren und Nierenzellkarzinome des klarzelligen Typs.

PATIENT-ID TUMORGEWEBE	GESCHLECHT ¹	ALTER ² (JAHRE)	TNM – STADIUM ³
P0.2	M	66	pT3a pN1 M2 G4
P0.3	M	53	pT3a pNx M1 G3
P1	W	49	pT3b pN2 Mx G3
P2	W	44	pT3a pN2 Mx G3

¹ Geschlecht der Patienten. M=männlich, W=weiblich

² Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme

³ Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren nach den Richtlinien der Union International Contre le Cancer (UICC); T:Größe des Primärtumors, N:Status des Lymphknotenbefalls, M:Fernmetastasen, genaue Erklärung siehe Tabelle 2-1.

Die in dieser Arbeit untersuchten Tumorgewebe von sunitinibbehandelten Patienten wurden von der Urologischen Abteilung des Klinikums Großhadern zur Verfügung gestellt. Alle Tumoren waren Nierenzellkarzinome des klarzelligen Typs.

4.8 Multiplex-Analyse: Phosphoproteinbestimmung (BIO-RAD)

Bio-Plex cell lysis kit

Bio-Plex phosphoprotein detection reagent kit

Bio-Plex phosphoprotein assay

Phosphoprotein-spezifische Antikörper:

Phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Thr 185/Tyr 187)

Phospho GSK-3 α/β (Ser21/Ser9)

Phospho I κ B- α (Ser31/Ser36)

Phospho JNK (Thr183/Tyr185)

5 METHODEN

5.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

5.1.1 Kultivierung humaner und muriner Zelllinien sowie primärer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurden mit sterilem Material, Lösungen und Medien bei sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 6,5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

5.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde einer Zellsuspension ein Aliquot (10 µl) entnommen und 1:10 mit Trypanblau-Lösung (90 µl) gemischt. 10 µl der Farbstoff-Zell-Mischung wurde in den Zwischenraum einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Der Farbstoff dringt nur in tote, nicht aber in lebende Zellen ein. Unter dem Lichtmikroskop wurde nachfolgend die Anzahl der ungefärbten Zellen in mindestens zwei Großquadraten, bestehend aus 16 Kleinquadraten, bestimmt. Die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat wurde mit dem Kammerfaktor 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert und ergab die Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus dem Wert pro ml multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension. War die Zellkonzentration niedrig, so wurde eine geringere Verdünnung gewählt.

Die allgemeine Berechnungsformel lautet:

Zellen/ml = Mittelwert aus zwei Großquadraten*Verdünnungsfaktor*10000

5.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen für eine Langzeitlagerung zu konservieren, wurde die Gefrierschutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Da DMSO auf stoffwechselintakte Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte der Kryokonservierung zügig auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 5 Min. bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm)

(Megafuge 2.0, Heraeus) sedimentiert und der Kulturüberstand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellsediment in 500 µl gekühltem fötalen Kälberserum (FKS) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Schrittweise wurde das gleiche Volumen an kühlem 20 % igem DMSO zur Zellsuspension gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen in Zellstoff eingepackt, um ein schnelles Einfrieren zu verhindern, und bei -80°C eingefroren. Nach einer bis zwei Wochen erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen auf Trockeneis in flüssigen Stickstoff (-196°C).

5.1.4 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden bei Bedarf zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der Inhalt eines Kryoröhrchens wurde, sobald nur noch ein kleines Eisstückchen zu sehen war, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen, das 2 ml FKS enthielt, überführt und 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert (Megafuge 2.0, Heraeus). Anschließend wurde das Zellsediment in dem jeweiligen Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

5.1.5 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte in dem für die Zellen optimalen Kulturmedium. Das Volumen des Kulturmediums in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm² Adhärenzfläche) betrug 10 ml, in den großen Zellkulturflaschen (175 cm² Adhärenzfläche) betrug das Volumen des Kulturmediums 25 ml. Da die Nährstoffe im Kulturmedium ab einer gewissen Zelldichte aufgebraucht werden, wurde das Kulturmedium der Zellen alle drei bis vier Tage gewechselt, indem das alte Kulturmedium abgesaugt und neues Kulturmedium hinzu gegeben wurde. War unter dem Mikroskop bereits ein dichter Zellrasen sichtbar, d.h. eine Konfluenz von 80 % bis 100 % vorhanden, wurde die Zellzahl reduziert, indem bei der P815-Zelllinie neun Zehntel bzw. bei den Nierenzellkarzinomzelllinien zwei Drittel bzw. drei Viertel der Zellen verworfen wurden. Für die Entnahme von Zellen bei einer adhärent wachsenden Zellkultur musste zuerst eine Zellsuspension hergestellt werden. Hierzu wurde das alte Kulturmedium in der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um das noch verbliebene FKS-haltige Medium und tote Zellen, die nicht mehr an den Zellkulturboden angeheftet waren, zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml (75 cm² Zellkulturflaschen) bzw. 2 ml (175 cm² Zellkulturflaschen) Trypsin-EDTA-Lösung ca. 2 Min. bis 5 Min. behandelt, damit sie sich von der Kulturgefäßoberfläche ablösen. Dabei werden durch das Trypsin die Bindeproteine zwischen Zelle und Substrat proteolytisch gespalten und durch EDTA, die für die Salzbrücken zwischen Zelle und Substrat notwendigen zweiwertigen Kationen, vor allem Kalzium, komplexiert. Sobald unter

dem Mikroskop zu erkennen war, dass sich alle Zellen vollständig abgelöst hatten, wurde Zellkulturmedium hinzu gegeben. Die im Kulturmedium enthaltenen Bestandteile des FKS inaktivieren das Trypsin und stoppen somit die Reaktion. Die Inkubation der Zellen mit der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte nicht länger als nötig, da es bei längerer Exposition die Zellen schädigt. Das gewünschte Volumen der Zellsuspension wurde aus der Kulturfläche entnommen und diese Zellen verworfen oder in Experimente eingesetzt. Den restlichen Zellen in der Kulturflasche wurde neues Kulturmedium zugegeben und die Kultivierung fortgesetzt.

5.1.6 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Kultivierung von Suspensionszellen erfolgte in dem für die Zellen optimalen Zellkulturmedium in kleinen (T25) oder mittleren (T75) aufrecht gestellten Zellkulturflächen (5 bis 7,5 ml bzw. 20 bis 40 ml Zellkulturvolumen). Alle zwei bis drei Tage wurde je ein Viertel bis ein Zehntel der Zellsuspension entnommen und durch neues Medium ersetzt. Die entnommenen Zellen wurden verworfen oder in Experimente eingesetzt.

5.1.7 Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen

Die ZTL-Klone TyrF8, JB4 und TIL26 wurden in T-Zellmedium mit 50 U Interleukin-2 (IL-2) pro ml in 24-Lochplatten in einem Volumen von 1,5 ml kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig mit einer Pipettenspitze abgenommen, ohne dabei die T-Zellen mitzunehmen. Das entnommene Medium wurde mit neuem T-Zellmedium mit 100 U/ml IL-2 ersetzt, so dass die Konzentration des IL-2 kontinuierlich 50 U/ml betrug. Waren die Zellen sehr dicht gewachsen, wurde die Hälfte der Zellen in eine neue Vertiefung überführt und mit T-Zellmedium mit 100 U/ml IL-2 ersetzt.

Damit die ZTL-Klone überleben und zur Proliferation angeregt werden, müssen sie regelmäßig einen Stimulus durch eine Restimulation erhalten. Diese wurde durch Kultivierung der ZTL-Klone mit den jeweiligen pMHC⁺-Zielzellen erreicht. Zusätzlich benötigen die ZTL-Klone so genannte pMHC⁻-Feeder-Zellen, die ein für die T-Zellen förderliches Zytokinmilieu schaffen. Als Feeder-Zellen wurde die B-LCL-LAZ388 und ein Gemisch aus PMBZ verschiedener Spender verwendet. Zielzellen und Feeder-Zellen wurden in einer Bestrahlungsanlage mit dem Caesium-Isotop ¹³⁷Cs (β- und γ-Strahler) bestrahlt, um die Proliferation dieser Zellen zu verhindern. Die jeweiligen Bestrahlungsdosen, die je nach Aktivität der Strahlenquelle in unterschiedlichen Bestrahlungsdauern resultierten, sowie die Zellzahlen pro Restimulationsansatz sind in Tabelle 5-1 angegeben. Der Restimulationsansatz wurde zusammen mit jeweils 6 x 10⁵ Zellen der T-Zellklone in einer

Vertiefung in 1,5 ml T-Zellmedium mit 50 U/ml IL-2 ausgesät. Die T-Zellen zeigten ab dem ersten Restimulationstag eine länglichere Morphologie und ein leuchtend klares Zytoplasma. Ab dem dritten bis vierten Tag verschwanden die Restimulationszellen zunehmend. Die Restimulation der T-Zellklone wurde alle 12 bis 14 Tage wiederholt. Die ZTL-Klone wurden zwischen Tag 7 und Tag 9 nach der Restimulation in die Experimente eingesetzt.

Tabelle 5-1: Restimulationsansatz für 6×10^5 Zellen der ZTL-Klone JB4¹, TyrF8² bzw. TIL26¹ pro Vertiefung einer 24-Lochplatte in 1,5 ml T-Zellmedium

RESTIMULATIONSZELLEN	ZELLZAHL	BESTRAHLUNGSDOSIS (GRAY)
¹ RCC-26/ ² Mel 93.04 A12.1	6×10^4	100
PBMZ	$1-1,4 \times 10^6$	50
B-LCL-LAZ388	1×10^5	150

5.1.8 Gewinnung von Tumorzellkulturüberstand für die Differenzierung von Monozyten zu tumorinduzierten DZ (RCC-DZ)

Für die In-vitro-Differenzierung von tumorinduzierten DZ aus Monozyten (siehe 5.2.5) wurde der Tumorzellkulturüberstand von RCC-26 eingesetzt. Zur Gewinnung wurden 2×10^6 Zellen der Tumorzelllinie in 10 ml AIM-V + L-Glutamin in einer 75 cm² Zellkulturflasche über 10 Tage kultiviert und anschließend der Überstand geerntet. Dieser wurde dann 10 Min. bei 2000 rpm (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die Überstände wurden auf die Anwesenheit von IL-6 und IL-8 mittels ELISA überprüft. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Faktoren entscheidend für die Differenzierung von Monozyten zu RCC-DZ sind.

5.2 Arbeiten mit Vollblut und Geweben

Alle Isolierungsschritte wurden zügig durchgeführt. Es wurden Einmalpipetten aus Plastik verwendet, um eine Voraktivierung der Zellen zu vermeiden.

5.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMZ)

Die Isolierung von PBMZ (periphere Blut mononukleäre Zellen) erfolgte aus venösem Vollblut gesunder Spender. 50 ml Spritzen wurden zur Blutabnahme mit 1000 U Heparin/50 ml Blut (100 µl pro Spritze) beschickt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Das Blut wurde nach Abnahme sofort 1:1 mit RPMI 1640 Medium gemischt und 35 ml davon auf 15 ml Ficoll in einem 50 ml-Röhrchen überschichtet. Die Bestandteile des Blutes wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse (Megafuge 2.0, Heraeus) durch die Zentrifugalkraft entsprechend ihrer Dichte voneinander getrennt. Die Erythrozyten und Granulozyten sinken dabei in die Ficollschicht ab. In der Interphase sammeln sich die PBMZ. Darüber befindet sich das Plasma-Mediumgemisch mit den Thrombozyten. Die Interphase wurde vorsichtig mit einer 10 ml Plastikpipette abgenommen, in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an RPMI 1640 Medium gemischt. Es wurde anschließend bei 1900 rpm für 12 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert (Waschschritt zum Entfernen des Ficolls). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in Puffer aufgenommen.

Die Ausbeute lag spenderabhängig zwischen 20×10^7 bis 30×10^7 Zellen/100 ml Vollblut.

5.2.2 Negative Isolierung von Natürlichen Killerzellen aus PBMZ

NK-Zellen wurden aus PBMZ 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 Isolierung der NK-Zellen war, dass aus den PBMZ vorhandene Thrombozyten entfernt wurden, da sie die Reinheit der Isolierung negativ beeinflussten. Deswegen wurde die PBMZ-Suspension zweimal für 12 Min. bei 1000 rpm (Megafuge 2.0, Heraeus) abzentrifugiert und mit NK-Isolierungspuffer gewaschen. Danach wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von $1,0 \times 10^7$ Zellen/100 µl in NK-Isolierungspuffer eingestellt und pro $1,0 \times 10^7$ Zellen 20 µl FKS und 20 µl Antikörper-Mischung (α CD3, α CD14, α CD36, α CDw-HLA II DR/DP) zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 10 Min. bei 4°C auf einem Roller. Danach wurde mit 1 ml/1,0 x 10⁷ Zellen NK-Isolierungspuffer gewaschen und bei 1700 rpm für 8 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 0,95 ml NK-Isolierungspuffer/1,0 x 10⁷ Zellen aufgenommen und mit 50 µl Beads/1,0 x 10⁷ Zellen für 10 Min. bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren, um entstandene Beadrossetten aufzulösen, wurde das

Röhrchen für mindestens 2 Min. an den Magneten gehängt. Der Überstand, der die NK-Zellen enthielt, wurde in ein neues Röhrchen überführt und noch mal mit 50 µl Beads versetzt, wie zuvor beschrieben inkubiert und ein zweites Mal an den Magneten gehängt. Vom finalen Überstand wurde ein Teil für die Zellzahlbestimmung abgenommen und der restliche Überstand für 5 Min. mit 1500 rpm (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in einem für den anschließenden Versuch optimalen Medium aufgenommen. Es folgte eine Reinheitsbestimmung mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurde über eine CD3/CD56-Doppelfärbung bestimmt, wie viel CD3-positive Zellen noch vorhanden waren. Brauchbar waren Aufreinigungen mit einem NK-Gehalt von über 90 %. Die Ausbeute war spenderabhängig.

5.2.3 Positive Isolierung von Monozyten aus PBMZ

Die Isolierung der Monozyten aus PBMZ erfolgte über Magnetic Cell Sorting (MACS). Alle Isolierungsschritte erfolgten auf Eis, alle Zentrifugationsschritte mit der Megafuge 2.0, (Heraeus).

Nachdem die PBMZ über Dichtegradientenzentrifugation - wie in 5.2.1 beschrieben - aus Vollblut isoliert worden waren, wurde das Zellsediment in 10 ml eiskaltem MACS-Puffer aufgenommen und die Zellen in einem Röhrchen vereinigt. Es wurde einmal mit 10 ml MACS-Puffer nachgespült. Dabei wurden die Zellen so wenig wie möglich auf- und abpipettiert, um eine Aktivierung der Zellen zu verhindern. Um Zellaggregate sowie sonstige größere Bestandteile zu entfernen, wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb (Porengröße: 100 µM) filtriert. Anschließend wurde ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung abgenommen. Die verbleibende Zellsuspension wurde mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und nochmals bei 1900 rpm für 12 Min. abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 80 µl MACS-Puffer/ 10^7 Zellen resuspendiert, wozu 15 µl CD14 Microbeads/ 10^7 Zellen gegeben wurden. Um eine adäquate Mischung der Zellen mit den Beads zu gewährleisten, wurde das Röhrchen für 15 Min. bei 4°C auf einem Rotiergerät inkubiert. Um nicht gebundene Microbeads zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit der 10-fachen Menge an MACS-Puffer versehen und bei 1900 rpm für 12 Min. abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf eine Säule, die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert und in den MACS Separator eingespannt wurde, gegeben. Die CD14⁺ Zellfraktion konnte dabei durch Bindung der Beads in der Magnetsäule zurückgehalten werden und die nicht an die Säule gebundenen Zellen (CD14⁻) direkt aufgefangen werden. Die Säule wurde zweimal mit 3 ml Puffer nachgespült und das Eluat als CD14⁻ PBMZ-Fraktion gesammelt und portionsweise eingefroren oder direkt verwendet. Die in der Säule verbliebenen CD14⁺ Zellen wurden mit

Hilfe eines Stempels eluiert und sofort abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann im entsprechenden Medium aufgenommen und standen für Folgeversuche zur Verfügung.

Die Ausbeute an Monozyten betrug - spenderabhängig - zwischen 5 - 15 % der PBMZ, bei einer Zellzahl von 20×10^6 bis 40×10^6 Monozyten pro 100 ml Blut.

5.2.4 Positive Isolierung von CD8⁺ und CD56⁺ Zellen aus PBMZ und TIL

Aus drei TIL und zwei PBMZ wurden die CD8⁺ und die CD56⁺ Zellen isoliert. Die Zellseparation wurde mit spezifischen Antikörpern, die an magnetische Kügelchen (MACS Microbeads) gebunden waren, durchgeführt. Die Durchführung erfolgte exakt nach Herstellerprotokoll und gleicht der Monozyten-Isolierung, die unter 5.2.3 beschrieben ist. Für die Separation wurden die Zellen sedimentiert und zunächst mit 80 µl MACS-Puffer und 20 µl CD8⁺ MACS Mikrobeads pro 10^7 Zellen für 15 Min. auf dem Roller bei 4°C inkubiert. Aus der, nach der Durchführung, erhaltenen Negativfraktion wurden dann die CD56⁺ Zellen isoliert. Die hierdurch erhaltenen Positivfraktionen wurden für den BIO-RAD Multi-Plex zur Bestimmung von Phosphoproteinen verwendet.

5.2.5 Generierung von klassischen DZ und RCC-DZ

Zur Generierung von klassischen DZ wurden die durch CD14⁺ Magnetseparation gewonnenen Monozyten – wie in 5.2.3 beschrieben - in einer Konzentration von 6×10^6 Zellen/4 ml AIM-V-Medium pro Vertiefung in einer 6-Loch-Flachbodenplatte (Nunc) ausgesät. Das Medium enthielt 400 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF. Zur Generierung der RCC-DZ wurden 6×10^6 CD14⁺ Zellen in 3 ml AIM-V-Medium mit 1 ml RCC-26-konditioniertem Tumorüberstand (siehe 5.1.8) pro Vertiefung kultiviert. Die Zytokine bzw. der RCC-26-konditionierte Tumorüberstand wurden am Tag der Aussaat, am Tag 2 und Tag 5 der Kultivierung zugegeben. Die DZ wurden meistens am Tag 7 geerntet und für Experimente verwendet.

5.2.6 Anlegen von 24 Std. Kokulturen mit myeloischen Zellen

Um den Einfluss von myeloischen Zellen auf naive bzw. Effektorzellen zu untersuchen, wurden Kokultorexperimente durchgeführt. Für diese wurden DZ (in vitro aus Monozyten generierte klassische DZ und RCC-DZ) einerseits mit PBL oder isolierten NK-Zellen und andererseits mit dem zytotoxischen HLA-A2-reaktiven ZTL-Klon JB4 kokultiviert. Für die

Kokultivierungsversuche mit NK-Zellen wurden autologe DZ und für die mit JB4 HLA-A2-negative DZ verwendet. Meist wurden $0,3 \times 10^6$ JB4, PBL oder NK-Zellen in 300 μ l T-Zellmedium (JB4) oder Stimulationsmedium (PBL/NK-Zellen) mit entsprechender Zahl an DZ angesetzt. Es wurden verschiedene Verhältnisse von DZ zu JB4 bzw. zu PBL oder NK-Zellen (0,1:1–1:1) gewählt, um zu erkennen, ob sich die Art des Einflusses mit unterschiedlichem Verhältnis verändert. Nach 24 Std. wurden die Zellen in funktionelle Versuche eingesetzt und hinsichtlich verschiedener Oberflächenmarker und intrazellulärer Proteine untersucht.

5.2.7 Isolierung von Leukozyten aus Tumor- und Normalnierengewebe

Das Probenmaterial für die Untersuchung der TIL bzw. der NIL (tumor- bzw. normalniereninfiltrierende Lymphozyten) wurde aus Tumoren bzw. Normalnierengewebe der tumortragenden Niere isoliert. Patienten mit Nierenzellkarzinomen erhielten in der Klinik eine Nephrektomie und anschließend wurde das entnommene Gewebe in die Pathologie gebracht. Hier wurden Tumor- bzw. Normalnierenstücke von einem Pathologen abgeschnitten, von uns abgeholt und sofort verarbeitet. Die Gewebstücke besaßen im Durchschnitt eine Größe von 4 cm x 2 cm x 1,5 cm. Um die Gewebe auch histologisch färben und untersuchen zu können, wurden von jedem Tumor- und Normalgewebe ein kleines Stück abgetrennt, in Aluminiumfolie verpackt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach einigen Minuten wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei -80°C gelagert. Das restliche Gewebe wurde in den Verdau eingesetzt. Hierfür wurde das Gewebe in eine Petrischale geben und mit Hilfe von Skalpell und Schere in sehr kleine Stückchen geschnitten. Meist wurde das Gewebe bearbeitet bis es eine breiige Konsistenz aufwies. Es wurde darauf geachtet, dass das Gewebe nicht austrocknete. Deswegen wurde meist etwas HBSS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) zugegeben. Anschließend wurde der Gewebebrei mit einem Löffel in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, wobei pro Röhrchen ein maximales Volumen von 5 ml optimal war. Im Durchschnitt lag das Volumen pro Tumor- bzw. Normalnierenstückchen bei 3 – 5 ml. Da in den Experimenten nur Leukozyten untersucht werden sollten, die ins Gewebe ausgewandert waren, mussten die Leukozyten, welche sich in den Blutgefäßen des Gewebes befanden, entfernt werden. Dies erfolgte über mehrere Waschschrte. Hierfür wurden zu den Gewebebreien 20 – 30 ml HBSS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) zugegeben und anschließend 2 Min. bei 1500 rpm (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Zellen wurde in ein neues Röhrchen überführt. Dieser Waschschrte wurde so oft wiederholt bis der Überstand nicht mehr blutig war. Der durch diese Waschschrte erhaltene Überstand 1 wurde mit ÜS1 bezeichnet und enthält die aus dem Gewebe ausgewaschenen Zellen, vermutlich solche die nicht ins Tumorgewebe

ausgewandert waren. Diese Zellen werden als tumorzirkulierende Lymphozyten (TZL) bezeichnet. Als nächstes erfolgte der erste Gewebeverdauschnitt. Dem Gewebesediment wurden 30 ml Verdauungspuffer zugesetzt, gut gemischt und anschließend 20 – 30 Min. auf dem Rotator inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 1500 rpm 5 Min (Megafuge 2.0, Heraeus). Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Röhrchen transferiert und dem Sediment wurden 20 – 30 ml HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} zugesetzt. Nach einer Zentrifugation von 1500 rpm für 5 Min (Megafuge 2.0, Heraeus) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und dem Sediment 30 ml 5 mM EDTA in HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 20 – 30 Min. bei Raumtemperatur auf dem Rotator. Nach der anschließenden Zentrifugation von 1500 rpm für 5 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen transferiert und dem Sediment wieder HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} zugegeben. Nach der Zentrifugation (1500 rpm, 5 Min., Megafuge 2.0, Heraeus) erfolgte der zweite Verdauschnitt analog dem ersten Verdauschnitt. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Gewebehomogenat in eine Petrischale gegeben und mit einer kleineren Petrischale ausgedrückt. Anschließend wurde die Petrischalenoberfläche mit HBSS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) abgespült und zusammen mit der Gewebesuspension in ein neues Röhrchen überführt. Nachdem die Gewebesuspension durch ein 40- μm -Filterpapier filtriert worden war, erfolgte eine Zentrifugation aller Überstände bei 1500 rpm für 10 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus). Hiernach erfolgte die Zellzählung. Die Ausbeute für TIL betrug $10\text{-}100 \times 10^6$, für NIL $1\text{-}10 \times 10^6$ und für TZL $0,5\text{-}4 \times 10^6$ Leukozyten. Dabei wurde versucht nur die kleinen Zellen zu zählen, die großen Zellen (=Tumorzellen) wurden weitgehend ausgeschlossen.

5.2.8 Kultivierung von TIL

Isolierte TIL wurden nach dem Auftauen entweder direkt analysiert oder in Kultur genommen. Hierfür wurden $2\text{-}4 \times 10^6$ Zellen in 1,5 ml AIM-V (versetzt mit 10 % Humanserum und 50 U/ml IL-2) in einer 24-Lochplatte für 48 Stunden kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet, gezählt und die entsprechende Menge in weitere Versuche eingesetzt.

5.2.9 Gewinnung von löslichen Tumormilieu-faktoren zur Kultivierung von NK-Zellen

Die Nierentumorzelllinie KT-195 wurde in einer Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ in AIM-V mit 10 % HS über 40 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 Min., 1500 rpm, Megafuge 2.0, Heraeus), der Kulturüberstand steril in ein neues Gefäß überführt und

bei -20°C eingefroren. Vor Einsatz in die Experimente wurde der aufgetaute und auf Raumtemperatur erwärmte Tumorkulturüberstand gut gemischt.

5.2.10 Fixierung von Tumorzellen

Um den Einfluss von Tumorzellen auf PBL ohne Beteiligung löslicher, von den Tumorzellen produzierter Faktoren zu untersuchen, wurden die Tumorzellen fixiert. Hierfür wurden 5 Mio. Tumorzellen in 1 ml 4 % PFA/PBS für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und direkt in Versuche eingesetzt oder bis zum nächsten Tag in Kultur gehalten.

5.3 In-vitro-Modellkultursysteme

5.3.1 In-vitro-Kokultivierungsmodell

Der Einfluss von Tumorzellen auf Lymphozyten sollte mit Hilfe eines In-vitro-Modellsystems, welches die Kokultivierung mit einer hohen Tumorzellzahl beinhaltet, untersucht werden. Ziel war es, ein System zu evaluieren, welches die Generierung des in situ beobachteten Phänotyps der NK-Zellen in TIL ermöglicht. Hierfür wurden PBL mit der Tumorzelllinie KT-195 im Normalwell bzw. Transwell (Porengröße 0,4 µm; nicht zellpermeabel, aber Diffusion löslicher Faktoren möglich, Tumorzellen wurden unten im well, PBL wurden oben im Insert kultiviert) in verschiedenen Verhältnissen kokultiviert. Meist wurden $0,3 - 0,5 \times 10^6$ PBL in 600 - 1000 µl Kokulturmedium mit entsprechender Tumorzellzahl angesetzt. Es wurden Verhältnisse von PBL:Tumorzellen von 1:1 bis 1:8 gewählt. Eine Kokultivierung im Normalwell ermöglicht die Untersuchung des Einflusses von Zell-Zell-Kontakt einhergehend mit von den Zellen sezernierten löslichen Faktoren, die des Transwells erlaubt die Bestimmung des Einflusses von löslichen Faktoren ohne Zellkontaktbeteiligung. Zusätzlich wurden auch Ansätze mitgeführt, in denen die Tumorzellen fixiert waren. Da in diesem Fall ein Zell-Zell-Kontakt möglich ist, die Tumorzellen aber nichts mehr produzieren, gestattet dieser Ansatz die Untersuchung des Einflusses von Kontakt ohne lösliche Faktoren. Eine Übersicht ist in Tabelle 5-2Tabelle dargestellt.

Tabelle 5-2: Übersicht über die verschiedenen Ansätze der PBL:KT-195-Kokultivierung

VERHÄLTNIS PBL : KT-195	ART LOCHPLATTE (24-WELL)	BEHANDLUNG DER KT-195	EINFLUSSFAKTOREN
1:1	Normalwell	-	Zellkontakt und lösliche Faktoren bei geringer Zelldichte
1:8	Normalwell	-	Zellkontakt und lösliche Faktoren bei hoher Zelldichte
1:8	Transwell	-	lösliche Faktoren, sezerniert während Kultur mit hoher Zelldichte
1:8	Normalwell	PFA-fixiert	Zellkontakt bei hoher Zelldichte

5.3.2 In-vitro-3D-Tumormodell

Sphäroide wurden aus RCC-Zelllinien (RCC-53 oder KT-195) generiert. Hierfür wurden die Zellen mit 5 mM EDTA ohne Trypsin aus den Zellkulturflaschen geerntet. Es wurde 1 %-ige Agarose (Seaplaque) im Wasserbad auf 70°C erwärmt und 150 µl davon in je ein Loch einer 48-Loch-Platte gegeben. Die Platte wurde ca. 15x in Form einer 3-dimensionalen 8 rotiert, damit die Agarose eine Art Meniskus bildet. Nach dem Abkühlen der Platte auf einer horizontalen Fläche wurden 1×10^5 Tumorzellen in 500 µl T-Zellmedium ohne Zytokine pro Loch zugegeben und 1500 rpm für 5 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine 4-tägige Kultivierung im Brutschrank. In dieser Zeit formten die Tumorzellen ein dichtgepacktes 3D-„Organoid“.

Nach 4 Tagen wurden die Sphäroide mit Hilfe einer abgeschnittenen 100 µl-Pipettenspitze aus den Löchern in Petrischalen transferiert, in der sie im Deckel als hängende Tropfen weiterkultiviert wurden. Im hängenden Tropfen geschieht eine optimale Migration von NK-Zellen bzw. Monozyten in die Mikrotumoren. Dafür wurden 1×10^5 isolierte NK-Zellen bzw. Monozyten in 20 µl Kokulturmedium zu einem Sphäroid zugegeben und weiter als hängende Tropfen kultiviert. Nach 12 Std. wurde das Medium gewechselt, um nicht eingewanderte Zellen zu entfernen. Dann wurde neues Medium zugegeben und NK-Zellen wurden insgesamt 24 Stunden und Monozyten 3 Tage weiter im Sphäroid kokultiviert. Nach der Kokultur der NK-Zellen bzw. Monozyten wurden die Sphäroide mit den eingewanderten Zellen im FACS-Puffer durch auf- und abpipettieren resuspendiert und somit

Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden anschließend in durchflusszytometrische Analysen eingesetzt, wobei für einen Färbeansatz ca. 3-5 Sphäroide verwendet wurden.

5.4 Funktionelle Versuche

5.4.1 CD3-Beladung der P815-Zelllinie

Für die Stimulation der T-Zellen wurde die Mausmastozytomzelllinie P815 verwendet, die Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimiert. Somit konnten die P815-Zellen mit murinen anti-CD3 Antikörpern beladen werden, die dann die T-Zellen über den CD3-Komplex stimulieren. Die gewünschte Anzahl an P815-Zellen wurde serumfrei gewaschen und anschließend mit 10 µg OKT3-Antikörper pro 1×10^6 Zellen in 100-200 µl Opti-MEM bei Raumtemperatur für 30 Min. auf dem Schüttler inkubiert. Um überschüssigen Antikörper wegzuwaschen, wurden nach der Inkubation 10 ml Opti-MEM zugegeben und 1500 rpm für 5 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert. Die P815-OKT3 Zellen wurden darauf folgend im gewünschten Medium aufgenommen und in die funktionellen Versuche eingesetzt.

5.4.2 Stimulation von T- und NK-Zellen

Zielzellen:

Wenn nicht anders angegeben, so wurden pro durchflusszytometrischem Färbeansatz $2-5 \times 10^5$ PBMZ (oder PBL, T IL oder NIL) mit $2 - 5 \times 10^5$ P815-OKT3 und/oder $2-5 \times 10^5$ K562 (Verhältnis 1:1:1) in insgesamt 200 - 300 µl Stimulationsmedium stimuliert. Zur Detektion der CD107-Oberflächenmobilisierung oder intrazellulärer Zytokine wurde 5 Std. stimuliert.

PMA/Ionomycin:

Wenn nicht anders angegeben, so wurden pro durchflusszytometrischem Färbeansatz $2 - 5 \times 10^5$ PBMZ (oder PBL, TIL oder NIL) mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin in 200 µl Stimulationsmedium stimuliert. Zur Detektion der CD107-Oberflächenmobilisierung oder intrazellulärer Zytokine wurde 5 Std. stimuliert. Wurde die Phosphorylierung von ERK und AKT untersucht, so wurde 8 Min. stimuliert.

CD3-Quervernetzen:

Diese Methode dient der Stimulation von T-Zellen für den Nachweis der PLC- γ 2-Phosphorylierung. Zunächst wurden 1×10^6 Zellen in 20 μ l serumfreien Medium (RPMI) mit 1 μ g/ μ l OKT3-Antikörper für 10 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI-Medium gewaschen und in 20 μ l aufgenommen. Es folgte eine einminütige Erwärmung der Zellen bei 37°C gefolgt von einer Inkubation mit 10 μ g/ml F(ab)₂ Ziege anti-Maus IgG für 4 Min. bei 37°C. Die Reaktion wurde dann mit Cytifix Puffer (BD) abgestoppt.

5.4.3 Nachweis der CD107-Oberflächenmobilisierung

Um die funktionelle Aktivität der CD3⁺CD8⁺ und der NK-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen auf die nach Stimulus induzierte CD107-Degranulation hin untersucht. CD107a und CD107b sind Membranproteine der Lysosomen und daher auch Bestandteil lytischer Granula von zytotoxischen T- und NK-Zellen. Kommt es bei Zielzellerkennung zur Granulaausschüttung gelangen die CD107-Moleküle an die Oberfläche der T- oder NK-Zellen. Durch Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD107a und CD107b während der Koinkubation mit Zielzellen werden alle während des Stimulationszeitraums auf die Oberfläche gelangten Moleküle markiert. Die resultierende Fluoreszenzintensität der Zellen ist somit proportional zum Ausmaß der Degranulation.

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie oben beschrieben mit Zielzellen oder PMA/Ionomycin in kleinen FACS-Röhrchen nach Zugabe von je 5 μ l der FITC-markierten CD107a- und CD107b-spezifischen Antikörper stimuliert. Die Inkubation erfolgte über 5 Std. bei 37°C im Beisein von GolgiStop (Monsensin) und Brefeldin A.

Da in dieser kurzen Zeit keine Kontamination zu erwarten war, wurden die Röhrchen offen in den Brutschrank gestellt. Um die Spezifität der Degranulation beurteilen zu können, wurde auch ein 0-Std.-Ansatz durchgeführt. Hierbei wurden die Zielzellen erst nach Zugabe von 500 μ l eiskaltem FACS-Puffer zu dem Antikörper-Effektorzellgemisch zugegeben sowie alle Schritte auf Eis durchgeführt. Das im FACS-Puffer enthaltene Azid inhibiert alle schwermetallhaltigen Enzyme. Dadurch werden Enzyme der Atmungskette inhibiert und der Stoffwechsel der Zellen unterbunden. Zusätzlich wurden auch Ansätze entweder mit den Effektorzellen alleine oder mit Effektorzellen plus Nicht-Zielzellen mitgeführt. Nach Ende der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l eiskaltem FACS-Puffer abgestoppt, die Zellen abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., Megafuge 2.0, Heraeus) und der Puffer bis auf 50 μ l abgesaugt. Anschließend erfolgte meist eine Oberflächenfluoreszenzfärbung.

5.4.4 Nachweis intrazellulärer Zytokine

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurden NK-Zellen mit PMA/Ionomycin und der ZTL-Klon JB4 mit RCC-26 (Verhältnis 1:1; je 2×10^5 Zellen) über 5 Std. stimuliert. Während der Stimulation waren Monensin und Brefeldin A anwesend, um intrazelluläre Transportmechanismen zu inhibieren. Somit werden die Zytokine nicht sezerniert sondern im Golgi-Apparat angereichert. Danach wurde die Reaktion mit eiskaltem FACS-Puffer abgestoppt. Es folgte eine Oberflächen- und intrazelluläre Fluoreszenzfärbung.

5.4.5 Nachweis der Chromfreisetzung nach Zellyse der Zielzellen (Chromfreisetzungstest)

Das Prinzip des Chromfreisetzungstests besteht in der Freisetzung von Cr^{51} (Chromat) aus radioaktivmarkierten Zielzellen durch die Effektorzell-vermittelte Lyse (*cell mediated lysis*, CML). Die Zielzellen nehmen durch Inkubation mit einer Natriumchromat-Lösung das enthaltene Chrom-Isotop ^{51}Cr (γ -Strahler) auf. Das bei Zellyse freigesetzte ^{51}Cr kann im Überstand nachgewiesen werden. Die Zielzellen wurden einen Tag vor dem Versuch 1/2 bis 1/4 verdünnt, um metabolisch aktive und vitale Zellen zu erhalten. Zur Markierung der Zielzellen wurden mindestens 1×10^6 Zellen geerntet, bei 1500 rpm für 5 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert und das Zellsediment in 100 μl 100 % FKS aufgenommen. Anschließend wurde die Natriumchromat-Lösung in einer Aktivität von 50 μCi bis 100 μCi zu den Zielzellen gegeben. In der Regel wurden 50 μl bis 100 μl Natriumchromat eingesetzt und die Zielzellen 1 bis 1,5 h bei 37°C inkubiert. Um das überschüssige ^{51}Cr zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit jeweils 5 ml CML-Medium gewaschen und anschließend auf eine Zellkonzentration von 4×10^4 Zellen/ml in CML-Medium eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 50 μl (entspricht 2×10^3 Zielzellen) pro Loch einer 96-Loch-Spitzbodenplatte mit zuvor ausgesäten 50 μl an Effektorzellen in CML-Medium gegeben und für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Dabei wurden Duplikate einer Verdünnungsreihe der Effektorzellen verwendet, so dass die benötigten Verhältnisse von Effektor- zu Zielzellen gegeben waren. Um die spontane Chromfreisetzung (spontane cpm) der Zielzellen ohne Beteiligung von Effektorzellen zu ermitteln, wurden die markierten Zielzellen ohne Effektorzellen in Parallelansätzen inkubiert. Die mögliche maximale Chromfreisetzung (maximale cpm) ergab sich aus der direkten Messung der markierten Zielzellen. Nach der Inkubation wurden je Ansatz 50 μl des Kulturüberstandes auf eine 96-Lochfilterplatte (Lumaplatte) zum Trocknen gegeben. Am nächsten Tag wurde die Messung der Platten am

TOPCount-Gerät durchgeführt. Von den gemessenen *counts per minute* (cpm)-Werten aller Duplikate wurde der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der spezifischen Zelllyse der Zielzellen durch die Effektorzellen erfolgte anschließend anhand der Mittelwerte über folgende Formel:

$$\% \text{ spezifische Zelllyse} = \frac{\text{experimentelle cpm} - \text{spontane cpm}}{\text{maximale cpm} - \text{spontane cpm}} \times 100$$

5.5 Durchflusszytometrie

5.5.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifizierung von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker bzw. intrazellulärer Komponenten. Dazu werden die Zellen zuerst mit monoklonalen Antikörpern markiert, an welche verschiedene Fluorochrome gekoppelt sind. Die Zellen werden im Durchflusszytometer durch eine Kapillare gezogen, sodass ein Strom einzelner Zellen entsteht, der von einem Laserstrahl erfasst wird. Fotodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und Granularität der Zelle darstellt, und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Das über den Vorwärtsdetektor (FSC) des Lasers gemessene Licht ist proportional zur Zellgröße. Das abgelenkte Seitwärtsstreulicht ist proportional zur Granularität der Zelle und wird durch den Seitwärtsdetektor (SSC) detektiert. Jeder Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches (Absorptionsspektrum). Laser mit vier verschiedenen Wellenlängen gewährleisten, dass ein breites Spektrum an Fluorochromen verwendet werden kann. Vom Laserlicht angeregt, werden die Elektronen auf ein höheres Energielevel angehoben. Beim Übergang des Elektrons in den Grundzustand kommt es zur Emission von Licht, welches eine längere Wellenlänge als das Anregungslicht besitzt. Man erhält charakteristische Emissionsspektren für jedes Fluorochrom. Das emittierte Licht wird durch ein „Photomultiplier tube (PMT)“ detektiert. Jedes Photon, das durch den PMT wahrgenommen wird, verursacht einen definierten elektrischen Strom, der gemessen und als Datei abgespeichert wird. Ein vor dem PMT angebrachter Filter schränkt das Spektrum der Wellenlängen, das den Detektor erreicht, ein und schirmt somit den jeweils für den Farbstoff spezifischen Kanal vor dem Emissionslicht anderer Fluorochrome ab. Da optische Filter nicht alle spektralen Überschneidungen der einzelnen Fluorochrome beseitigen können, ist eine elektronische Subtraktion, die sogenannte spektrale Kompensation, nötig, um verbleibende Streufluoreszenzen zu entfernen.

Mit Hilfe des Auswertungsprogramms (hier: FlowJo® Treestar) lässt sich z.B. der Prozentsatz an Zellen mit dem gleichen Oberflächenmarker innerhalb einer Population bestimmen und zudem die Expressionsstärke verschiedener intra- und extrazellulärer Moleküle pro Zelle als Fluoreszenzintensität ermittelt. Für die Auswertung der zytometrischen Daten gibt es verschiedene Darstellungsformen:

Histogramme zeigen die Verteilung von Zellen, die durch einen einzigen Parameter charakterisiert werden. Hierbei kann die Fluoreszenzintensität erfasst werden, welche proportional zur Expressionstärke des Parameters ist. Bei zwei oder mehr Parametern kann man ein Punktediagramm (Dot-Plot) wählen. Dabei wird in einem xy- Koordinatennetz jede Zelle als Punkt dargestellt, wobei x der Fluoreszenz des einen und y der Fluoreszenz des zweiten Parameters entspricht.

Abwandlungen des Dot-Plots sind „density plots“. Auch hier wird jede Zelle als Punkt in einem xy- Koordinatendiagramm eingeteilt. Fallen mehrere Zellen in die gleiche Region, so wird die Zelldichte durch eine Farbskala repräsentiert. Bei einem Konturdiagramm wird die Zelldichte durch Linien dargestellt, wobei bei hoher Zelldichte die Linien enger und bei niedriger Zelldichte weiter auseinander sind. Diese Art von Diagramm kann durch außerhalb liegende Zellen, welche als Punkte dargestellt werden, ergänzt werden.

Das Durchflusszytometer, das für die hier durchgeführten Experimente eingesetzt wurde, war ein LSR II flow Zytometer der Firma Becton Dickinson mit vier Lasern, wodurch bis zu 18 verschiedene Fluoreszenzen detektiert werden können.

Tabelle 5-3: Fluoreszenzcharakteristika der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, die Wellenlänge der Laser für die Anregung, sowie die Filter für die Detektion am LSR II Durchflusszytometer

FLUORESCENZ-FARBSTOFF	EXTINKTIONS-MAXIMUM	EMISSIONS-MAXIMUM	WELLENLÄNGE (λ) DES LASERS	FILTER (nm)
Pacific Blue	401 nm	452 nm	450 nm ¹	450/50
Amcyan	457 nm	491 nm	450 nm ¹	525/50
V500	415 nm	500 nm	450 nm ¹	530/30
FITC	494 nm	519 nm	488 nm ²	530/30
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	488 nm ²	530/30
PE	564 nm	578 nm	488nm ²	575/26
Propidiumjodid (PI)	493 nm	619 nm	355 nm ³	630/22
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	543 nm	655 nm	488 nm ²	630/30

APC	650 nm	660 nm	633 nm ⁴	660/20
Alexa Fluor 647	650 nm	668 nm	633 nm ⁴	670/20
PerCP-Cy5.5	482 nm	695 nm	488 nm ²	695/40
Alexa Fluor 700	696 nm	719 nm	633 nm ⁴	720/40
Pe-Cy7	564 nm	785 nm	488 nm ²	780/60
APC Alexa Fluor 750	650 nm	785 nm	633 nm ⁴	780/60

¹ Violetter Laser, ² Argonlaser, ³ UV-Laser, ⁴ Heliumneonlaser

5.5.2 Nachweis von Oberflächenmarkern mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Zur Bestimmung der Oberflächenmarker auf verschiedenen Zellen wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Zunächst gab man 2×10^5 – 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen, gab 500 µl FACS-Puffer zu und zentrifugierte bei 1500 rpm für 5 Min (Megafuge 2.0, Heraeus). Der Überstand wurde anschließend auf ein Volumen von 50 µl abgesaugt und dazu die adäquate Menge spezifischer fluorochrommarkierter Antikörper gegeben. Da für die Auswertung der Daten nach der Durchflusszytometrie die Erstellung einer Kompensationsmatrix zur Evaluierung der Fluoreszenzinterferenz von Nöten ist, wurden Kontrollröhrchen mit sogenannten „Compensation Beads“ angelegt. Die positiven Beads sind mit einem Antikörper benetzt, welcher die Kappa-leichte Kette der fluorochrommarkierten Antikörper erkennt. Die mit Antikörpern beladenen Beads wurden vor der Messung mit Kompensationsbeads, die keinen Antikörper tragen (negative Beads), vermischt, so dass zwei Populationen messbar sind, die fluoreszenzpositive und die fluoreszenznegative.

Die mit spezifischen Antikörpern versehenen Zellen, und die mit Antikörpern inkubierten Beads wurden nach kurzem Mischen für 30 Min. auf Eis im Dunkeln inkubiert. Hierbei fand die Bindung der zugegebenen spezifischen Antikörper an die jeweiligen Oberflächenmarker statt. Nicht gebundene Antikörper wurden mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 10 µg/ml 7-AAD (= 1 µl) Zellsuspension und eine 20- minütige Inkubation bei 4°C. 7-AAD erlaubt die Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen. Es interkaliert in die DNS von toten Zellen, da es nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann. Im Anschluss kann eine intrazelluläre Färbung durchgeführt werden, welche die Permeabilisierung der Zellen erfordert. Wird keine intrazelluläre Färbung benötigt, kann statt 7-AAD Propidiumjodid (PI, 10 µg/ml) verwendet werden. Bei Verwendung von PI muss die Messung innerhalb von 3 Std. durchgeführt werden.

Eine Fixierung der mit 7-AAD gefärbten und permeabilisierten Zellen mit 100 µl 1 % PFA/PBS erlaubt es, die Proben auch bis zu 24 Std. später zu messen.

5.5.3 Nachweis von intrazellulären Antigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Um Komponenten im Inneren der Zelle mit Hilfe von Antikörpern nachweisen zu können, müssen Zellen permeabilisiert werden. Die Oberflächenmarker weist man wie zuvor beschrieben nach. Nach der Oberflächenfärbung und 2-maligem Waschen der Zellen mit 500 µl PBS, saugte man den Überstand auf 50 µl ab, fixierte die Zellen durch Zugabe von 500 µl 1 % PFA/PBS und inkubierte für 20 Min. bei 4°C. Nach Waschen mit 500 µl PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 500 µl 0,1 %-iger Saponinlösung. Nach Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes gab man nochmals 0,35 %-iger Saponinlösung zu und saugte den Überstand auf 50 µl ab. Anschließend setzte man die entsprechende Menge markierter oder unmarkierter Primärantikörper für die intrazelluläre Färbung zu und inkubierte für 30 Min. bei 4°C im Dunklen. Bei einer Markierung der intrazellulären Proteine mit einem unmarkierten Primärantikörper erfolgte ein weiterer Permeabilisierungsschritt mittels Saponin analog dem ersten. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde zu den Zellen gegeben und bei 4°C für 30 Min. inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wusch man die Zellen mit 500 µl FACS-Puffer, zentrifugierte und gab zuletzt 100 µl 1 % PFA/PBS zu.

5.5.4 Die verschiedenen Färbekombinationen

Tabelle 5-4 zeigt in der ersten Spalte, welche Zelltypen analysiert wurden. Die mittlere Spalte zeigt die Antikörper zur Identifikation der Subgruppen, die in jeder Kombination mitgeführt wurden. CD56 wurde entweder in PE oder in APC und CD11c entweder in FITC oder PE eingesetzt, je nachdem, welche Fluoreszenz die anderen Marker der spezifischen Charakterisierung besaßen. Die rechte Spalte beinhaltet die Antikörper für die genaue Charakterisierung, wobei in einer Kombination die Marker einer Zeile verwendet wurden. Die Identifikation der T-Zellen erfolgte über Eingrenzung der CD45⁺CD3⁺ Zellen. ZTL wurden durch Auswahl der CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen und NK-Zellen durch Auswahl der CD3⁻CD56⁺ Zellen bestimmt. Die myeloischen Zellen wurden als CD11c-positive Zellen identifiziert.

Tabelle 5-4: Färbekombination zur durchflusszytometrischen Analyse der TIL, NIL und PBMZ, sowie der Zellen der verschiedenen In-Vitro-Modelle

ANALYSE	ANTIKÖRPER ZUR UNTERSCHIEDUNG DER LEUKOZYTENSUBGRUPPEN	OBERFLÄCHEN- UND INTRAZELLULÄRE MARKER
TIL, NIL und PBMZ	CD45 PE-Cy7 CD14 APC-A750 CD19 APC-A750 CD3 PB CD8 Amcyan CD56 APC oder PE CD16 A700	- CD107 FITC + IFN- γ APC - NKp46 PE + Perforin FITC - Granzym B PE + CD69 FITC - 2B4 PE + SAP A488 - NKp44 PE - NKG2D APC - p27kip A488
Myeloische Zellen in TIL und PBMZ	CD45 PE-Cy7 CD11c FITC CD209 APC CD14 PB CD163 PE CD3 Amcyan	- CD48 FITC
In-vitro-Modelle mit NK-Zellen	CD45 PE-Cy7 CD3 PB CD56 APC oder PE CD11c FITC oder PE (nur bei Analysen mit DZ)	- CD107 FITC + IFN- γ APC - NKp46 PE + Perforin FITC - Granzym B PE + CD69 FITC - 2B4 PE + SAP A488
In-vitro-Modell ZTL mit DZ	CD45 PE-Cy7 CD3 PB CD8 PE CD11c FITC oder PE	- CD3 ζ FITC + Granzym B PE - Perforin FITC - CD107 FITC + IFN- γ APC + TNF- α A700 + IL-2 APC

5.5.5 Fluoreszenzmarkierung von phosphorylierten Proteinen

Für die Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde ein speziell dafür entwickeltes kommerzielles Analyseset (BD™ Phosflow) verwendet. Für die lebend/tot-Färbung mittels 7-AAD (10 µg/ml), die im ersten Schritt erfolgte, wurde die gewünschte Zellzahl in serumfreien Medium mit 1 µl 7-AAD für 10 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit serumfreien Medium erfolgte entweder optional die Inkubation mit einem Inhibitor oder gleich die Stimulation der Zellen. Um die Reaktion abzustoppen, wurde sofort Cytofix-Puffer zugegeben und 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 1200 rpm für 8 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) erfolgte der Permeabilisierungsschritt mit Perm Puffer II bzw. III (BD™ Phosflow) je nach zu färbendem Antikörper. Hierfür wurde dem Zellsediment 500 µl Perm Puffer (BD™ Phosflow) zugegeben, gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurden die Zellen bei 1200 rpm für 8 Min. (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Nun wurde die Antikörperfärbung durchgeführt, indem zu der 50 µl Zell-Puffer-Lösung die entsprechenden Antikörper zugegeben wurden und 30 Min. auf Eis inkubiert wurde. Im Gegensatz zu anderen Färbeprotokollen wurde hier nicht zwischen Oberflächenmarkern und intrazellulären Proteinen unterschieden, da alle Antikörper gleichzeitig dazugegeben wurden. Die Färbekombination bestand aus CD45 PE-Cy7, CD3 PB, CD56 APC und dem Antikörper gegen entsprechendes phosphoryliertes Signalprotein. Enthielt die Färbung unmarkierte Primärantikörper (wie bei ERK) erfolge nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer eine weitere Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen A488) für 30 Min. auf Eis. Abschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und im letzten Schritt mit 1 % PFA fixiert. Eine Zusammenfassung aller notwendigen Versuchsbedingungen ist in Tabelle 5-5 dargestellt.

Tabelle 5-5: Übersicht über die untersuchten Signalmoleküle, die Art und Dauer der Stimulation und der verwendeten Permeabilisierungspuffer

PROTEIN (FLUORESZENZ)	STIMULATION ¹	STIMULATIONS- DAUER	PUFFER (BD™ PHOSFLOW)
pLCK (PE)	P815-OKT3 (für T-Zellen) K562 (für NK-Zellen)	3 Min.	Perm II
pPLC-γ2 (PE)	CD3 Quervernetzen	5 Min.	Perm III
pERK (A488)	PMA/Ionomyzin	8 Min.	Perm III
pAKT (PE)	PMA/Ionomyzin	8 Min.	Perm III

¹ Die genaue Durchführung der Stimulation ist unter 4.4.2 beschrieben

5.5.6 Messung der Proben und Auswertung der Daten

Vor der Messung wurde mit einer ungefärbten Probe die Lage der zu untersuchenden Zellpopulation im FSC/SSC so optimiert, dass diese möglichst in der Mitte des FSC/SSC-Punktewolkendiagramms lag. Anschließend wurden mittels fluoreszenzpositiver und fluoreszenznegativer Kontrollansätze die PMT-Einstellungen der Laser so modifiziert, dass die negativen Proben möglichst am Nullpunkt der x-Achse und die positiven Kontrollen möglichst weit rechts im Histogramm lagen. Da die einzelnen Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome überlappen können, wie das z.B. bei FITC und Amcyan der Fall ist, wurden positive und negative CompBeads aufgenommen, um später mit Hilfe der Auswertungssoftware FlowJo® eine Kompensation durchführen zu können.

Die zu untersuchende Zellpopulation wurde durch einen Auswahlrahmen im FSC/SSC-Punktewolkendiagramm eingegrenzt und jeweils zwischen 1×10^4 und 50×10^4 Ereignissen innerhalb des ausgewählten Bereichs aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels der Software FlowJo® mit Darstellung der Daten als Punktewolkendiagramm oder Histogramm. Das Histogramm ermöglicht es, die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität eines Markers gegen die Anzahl der Ereignisse darzustellen. Dadurch lassen sich zwei Aussagen treffen: Zum einen kann eine positive Zellfraktion von der für den jeweiligen Marker negativen unterschieden werden, zum anderen kann die Fluoreszenzintensität erfasst werden, die sich proportional zur Expressionsstärke des Markers verhält.

In einem Punktewolkendiagramm können zwei Marker gegeneinander dargestellt werden. Dabei wird in einem xy-Koordinatennetz jede Zelle als Punkt projiziert, wobei x die Fluoreszenz des einen und y die Fluoreszenz des zweiten Parameters darstellt. Dies ermöglicht die Bestimmung des Prozentsatzes an Zellpopulationen, die positiv für jeweils einen, beide oder keinen der beiden Marker sind.

5.6 Phosphoproteinbestimmung mittels Bio-Plex

5.6.1 Prinzip der Multiplex-Analysen

Die Multiplex-Technologie ermöglicht eine simultane Analyse von mehreren Parametern in einem sehr kleinen Probenvolumen. Es werden Polymerkügelchen mit individueller Eigenfluoreszenz verwendet, an die spezifische Moleküle gekoppelt sind. Durch abgestufte Mischverhältnisse zweier fluoreszierender Rot-Töne stehen somit bis zu 100 farblich unterschiedliche Mikrosphären zur Verfügung, die alle gemeinsam in einer Probe verwendet werden können. An diese Mikrosphären können Antikörper, die spezifisch für jeglicher Art

von Protein sind, u.a. Zytokine, Chemokine, Transkriptionsfaktoren oder in diesem Falle Phosphoproteine, gekoppelt werden. Bindet ein Zielmolekül an den gekoppelten Antikörper, wird das über einen sekundären Biotin-markierten Antikörper nachgewiesen. Die Quantifizierung des Zielmoleküls erfolgt dann durch Zugabe von PE-gekoppeltem Streptavidin, welches an das biotinylierte Molekül bindet. Hierdurch kann die Photozelle im Gerät durch die erste Fluoreszenz der Kügelchen und damit über den gekoppelten Antikörper die Art des Phosphoproteins detektieren und durch die Intensität der zweiten Fluoreszenz des PE die Menge ermitteln.

5.6.2 Durchführung der Phospho-Plex Analyse

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden die unter 5.2.4 beschriebenen, isolierten CD8⁺ bzw. CD56⁺ Zellen verwendet. Zunächst wurden 3×10^5 der CD8⁺ bzw. CD56⁺ Zellen für 8 Min. mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) in 200 µl Stimulationsmedium stimuliert. Es wurde auch jeweils eine Probe ohne Stimulation mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 40 Sek. bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 25 µl Lysepufferlösung (100 µl Lysepufferlösung: 4 µl 500 mM PMSF, 4 µl Faktor 1, 2 µl Faktor 2 und 990 µl Lysepuffer; alles enthalten in Bio-Plex Cell Lysis Kit) wurden die Proben 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 5 Min., 4°C, Eppendorfzentrifuge) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 25 µl Assaypuffer vermengt. Die Proben wurden dann bis zum Tag des Phospho-Plexes bei -20°C eingefroren.

1,25 µl der Mikrosphären (50x) des Multiplex-Assays wurden zusammen mit 50 µl Assaypuffer für die Anzahl der benötigten Proben vorbereitet und gevortext. Anschließend wurden je 50 µl dieser Mikrosphärenmischung in die Löcher einer zuvor mit Waschpuffer gewaschenen und benetzten 96-Loch-Filterplatte (enthalten im Bio-Plex Phosphoprotein Detection Reagent Kit) gefüllt, durch Vakuumfiltration vom Assaypuffer befreit und zweimal gewaschen. Anschließend wurden 50 µl des jeweiligen Lysats zu der Mikrosphärenmischung gegeben. Die Ansätze wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Mischung der Detektionsantikörper in Detection-antibody-diluent (Bio-Plex Phosphoprotein Assay Kit) angesetzt. Dazu wurden pro Ansatz je 1,25 µl Antikörper des Multiplex-Assays zusammen mit jeweils 25 µl Detection-antibody-diluent vermischt. Die über Nacht inkubierten Proben wurden vakuumfiltriert und dreimal gewaschen. Zu jedem Filterloch der 96-Loch-Platte wurden 25 µl der Antikörpermischung gegeben und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen und gleichzeitig die benötigte Menge an Streptavidin-PE-Lösung (SAPE) aus

100x Streptavidin und SA-PE Puffer angesetzt. Zu jeder Probe wurden dann 50 μ l SAPE-Lösung gegeben und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Vakuumfiltration wurde dreimal mit Puffer gespült und anschließend je 125 μ l Resuspensionspuffer zugegeben und 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor der Messung wurden die Proben noch einmal kurz aufgeschüttelt.

5.6.3 Messung und Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte am Bio-Plex Gerät (LABScan™100) unter „High Calibration“ Bedingungen nach Kalibrierung mit Bio-Plex Kalibrierungsmikrosphären mit der Bioplex-Software. Für jede Probe wurden Duplikate gemessen. Als Positivkontrolle dienten im Kit enthaltene Bio-Plex Assay Lysate (EGF-behandelte HEK293 Zellen für ERK1/2 und GSK-3 α/β ; TNF- α -behandelte HeLA Zellen für I κ B- α und UV-behandelte HEK293 Zellen für JNK).

5.7 Statistische Analysen

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

5.7.1 Mann-Whitney-U Test

Der Mann-Whitney-U Test (äquivalent zum Wilcoxon-Rangsummentest) ist ein nicht-parametrisches Testverfahren, welches daher für die statistische Untersuchung von geringen Probenanzahlen und nicht normalverteilten Daten geeignet ist. Der Mann-Whitney-U Test untersucht bei einer zweiseitigen Fragestellung, ob sich die Alternativhypothese signifikant von der Nullhypothese unterscheidet, also ob der Mittelwert einer Gruppe A signifikant unterschiedlich ist zu einem Mittelwert einer Gruppe B.

5.7.2 Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test (nach William Kruskal und Wilson Allen Wallis; auch H-Test) ist ein parameterfreier statistischer Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen oder Messreihen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variablen in ihrem Erwartungswert (Mittelwert) unterscheiden. Er ähnelt einem Mann-Whitney-U-Test und basiert wie dieser auf Rangplatzsummen, mit dem Unterschied, dass er für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden kann.

5.7.3 Post-Hoc Test (ANOVA)

Sobald festgestellt wird, dass es signifikant unterschiedliche Abweichungen zwischen den Mittelwerten gibt (d.h., das Kruskal-Wallis-Testergebnis hat einen p-Wert $<0,05$) können mit Hilfe des Post-Hoc-Spannweiten-Tests und paarweisen multiplen Vergleichen untersucht werden, welche Mittelwerte sich unterscheiden. Mit paarweisen Mehrfachvergleichen wird die Differenz zwischen zwei Mittelwerten verglichen. Die Gruppenmittelwerte, die auf Grund eines Alpha-Niveaus von 0,05 signifikant voneinander abweichen sind durch Sterne markiert. Ein Post-Hoc-Spannweitentest ist der Post-Hoc-Test nach Dunn, oder auch Bonferroni genannt. Dabei werden paarweise Vergleiche zwischen Gruppenmittelwerten mit T-Tests durchgeführt, wobei die Gesamtfehlerrate mit einbezogen wird, indem die Fehlerrate jedes einzelnen Tests auf den Quotienten aus der experimentellen Fehlerrate und der Gesamtzahl der Tests gesetzt wird. Dadurch wird das beobachtete Signifikanzniveau an Mehrfachvergleiche angepasst.

5.7.4 Korrelationsanalyse nach Spearman

Der Zusammenhang zwischen zwei Variablen wird mit einem sogenannten Korrelationskoeffizienten bestimmt. Es wurde der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman für nichtparametrische 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.

6 ERGEBNISSE

6.1 Analyse der tumor- und normalniereninfiltrierenden Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit sollten aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen und aus den Normalnierenbereichen der tumortragenden Niere die TIL (tumorinfiltrierende Lymphozyten) und NIL (normalniereninfiltrierende Lymphozyten) isoliert und mittels Multi-Fluoreszenz-Färbung durchflusszytometrisch genauer charakterisiert werden. Dabei waren die Subgruppen, verschiedene Oberflächenmarker, zytolytische Proteine und die funktionelle Aktivität von Interesse. Zu Vergleichszwecken wurden PBMZ (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) gesunder Spender mitgeführt.

6.1.1 Strategie der Auswahlfensterpositionierung

Um die einzelnen Subgruppen innerhalb der TIL und NIL beschreiben zu können, mussten diese innerhalb der Zellgemische mit Hilfe des Auswerteprogramms FlowJo® durch Auswahlfenster selektiert werden. Dafür wurde die in Abb. 6-1 exemplarisch dargestellte Strategie entwickelt. Es ist zu beachten, dass nur die jeweils ausgewählten Populationen im nächsten Fenster dargestellt sind. Das Setzen der Auswahlfenster erfolgte zuerst anhand der PBMZ, die als Vergleichspopulation diente, und wurde dann auf die TIL und NIL übertragen und bei Bedarf adaptiert. Der erste Auswahlrahmen wurde in einem Punktwolkendiagramm, an dem Größe (FSC) gegen Granularität (SSC) aufgetragen waren, grob um die Lymphozyten gelegt. Als nächstes wurden die lebenden Zellen ausgewählt, die bei einer Lebend/Tod-Färbung beispielsweise mit 7-AAD oder PI als nicht-markiert in dieser Fluoreszenz erscheinen. Da nur einzelne Zellen analysiert werden sollten und keine Dubletten oder Aggregate, die falsch-positive Ergebnisse liefern können, wurde die Einzelzellpopulation, die in einer Darstellung von Höhe (FSC-H) gegen Größe (FSC-A) in der Diagonalen erscheint, umrandet. In dieser Population können sich in den TIL- bzw. NIL-Ansätzen immer noch Tumorzellen bzw. Gewebszellen (CD45-negativ) befinden, weshalb die Proben mit einem CD45-Antikörper gefärbt und das Auswahlfenster im nächsten Schritt um die CD45-positiven Zellen gelegt wurde. Abschließend wurden die CD14- und CD19-positiven Zellen, welche durch Antikörper markiert waren, ausgeschlossen. Mittels der nun erhaltenen Zellpopulation können die zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) und die NK-Zellen

(CD3⁻CD56⁺) durch weitere Auswahlfenster bestimmt und anschließend genauer analysiert werden (Abb. 6-2).

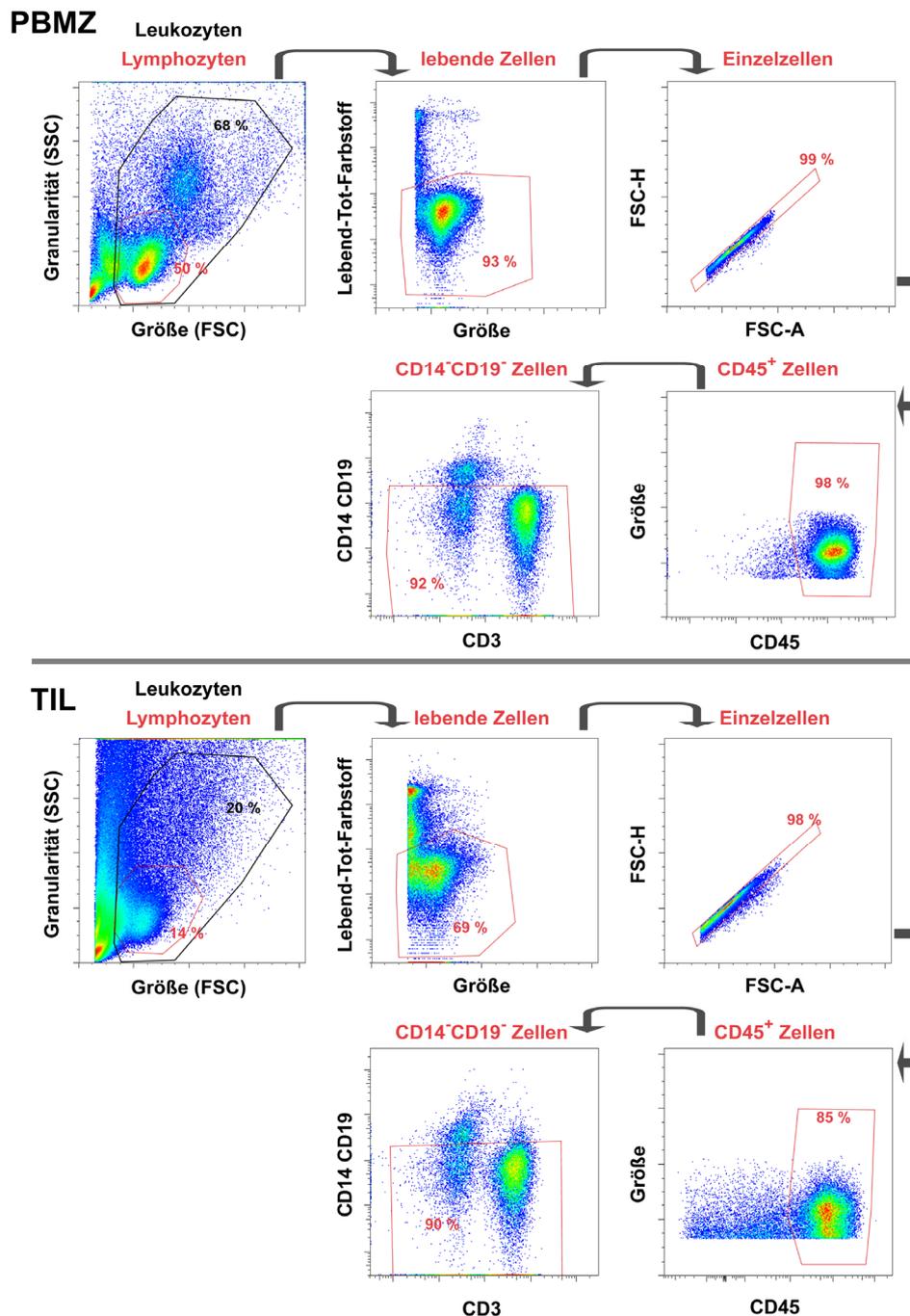


Abb. 6-1: Schema der Strategie zur Auswahlfensterpositionierung für die durchflusszytometrische Analyse der PBMZ, TIL und NIL

PBMZ, TIL und NIL wurden wie beschrieben isoliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Um die CD3⁺CD8⁺ und NK-Zellen der PBMZ, TIL und NIL charakterisieren zu können wurden im ersten Schritt die Lymphozyten (rotes Auswahlfenster) durch graphische Selektion in FlowJo® identifiziert. Bei der Analyse myeloischer Zellen wurde der Auswahlrahmen größer, um die gesamten Leukozyten, gelegt. Es wurden nacheinander folgende Populationen ausgewählt: Lymphozyten bzw. Leukozyten, lebende Zellen, einzelne Zellen, CD45-positive Zellen und CD14/CD19 nicht-markierte Zellen. Es ist die Auswahlfensterpositionierung am Beispiel eines PBMZ und TIL gezeigt.

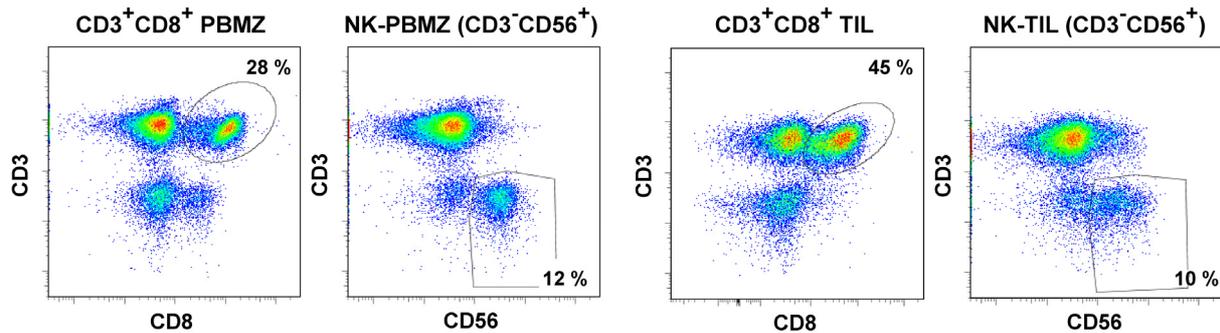


Abb. 6-2: Selektion der $CD3^+CD8^+$ und NK-Zellen in PBMZ und TIL

Nach Durchführung der in Abb. 6-1 beschriebenen Strategie wurden dann innerhalb der $CD45^+CD14^-CD19^-$ Population die zytotoxischen T-Zellen durch Umranden der $CD3^+CD8^+$ und die NK-Zellen durch Umranden der $CD3^-CD56^+$ ausgewählt. Es sind exemplarisch eine PBMZ- und eine TIL-Population gezeigt.

6.1.2 Zusammensetzung der TIL und NIL

Um die Zusammensetzung der TIL und NIL zu bestimmen, wurden diese, wie unter 5.2.7 beschrieben, aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen bzw. aus dem gesunden Gewebe der tumortragenden Niere isoliert. Da die Art der Immunantwort entscheidend von der Interaktion verschiedener Immunzelltypen geprägt ist, war es erstes Ziel, die Subgruppenzusammensetzung der TIL und NIL mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu bestimmen. Hierbei standen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen sowie myeloische Zellen als Hauptgruppen der Immunzellen im Vordergrund. Abb. 6-3 zeigt die prozentuale Zusammensetzung der Lymphozyten der untersuchten TIL (Kreise), NIL (Dreiecke nach oben zeigend) und PBMZ gesunder Spender (Dreiecke nach unten zeigend). TIL unterschieden sich nicht wesentlich im prozentualen Anteil der Gesamt-T-Zellen (Median: 79 %) und NK-Zellen (Median: 12 %) von PBMZ (Median: $CD3^+$ 79 %, NK-Zellen 12 %) bzw. NIL (Median: $CD3^+$ 65 %, NK-Zellen 16 %). Im prozentualen Anteil der $CD3^+CD8^+$ Zellen waren die TIL jedoch mit einem medianen Anteil von 37 % signifikant höher als die NIL mit 20 % und die PBMZ mit 21 %. Dementsprechend war der prozentuale Anteil der $CD3^+CD4^+$ Zellen der TIL (34 %) signifikant niedriger als der der PBMZ (49 %). Allerdings entsprach der mediane Anteil der $CD4^+$ T-Zellen der NIL (31 %) dem der TIL. In den NIL und in den PBMZ waren anteilig mehr $CD4^+$ als $CD8^+$ T-Zellen enthalten. TIL enthielten gleiche Anteile von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. So war in PBMZ gesunder Spender das prozentuale Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ innerhalb der T-Zellen 2, in den NIL 1,4 und in den TIL 0,9. Eine Studie mit 468 gesunden Blutspendern zeigte, dass das mediane Verhältnis $CD4^+/CD8^+$ bei 1,88 liegt (Amadori et al., 1995), also dem Bereich der PBMZ und NIL entspricht.

In den NIL wurden zwei Besonderheiten gefunden: Erstens ergaben die Anteile der $CD3^+CD8^+$ und $CD3^+CD4^+$ Zellen zusammen nicht den Gesamtanteil der T-Zellen. Der

fehlende Anteil kann durch eine Population von doppeltnegativen T-Zellen erklärt werden, die in den NIL nachgewiesen werden konnte. Zweitens ergaben die Anteile der T- und NK-Zellen addiert nicht 100 %. Welche Zellpopulation die Differenz ausmacht ist unklar. Es konnte lediglich ermittelt werden, dass es in den NIL einen Anteil an Zellen gab, der zwar CD45-positiv war, aber keinen weiteren der untersuchten Marker (CD3, CD8, CD4, CD19, CD14) exprimierte.

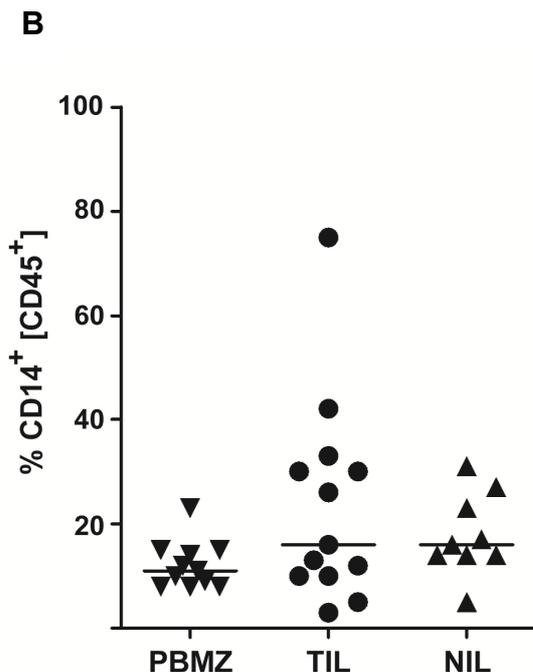
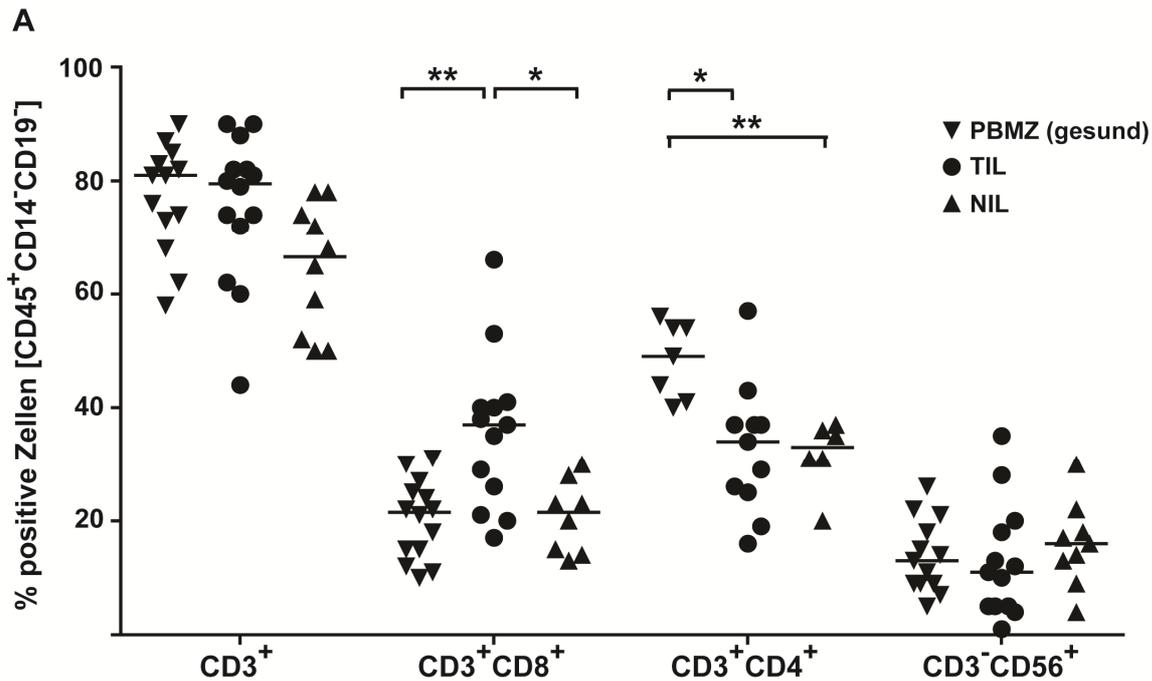


Abb. 6-3: Zusammensetzung der Leukozyten der PBMZ, TIL und NIL

TIL (Kreise) wurden aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen, NIL (Dreiecke nach unten) aus dem gesunden Gewebe der tumortragenden Niere und PBMZ (Dreiecke nach oben) aus Blut gesunder Spender isoliert und mittels Durchflusszytometrie und geeigneter Auswahlfenster analysiert. Auf der y-Achse ist der Anteil positiver Zellen innerhalb der CD45⁺CD14⁺CD19⁻ (A) bzw. der Anteil CD14⁺ Zellen innerhalb der CD45⁺ Zellen (B) dargestellt. Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten bzw. gesunden Spenders. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (CD3⁺CD8⁺: p=0,03; CD3⁺CD4⁺: p=0,003) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (*p<0,05; ** p<0,01).

Zur Analyse der myeloischen Zellen wurde der Marker CD14 verwendet. Da diese Zellen größer und granulärer als Lymphozyten sind, wurde die in Abb. 6-1 gezeigte, größere Eingrenzung um die gesamte Zellpopulation verwendet. Der prozentuale Anteil der CD14⁺ Zellen wurde dann innerhalb der CD45⁺ Zellen, also aller Leukozyten, bestimmt.

Wie in Abb. 6-3 B zu erkennen, waren im gesunden Spender im Median ca. 11 % der Leukozyten CD14⁺. Die TIL zeigten eine große Streuung, wobei der TIL mit dem niedrigsten Anteil bei ca. 3 % CD14⁺ Zellen lag und der höchste bei fast 80 %. Im Median ist der Gehalt an CD14⁺ Zellen (16 %) aber nur etwas höher als bei PBMZ. Die NIL entsprachen mit ebenfalls 16 % CD14⁺ Zellen dem Median der TIL.

6.1.3 Funktionelle Analyse der CD3⁺CD8⁺ und NK-Zellen mittels des CD107-Mobilisierungsverfahrens

Der wesentliche Unterschied zwischen TIL und NIL bzw. PBMZ war ein erhöhter Anteil der CD3⁺CD8⁺ Zellen. Wie frühere Untersuchungen an Gewebeschnitten von RCC-Tumoren in der Arbeitsgruppe gezeigt hatten, sind die CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen positiv für den lytischen Granulamarker GMP-17. Somit handelt es sich um differenzierte Effektorzellen. Zusätzlich wurde auch die funktionelle Kapazität der Granulaexozytose in situ untersucht und es konnte gezeigt werden, dass CD3⁺CD8⁺ Zellen differenzierte ZTL mit lytischen Granula sind, welche aber in situ defizient in der Granulaexozytose sind (Skrablin, 2007).

Um die Granulaexozytose der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und der NK-Zellen ex vivo zu analysieren, wurde der unter 3.4.3 beschriebene CD107-Mobilisierungstest angewendet. Hierzu wurden die, aus Gewebe bzw. aus Blut gesunder Spender isolierten, Zellen für 5 Std. mit P815-OKT3 für T- bzw. K562 für NK-Zellen im Beisein der CD107a und CD107b Antikörper inkubiert. Abb. 6-4 zeigt beispielhaft die 0- bzw. 5-Std.-Werte der NK-Zellen einer TIL-, NIL- und PBMZ-Probe. Es wurde ein Auswahlfenster um die NK-Zellen gelegt und diese dann in einem Punktwolkendiagramm mit CD56 auf der y-Achse und CD107 auf der x-Achse abgebildet. Funktionell aktive NK-Zellen (=CD107⁺) erscheinen im rechten oberen Quadranten. Dies waren bei PBMZ 20 %, bei TIL 3 % und bei NIL 23 % CD107⁺ NK-Zellen. Die Auswertung für die CD3⁺CD8⁺ Zellen erfolgte analog den NK-Zellen mit entsprechend auf CD3⁺CD8⁺ Zellen gelegtem Auswahlrahmen.

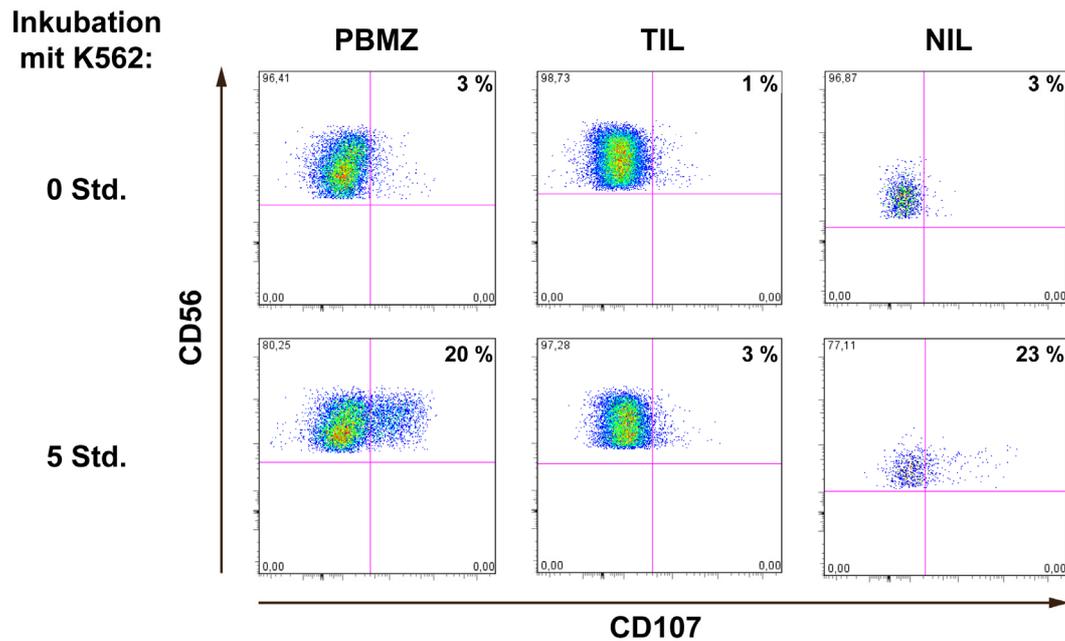


Abb. 6-4: Punktwolkendiagramm zur Auswertung der CD107-Oberflächenmobilisierung am Beispiel der NK-Zellen

TIL, NIL und PBMZ wurden für 0 Std. (obere Reihe) bzw. 5 Std. (untere Reihe) mit K562 im Beisein der CD107-Antikörper inkubiert. Auf der y-Achse ist CD56, auf der x-Achse CD107 dargestellt. Degranulierende NK-Zellen werden CD107-positiv und erscheinen im rechten oberen Quadranten. Die Zahlen in den Quadranten zeigen den Prozentsatz der CD107-positiven Zellen.

Die Zusammenstellung aller untersuchten Proben zeigt (Abb. 6-5), dass die NK-Zellen der TIL mit einem Median von 7 % eine verminderte Degranulationskapazität im Vergleich zu NK-Zellen der NIL (14 %) und PBMZ (11 %) besaßen. Bei den CD3⁺CD8⁺ Zellen degranulierten bei TIL im Median 3 %, bei NIL 13 % und bei PBMZ 8 %. Somit waren in den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL wesentlich weniger Zellen funktionell aktiv als in den Zellen der PBMZ, obwohl TIL zu 98 % differenzierte Effektorzellen mit lytischen Granula (GMP-17⁺) sind, während bei PBMZ im Median nur 39 % (n=12) der CD3⁺CD8⁺ Zellen differenzierte ZTL (CD8⁺GMP-17⁺) und der Rest naive Zellen ohne lytische Granula sind, die somit auch nicht degranulationsfähig sind. Somit wiesen die CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL einen signifikanten Defekt in der CD107-Oberflächenmobilisierung im Vergleich zu den Zellen der NIL oder PBMZ auf.

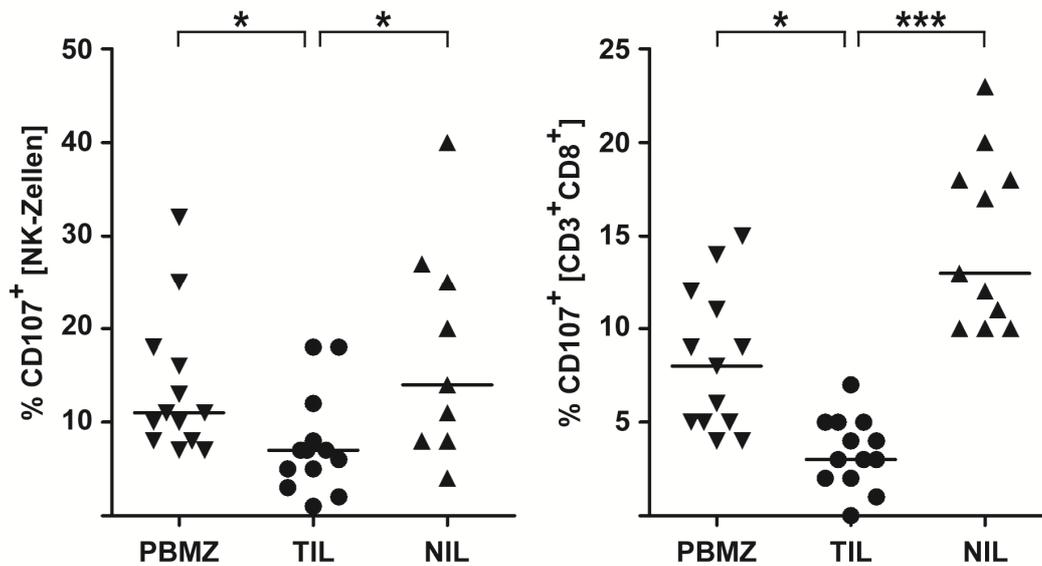


Abb. 6-5: CD107-Oberflächenmobilisierung der NK- und CD3⁺CD8⁺ Zellen nach Exposition mit Zielzellen

TIL, NIL und PBMZ wurden wie beschrieben isoliert und die jeweiligen Subgruppen durch graphische Selektion in FlowJo® bestimmt. Mit Hilfe des CD107-Mobilisierungstestes wurde die funktionelle Aktivität analysiert. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil CD107-positiver Zellen innerhalb der NK-Zellen (links) bzw. CD3⁺CD8⁺ Zellen (rechts). Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten bzw. gesunden Spenders. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (NK-Zellen: $p=0,114$; CD3⁺CD8⁺: $p<0,0001$) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* $p<0,05$; *** $p<0,001$).

6.1.4 Nachweis der Zytotoxine in NK- und CD3⁺CD8⁺ Zellen

Die lytischen Proteine Perforin und Granzym B sind die entscheidenden Moleküle in zytotoxischen Effektorzellen (Lieberman, 2003), die für das Abtöten von Tumorzellen notwendig sind. Perforin ist erforderlich, damit Granzym B in die Zielzelle gelangen kann, um dort Apoptose auszulösen. Die zytolytischen Proteine in NK- und CD3⁺CD8⁺ Zellen der PBMZ, TIL und NIL wurden mit Hilfe von Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert. Die NK- und CD3⁺CD8⁺ Zellen wurden softwaregestützt ausgewählt und anschließend innerhalb der jeweiligen Subgruppe, die positiven Zellen für Perforin bzw. Granzym B identifiziert. Eine Zusammenfassung aller untersuchten Patienten bzw. gesunder Spender ist in Abb. 6-6 dargestellt, wobei (A) den Prozentsatz Perforin-positiver und (B) den Granzym B-positiver Zellen zeigt. Die NK-Zellen in TIL hatten mit nur 65 % Perforin-positiven NK-Zellen einen signifikant niedrigeren Anteil als NIL (88 %) oder PBMZ (96 %). In den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL waren im Median 31 % der Zellen Perforin-positiv, was verglichen mit den 41 % Perforin-positiven Zellen aus den NIL, signifikant weniger war. In den PBMZ waren 31 % der

CD3⁺CD8⁺ Zellen Perforin-positiv, also vergleichbar mit TIL, obwohl – wie bereits erläutert - in PBMZ hauptsächlich naive CD8⁺ T-Zellen vorhanden sind und Effektorzellen mit lytischen Granula in der Minderzahl sind. Beim Vergleich GMP-17⁺CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺CD8⁺ Zellen mit lytischen Granula) in TIL und PBMZ hatten die GMP-17⁺CD8⁺ ZTL in TIL mit einem medianen Anteil von 31 % signifikant weniger Perforin-positive Zellen als die GMP-17⁺CD8⁺ ZTL in PBMZ (Median 53 %). Die fünf durchflusszytometrisch analysierten ZTL-Klone waren im Median zu 98 % Perforin-positiv. Daher kann die Aussage getroffen werden, dass die T-Effektorzellen der TIL in ihrer Anzahl an Perforin-positiven Zellen deutlich reduziert sind.

Bei der Analyse des Granzym B zeigte sich, dass NK-Zellen gesunder Spender im Median nur zu 45 % Granzym B-positiv waren, obwohl fast alle NK-Zellen Perforin-positiv waren. Die Erklärung ist, dass sich im Blut hauptsächlich ruhende NK-Zellen befinden. In den TIL wurde ein geringerer Anteil an Granzym B-positiven NK-Zellen (36 %) gefunden. Der Unterschied war im Vergleich zu dem Anteil Granzym B-positiver NK-Zellen in NIL (86 %) höchst signifikant niedriger. Granzym B bei CD3⁺CD8⁺ Zellen in TIL war mit 30 % höher als in PBMZ (14 %) aber signifikant weniger als in NIL (50 %), wobei auch hier der hohe Anteil naiver Zellen in den PBMZ beachtet werden muss. Eine Bewertung des Granzym B-Anteils in CD3⁺CD8⁺GMP-17⁺ Zellen wurde nicht durchgeführt.

Obwohl differenzierte CD8⁺ T- und NK-Zellen mit lytischen Granula ausgestattet sind, zeigte sich eine mangelhafte Ausstattung mit zytotoxischen Proteinen und stark beeinträchtigter Fähigkeit zur Granulaexozytose in TIL im Vergleich zu den entsprechenden Zelltypen in den NIL oder PBMZ.

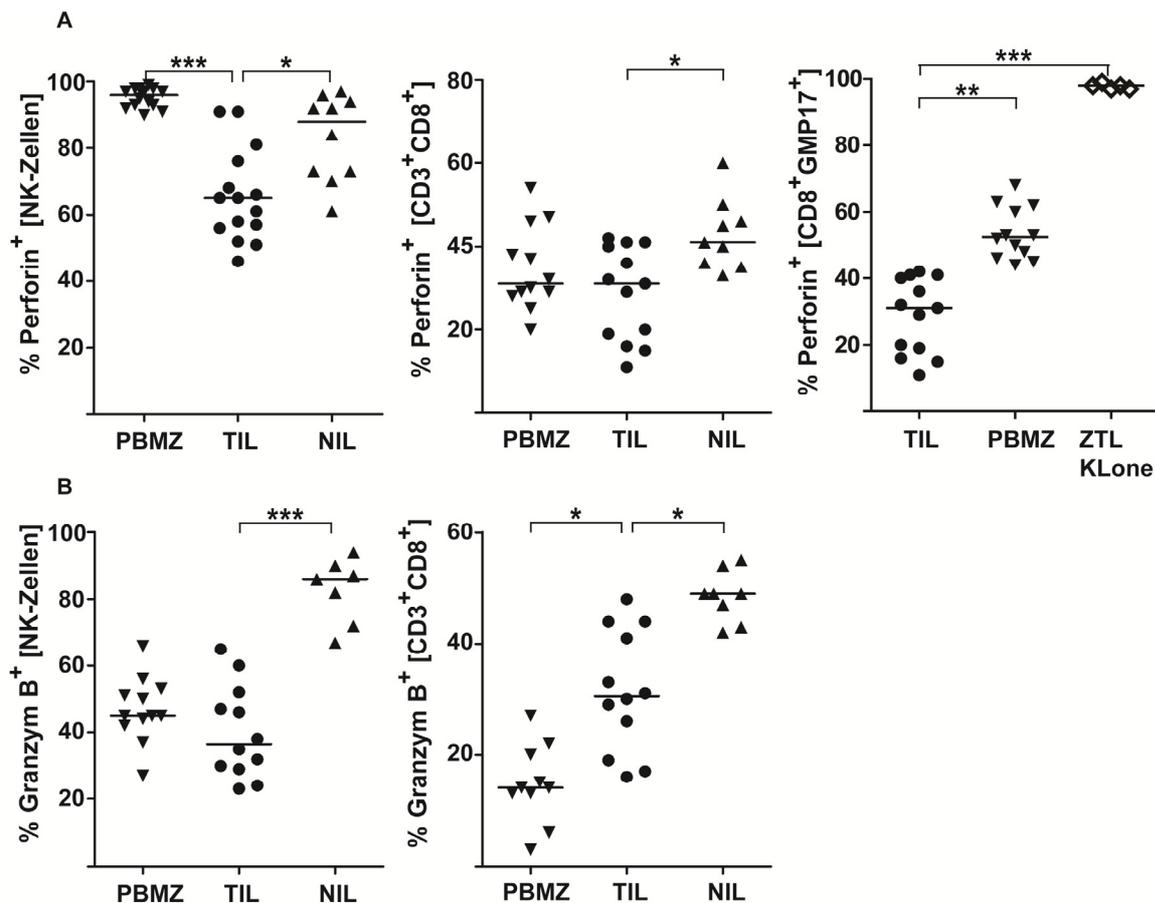


Abb. 6-6: Bestimmung des prozentualen Anteils Perforin- bzw. Granzym B-positiver Effektorzellen

TIL, NIL und PBMZ wurden wie beschrieben isoliert und die jeweiligen Subgruppen durch graphische Selektion in FlowJo® bestimmt. Die ZTL-Klone wurden wie beschrieben restimuliert und kultiviert. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen für Perforin (A) bzw. Granzym B (B) innerhalb der NK-Zellen (links) bzw. $CD3^+CD8^+$ Zellen (Mitte) und $CD8^+GMP-17^+$ Zellen (rechts). Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten bzw. gesunden Spenders oder ZTL-Klons. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (Perforin: NK-Zellen $p < 0,0001$, $CD3^+CD8^+$ $p = 0,03$; $CD8^+GMP-17^+$ $p < 0,0001$; Granzym B: NK-Zellen $p = 0,0002$, $CD3^+CD8^+$ $p < 0,0001$) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

6.1.5 Analyse der Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen

Eine differentielle Analyse von Oberflächenmarkern sollte weitere Aufschlüsse über die funktionelle Kapazität der tumorinfiltrierenden NK-Zellen geben. Dazu wurden einerseits aktivierende Oberflächenmarker wie NKp46, NKp44, NKG2D und 2B4 untersucht, welche für die Zytolyse und die Zytokinsekretion wichtig sind (Moretta et al., 2000; Fauriat et al., 2009). Andererseits wurden NKp44, CD69 und CD57 bestimmt, um zu ermitteln, ob die NK-Zellen im Tumor aktiviert sind. Abb. 6-7 zeigt, dass in PBMZ im Median 71 % der NK-Zellen positiv für NKp46 (A) waren, während es in den NK-Zellen der NIL 48 % und in den NK-Zellen der

TIL nur 28 % waren. Somit war der prozentuale Anteil der NKp46-positiven NK-Zellen in den TIL im Vergleich zu NIL signifikant und im Vergleich zu PBMZ höchst signifikant erniedrigt. Dagegen wurde für einen weiteren aktivierenden Rezeptor, NKG2D, welcher an stressinduzierte Proteine binden kann, keine signifikanten Unterschiede zwischen den NK-Zellen der PBMZ, TIL und NIL beobachtet. (Abb. 6-7. B: PBMZ 66 %, TIL 67 %, NIL 61 %). Auch die Analyse des Rezeptors 2B4 zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 6-7 C: PBMZ 89 %, TIL 90 %, NIL 96 %). NKp44 wird nach Aktivierung der NK-Zellen - z.B. durch IL-2 - hochreguliert und ist daher auf peripheren NK-Zellen kaum ausgeprägt. Dies bestätigte sich in der Analyse der PBMZ gesunder Spender (Abb. 6-7 D).

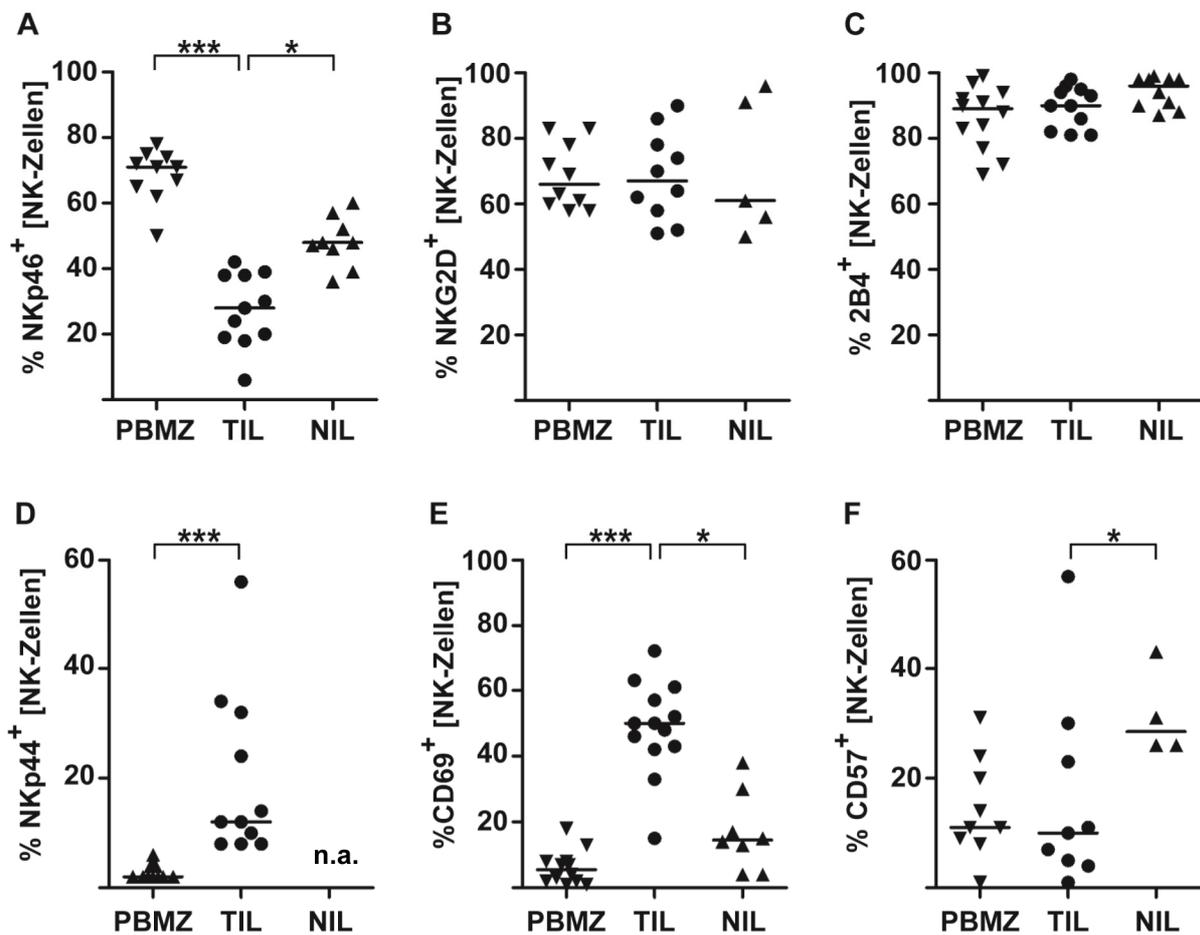


Abb. 6-7: Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen in PBMZ, TIL und NIL

TIL, NIL und PBMZ wurden wie beschrieben isoliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurde die NK-Zell-Subgruppe bestimmt und hinsichtlich ihrer Positivität für verschiedene Oberflächenmoleküle ausgewertet. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen für A) NKp46, B) NKG2D, C) 2B4, D) NKp44, E) CD69 und F) CD57 innerhalb der NK-Zellen. Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten bzw. gesunden Spenders. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (NKp46: $p < 0,0001$, NKp44: $p < 0,0001$, CD69: $p < 0,0001$, CD57: $p = 0,06$) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). n.a.: nicht analysiert.

TIL hatten einen gewissen Anteil NKp44-positive Zellen (im Median 6 % mit großer Streuung zwischen den Proben). Die NKp44-Expression in den NK-Zellen der NIL wurde nicht untersucht.

CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker, dessen Expression jedoch auch mit immunmodulatorischen Eigenschaften einhergehen soll (Sancho et al., 2005). Die NK-Zellen der TIL wiesen mit einem medianen Anteil von 50 % einen signifikant höheren prozentualen Anteil an CD69-positiven Zellen auf (Abb. 6-7 E) als NK-Zellen der PBMZ (6 %) oder NIL (15 %).

Die Untersuchung von CD57 (Abb. 6-7 F) ergab, dass NK-Zellen der PBMZ und TIL vergleichbare Anteil an CD57-positiven Zellen besaßen (im Median 10 %), wohingegen der prozentuale Anteil in den NK-Zellen der NIL höher (29 %) war. Dies ist konsistent mit den Daten der Zytotoxinanalyse, da es beschrieben ist, dass CD57 von enddifferenzierten NK-Zellen exprimiert wird und die Expression von CD57 mit der der zytotoxischen Proteine korreliert (Chattopadhyay et al., 2009).

Zusammenfassend ergab sich aus der Analyse der Oberflächenrezeptoren, dass die NK-Zellen der TIL einen reduzierten Anteil an NKp46⁺ und vergleichbare Anteile an NKG2D⁺ oder 2B4⁺ Zellen im Vergleich zu den NK-Zellen der NIL oder der PBMZ aufwiesen. Außerdem zeigten die NK-Zellen der TIL im Gegensatz zu den Zellen der NIL oder PBMZ Anzeichen von Aktivierung durch den erhöhten Anteil NKp44⁺ und CD69⁺ NK-Zellen.

6.1.6 Analyse der Oberflächenrezeptoren auf CD3⁺CD8⁺ Zellen

Ebenso wie die NK-Zellen exprimieren auch zytotoxische T-Zellen die Oberflächenmarker NKG2D, 2B4, CD69 und CD57 (Abb. 6-8). Der NKG2D-Rezeptor, über welchen ZTL kostimuliert werden können, wurde in den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL (Abb. 6-8 A) im Median von 59 % der Zellen exprimiert, was verglichen mit den CD3⁺CD8⁺ Zellen der NIL (84 %) und PBMZ (77 %) signifikant niedriger war. Die Untersuchung des Markers 2B4 (Abb. 6-8 B) zeigte, dass von den CD3⁺CD8⁺ Zellen der PBMZ nur 23 % positiv für diesen Marker waren, wohingegen es in den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL bzw. NIL ca. 79 % waren. Der niedrige Wert bei PBMZ liegt daran, dass 2B4 auf Effektor-T-Zellen aber nicht auf naiven T-Zellen exprimiert wird (Speiser et al., 2001) und PBMZ hauptsächlich naive Zellen enthalten, während TIL und NIL hauptsächlich Effektorzellen sind. CD69 wurde von 67 % der CD3⁺CD8⁺ Zellen in TIL exprimiert, wohingegen es in den NIL nur 34 % und in den PBMZ 12 % der CD3⁺CD8⁺ Zellen waren. Die Analyse von CD57 zeigte, dass der Anteil der CD57-positiven CD3⁺CD8⁺ Zellen innerhalb der PBMZ bzw. TIL nicht signifikant unterschiedlich war (PBMZ: 6 %, TIL 11 %), in den CD3⁺CD8⁺ Zellen der NIL jedoch ein signifikant höherer Anteil (28 %) an CD57-positiven Zellen zu finden war.

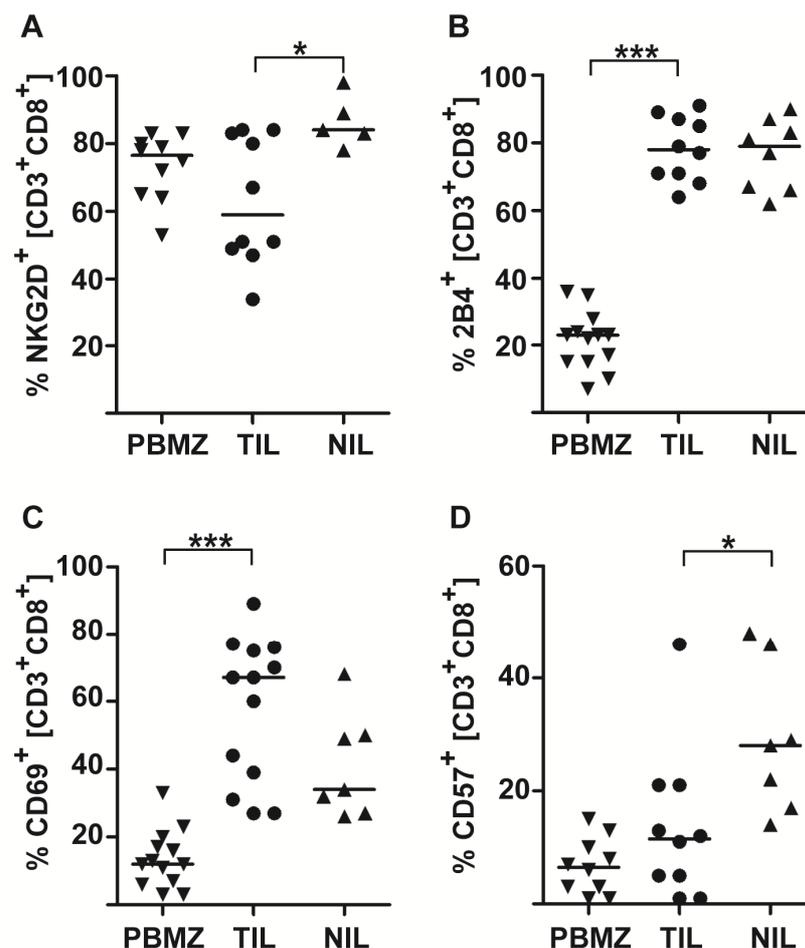


Abb. 6-8: Oberflächenrezeptoren auf CD3⁺CD8⁺ Zellen in PBMZ, TIL und NIL

TIL, NIL und PBMZ wurden wie beschrieben isoliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die CD3⁺CD8⁺ Zellen bestimmt und hinsichtlich ihrer Positivität für verschiedene Oberflächenmoleküle ausgewertet. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen für A) NKG2D, B) 2B4, C) CD69 und D) CD57 Zellen innerhalb der CD3⁺CD8⁺ Zellen. Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten bzw. gesunden Spenders. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (NKG2D: p=0,03, 2B4: p<0,0001, CD69: p<0,0001, CD57: p=0,002) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (*p<0,05, *** p<0,001).

Der erhöhte Anteil an 2B4⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellen ist konsistent mit dem erhöhten Anteil differenzierter GMP-17⁺CD8⁺ T-Zellen in TIL und NIL im Vergleich zu PBMZ (nachgewiesen von P. Skrabin, Dissertation). Eine In-situ-Aktivierung der CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL wird durch deren erhöhten Anteil CD69-positiver Zellen angedeutet. Der erniedrigte Anteil CD57-positiver CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL im Vergleich zu den Zellen der NIL ist konsistent mit den Daten der Zytotoxinanalyse, da es beschrieben ist, dass die CD57-Expression mit der Expression der zytotoxischen Proteine korreliert (Chattopadhyay et al., 2009), welche im Fall der TIL im Vergleich zu NIL reduziert war.

6.2 Reversion der aufgezeigten Defizite in TIL durch IL-2-Kultivierung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die in den Effektorzellen der TIL aufgedeckten Defizite revertierbar sind. Dafür wurden die TIL für 48 Std. in niedrigdosiertem IL-2-Medium (50 U/ml) kultiviert. Es wurde IL-2 verwendet, weil es zur Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms eingesetzt wird und gute Erfolge damit erzielt wurden (Oberneder et al., 2003; Wong, 2008). Nach der IL-2-Kultivierung wurde ein Teil der TIL in den CD107-Mobilisierungstest eingesetzt, anschließend mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der andere Teil wurde direkt nach der IL-2-Kultur mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker und Zytotoxine gefärbt und analysiert.

6.2.1 Vergleich der Zytotoxine und funktionellen Aktivität der NK- und CD3⁺CD8⁺ Zellen in TIL vor und nach IL-2-Kultivierung

Da die Expression lytischer Proteine zusammen mit der Fähigkeit zur Degranulation für eine effiziente lytische Aktivität notwendig ist, werden die Ergebnisse dieser Parameter gemeinsam vorgestellt (Abb. 6-9). Dabei sind die Anteile positiver Zellen für den untersuchten Marker jeweils im Vergleich zwischen dem unkultivierten, nativen Zustand und nach IL-2-Kultivierung dargestellt. In Abb. 6-9 A sind die NK-Zellen und in Abb. 6-9 B die CD3⁺CD8⁺ Zellen aufgezeigt.

Der prozentuale Anteil der Perforin- bzw. Granzym B-positiven NK-Zellen der TIL stieg durch die IL-2-Kultivierung von einem medianen Wert von 65 % auf 84 % bzw. von 37 % auf 82 % an. Patienten-individuell berechnet war die Zunahme von Perforin in NK-Zellen der TIL im Median 1,3-fach (niedrigste Zunahme 1,0-fach, höchste 1,8-fach) und von Granzym B 2-fach (niedrigste Zunahme 1,3-fach, höchste 3-fach). Auch in den CD3⁺CD8⁺ Zellen nahmen durch die IL-2-Kultivierung die Perforin-positiven (Median: von 32 % auf 79 %) und die Granzym B-positiven (Median: 31 % auf 76 %) Zellen deutlich zu. Die Zunahme von Perforin in CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL war im Median 2,6-fach (niedrigste Zunahme 1,4-fach, höchste 7,7-fach) und von Granzym B 2-fach (niedrigste Zunahme 1,4-fach, höchste 6,2-fach).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch die IL-2-Kultivierung signifikant mehr Effektorzellen hervorgebracht wurden, die lytische Proteine aufwiesen. Es wurden jeweils im Median die Werte der entsprechenden Zellen in NIL erhalten (Abb. 6-6). Einhergehend mit dem höheren Anteil an zytotoxinpositiven Effektorzellen zeigte sich auch ein Gewinn in funktioneller Aktivität (Abb. 6-9). Während in den nativen, unkultivierten NK-Zellen der TIL nur 7 % und in den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL nur 3 % der Zellen degranulierten, so waren es nach IL-2-Kultivierung der TIL bei NK-Zellen 26 % und bei CD3⁺CD8⁺ Zellen 17 %.

Die Zunahme der degranulationsaktiven NK-Zellen der TIL war im Median 4,9-fach (niedrigste Zunahme 1,2-fach, höchste 26-fach) und der CD3⁺CD8⁺ Zellen 5,8-fach (niedrigste Zunahme 2,5-fach, höchste 11-fach).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Defekte in der Expression von Perforin und Granzym B, sowie in der funktionellen Aktivität der TIL-Effektorzellen durch die Kultivierung in niedrigdosiertem IL-2-Medium überkommen werden konnten.

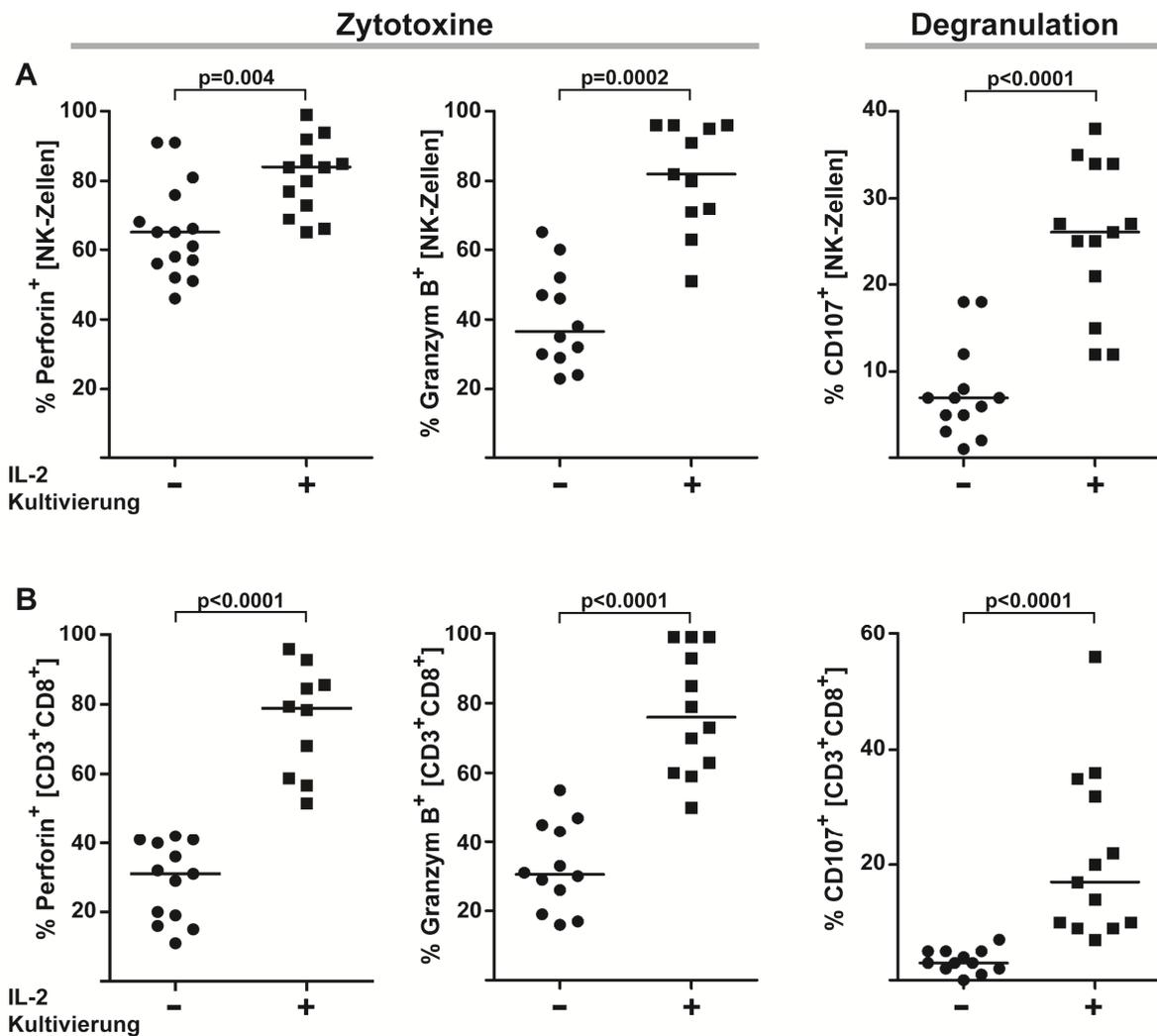


Abb. 6-9: Vergleich der Zytotoxine und der CD107-Oberflächenmobilisierung der Effektorzellen der TIL vor und nach IL-2-Kultivierung

TIL wurden wie beschrieben isoliert und direkt ohne Kultivierung, oder nach 48 Std. Kultivierung mit IL-2 (50 U/ml) mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zur Bestimmung der funktionellen Aktivität wurde der CD107-Mobilisierungstest angewandt. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden NK- (A) bzw. CD3⁺CD8⁺ Zellen (B) bestimmt und hinsichtlich ihrer Positivität für Perforin, Granzym B und CD107 ausgewertet. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der NK-Zellen (A) oder CD3⁺CD8⁺ Zellen (B). Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt und ist als p-Wert angegeben.

6.2.2 Vergleich der Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen der TIL vor und nach IL-2-Kultivierung

Die NK-Zellen der TIL wurden hinsichtlich der Anteile an Rezeptor-positiven Zellen nach der IL-2-Kultivierung im Vergleich zum nativen Zustand untersucht. Dabei wurde der Anteil an NKp46- (Abb. 6-10 A), NKG2D- (Abb. 6-10 B), 2B4- (Abb. 6-10 C), NKp44- (Abb. 6-10 D), CD69- (Abb. 6-10 E) und CD57- (Abb. 6-10 F) positiven NK-Zellen der TIL ermittelt. Die Analyse ergab, dass der Anteil sowohl der NKp46- als auch der NKp44-positiven NK-Zellen der TIL höchst signifikant zunahm (NKp46: Median von 30 % auf 84 %; NKp44: Median von 6 % auf 21 %). Patienten-individuell ausgewertet ergab sich eine Zunahme der NKp46- bzw. NKp44-positiven NK-Zellen der TIL war im Median 3,1-fach bzw. 2,5-fach (niedrigste NKp46-Zunahme 1,7-fach, höchste 12,8-fach bzw. niedrigste NKp44-Zunahme 1,1-fach, höchste 6,4-fach).

Auch der Anteil CD69-positiver NK-Zellen in TIL erhöhte sich durch die IL-2-Kultivierung: von im Medianen 50 % im nativen Zustand auf 91 % nach der IL-2-Kultivierung (mediane Zunahme 1,7-fach, zwischen 1,1-fach und 2,3-fach).

Nur kleine Veränderung im medianen Anteil positiver Zellen zeigte sich für NKG2D, 2B4 und CD57. Die mediane Zunahme der NKG2D-positiven NK-Zellen der TIL war 0,8-fach (zwischen 0,6-fach und 1,7-fach), die der 2B4-positiven 0,9-fach (zwischen 0,8-fach und 1-fach) und die der CD57-positiven 1,2-fach (zwischen 0,8-fach (der Anteil der CD57⁺ Zellen eines Patienten fiel von 10 % auf 8 %) und 12-fach (der Anteil der CD57⁺ Zellen eines Patient stieg von 1 % auf 12 %; alle anderen nahmen im Anteil zu).

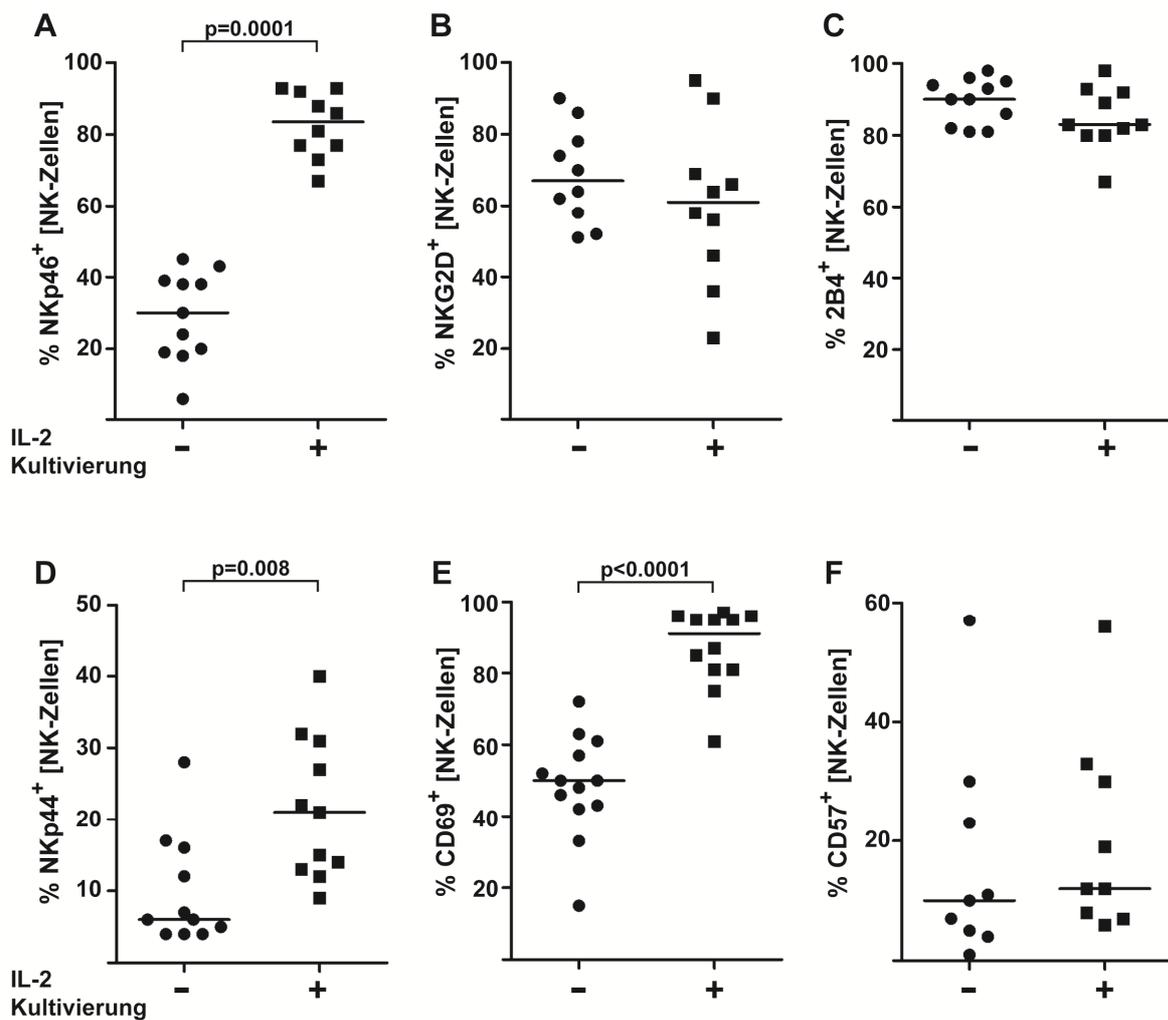


Abb. 6-10: Vergleich von Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen der TIL vor und nach IL-2-Kultivierung

TIL wurden wie beschrieben isoliert und direkt ohne Kultivierung, oder nach 48 Std. Kultivierung mit IL-2 (50 U/ml), mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden NK-Zellen bestimmt und hinsichtlich ihrer Positivität für NKp46 (A), NKG2D (B), 2B4 (C), NKp44 (D), CD69 (E) und CD57 (F) ausgewertet. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der NK-Zellen. Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt und ist als p-Wert angegeben.

6.2.3 Vergleich der Oberflächenrezeptoren der CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL vor und nach IL-2-Kultivierung

Ebenso wie die NK-Zellen wurden auch die CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL nach der IL-2-Kultivierung erneut charakterisiert. In Abb. 6-11 ist eine Zusammenstellung der untersuchten Marker NKG2D, 2B4, CD69 und CD57 dargestellt. Die Oberflächenmarker NKG2D, 2B4 und

CD69 zeigten im Anteil der für diese Marker positiven Zellen keine signifikanten Unterschiede vor und nach der IL-2-Kultivierung.

Patienten-individuell ergab sich eine mediane Zunahme der NKG2D-positiven $CD3^+CD8^+$ Zellen von 0,7-fach (zwischen 0,2-fach und 2,2-fach; die Zellen eines Patienten nahmen im Anteil NKG2D⁺ zu, alle andern nahmen ab), die der 2B4-positiven von 0,8-fach (zwischen 0,6-fach und 1-fach; die Zellen eines Patienten nahmen im Anteil 2B4⁺ zu, alle andern nahmen ab) und die der CD69-positiven von 1,1-fach (zwischen 0,6-fach und 3-fach; die Zellen zweier Patient nahmen im Anteil CD69⁺ ab, alle andern nahmen zu). Allerdings nahm der Anteil der CD57-positiven $CD3^+CD8^+$ Zellen während der IL-2-Kultivierung signifikant zu (von 11 % auf 30 %; mediane Zunahme 2,6-fach, zwischen 1,4-fach und 13-fach (nur die Zellen eines Patienten zeigten eine so starke Zunahme)).

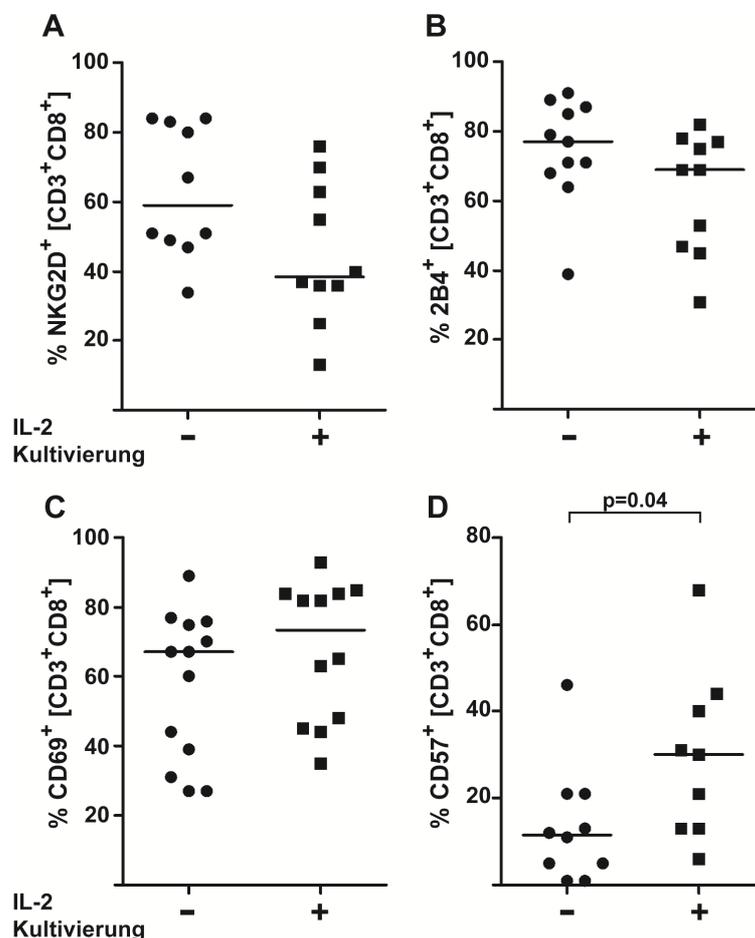


Abb. 6-11: Vergleich von Oberflächenrezeptoren auf $CD3^+CD8^+$ Zellen in TIL vor und nach IL-2-Kultivierung

TIL wurden wie beschrieben isoliert und direkt ohne Kultivierung, oder nach 48 Std. Kultivierung mit IL-2 (50 U/ml), mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden $CD3^+CD8^+$ Zellen bestimmt und hinsichtlich ihrer Positivität für NKG2D (A), 2B4 (B), CD69 (D) und CD57 (E) ausgewertet. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der $CD3^+CD8^+$ Zellen. Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt und ist als p-Wert angegeben.

6.3 Korrelationsanalysen zwischen exprimierten Markern, Subtypenzusammensetzung und funktioneller Aktivität in TIL

Die IL-2-Kultivierung der TIL zeigte, dass manche TIL einen höheren Anteil an CD107⁺ Effektorzellen nach Zielzellkontakt aufwiesen, also funktionsaktiver waren als andere. Es sollte ermittelt werden, ob bestimmte Marker mit der besseren Reaktion assoziiert sind. Schleyten et al (Schleyten et al., 2006) hatten gezeigt, dass NK-Zellen aus TIL, die einen hohen Anteil (> 20 %) an NK-Zellen besaßen, nach IL-2-Kultivierung zytotoxische Aktivität zeigten. Ein Zusammenhang zeigte sich bei den hier untersuchten Markern der TIL zwischen Degranulationsfähigkeit (Anteil CD107⁺ Zellen) und dem % NK-Zellanteil und den % Perforin-positiven NK-Zellen. So korrelierte der Anteil CD107⁺ NK-Zellen nach IL-2-Kultivierung hoch signifikant mit dem Anteil der NK-Zellen innerhalb der TIL (Abb. 6-12 links). Ebenso korrelierte der Anteil CD107-positiver NK-Zellen nach der IL-2-Kultivierung mit dem Anteil Perforin-positiver NK-Zellen im unkultivierten Zustand signifikant (Abb. 6-12 rechts).

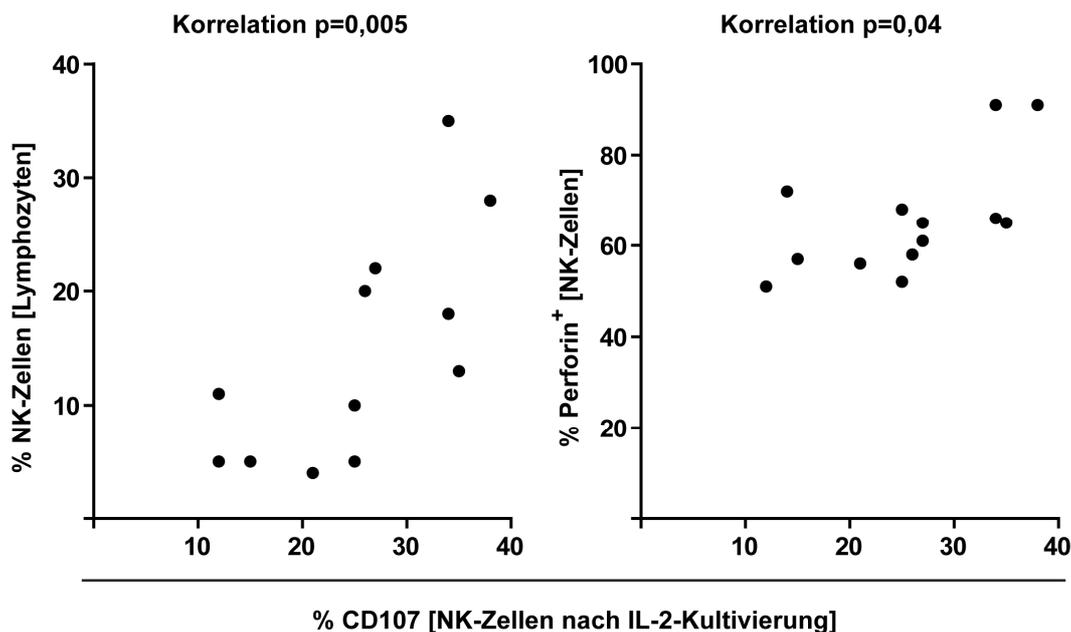


Abb. 6-12: Korrelationsanalysen zur Identifikation von NK-Zell-exprimierten Markern, die mit der CD107-Oberflächenmobilisierung von IL-2-kultivierten NK-Zellen assoziiert sind

Mit den, für die NK-Zellen der TIL erhaltenen Daten wurden nicht parametrische Korrelationsberechnungen nach Spearman durchgeführt. Die x-Achse zeigt den prozentualen Anteil an CD107⁺ NK-Zellen nach K562-Stimulation nach der IL-2-Kultivierung und die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil an NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten (links) und den prozentualen Anteil an Perforin⁺ Zellen innerhalb der nativen NK-Zellen (rechts) jeweils vor IL-2-Kultivierung. Jeder Kreis steht für die Zellen eines untersuchten Patienten (Spearman: % NK-Zellen r=0,75, p=0,005; % Perforin⁺ r=0,57, p=0,04).

Somit waren NK-Zellen, die vor der IL-2-Kultivierung bereits viele Perforin-positive Zellen aufwiesen, nach der IL-2-Kultivierung funktionell aktiver. Vor IL-2-Kultivierung waren fast alle NK-Zellen degranulationsinaktiv, unabhängig von ihrem Perforinstatus.

Weiterhin zeigte sich eine Korrelation bei unkultivierten TIL zwischen dem Anteil 2B4-positiver NK-Zellen der TIL und dem Anteil CD107-positiver NK-Zellen (Abb. 6-13). Es handelt sich hierbei um eine inverse Korrelation, da ein hoher Anteil an 2B4-positiven NK-Zellen mit einem geringen Anteil CD107-positiver NK-Zellen assoziiert war. Dies lässt vermuten, dass die Expression von 2B4 auf die NK-Zellaktivität einen ungünstigen Einfluss hat.

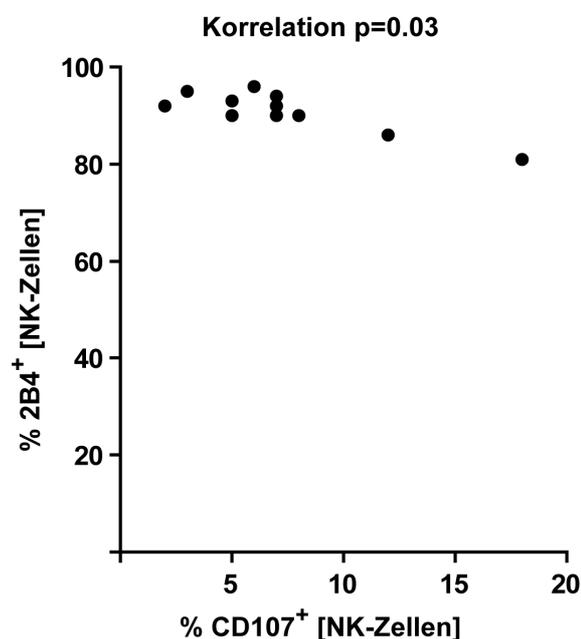


Abb. 6-13: Korrelationsanalysen zur Identifikation von NK-Zell-exprimierten Markern, die mit der CD107-Oberflächenmobilisierung von nicht-IL-2-kultivierten NK-Zellen assoziiert sind

Mit den, für die NK-Zellen der TIL, erhaltenen Daten wurden nicht parametrische Korrelations-Berechnungen nach Spearman durchgeführt. Die x-Achse zeigt den prozentualen Anteil CD107⁺ NK-Zellen nach Zielzellkontakt und die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil 2B4⁺ NK-Zellen der TIL, jeweils im nativen, unkultivierten Zustand. Jeder Kreis steht für die Zellen eines untersuchten Patienten (Spearman $r=-0,64$, $p=0,03$).

Korrelationsberechnungen wurden auch mit den, für die CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL gewonnenen Daten durchgeführt. Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen. Es zeigte sich allerdings die Tendenz, dass TIL, deren CD3⁺CD8⁺ Zellen einen guten zytotoxischen Status hatten, also einem hohen Anteil an Perforin- und Granzym B-positiven Zellen hatten, nach IL-2-Kultivierung funktionell aktiver waren (siehe Abb. 6-14).

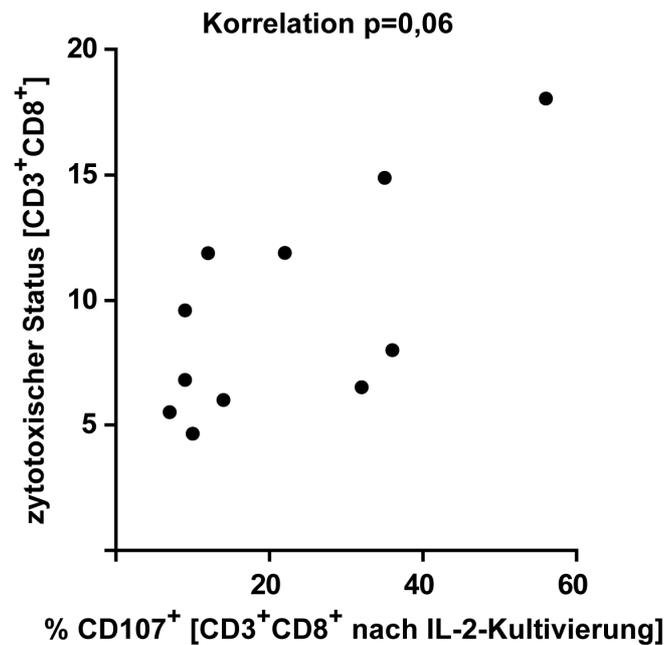


Abb. 6-14: Korrelationsanalysen zur Identifikation von CD3⁺CD8⁺ T-Zell-exprimierten Markern, die mit der CD107-Oberflächenmobilisierung von IL-2-kultivierten CD3⁺CD8⁺ Zellen assoziiert sind

Mit den, für die CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL, erhaltenen Daten wurden nicht parametrische Korrelationsberechnungen nach Spearman durchgeführt. Die x-Achse zeigt den prozentualen Anteil an CD107⁺ CD3⁺CD8⁺ Zellen nach der IL-2-Kultivierung nach Zielzellkontakt und die y-Achse zeigt den zytotoxischen Status der nicht IL-2-kultivierten CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL. Der zytotoxische Status wurde mit der Formel $(\% \text{ Perforin}^+ \times \text{Granzym B}^+)/100$ errechnet. Jeder Kreis steht für die Zellen eines untersuchten Patienten (Spearman: $r=0,58$, $p=0,06$).

6.4 Analyse der TIL von sunitinibbehandelten Patienten

Im Laufe meiner Doktorarbeit erhielten wir Tumormaterial von 4 Patienten, die mit Sunitinib behandelt wurden. Sunitinib ist ein Rezeptortyrosinkinaseinhibitor, der als Arzneistoff zur Behandlung fortgeschrittener und/oder metastasierter Nierenzellkarzinome eingesetzt wird. Er hemmt unter anderem die Rezeptoren für PDGF, VEGF, c-Kit, FLT, CSF und RET (Chow et al., 2007). Diese Rezeptoren werden mit dem Tumorwachstum, der pathologischen Angiogenese und der Entwicklung von Metastasen bei Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Aus den erhaltenen Tumorproben der 4 behandelten Patienten wurden die TIL isoliert und die NK- sowie die CD3⁺CD8⁺ Zellen im Vergleich zu den TIL unbehauelter Patienten charakterisiert. Abb. 6-15 A-F zeigt die Auswertung für die NK-Zellen. Die NK-Zellen der TIL der sunitinibbehandelten Patienten zeigten, verglichen mit den NK-Zellen der TIL von unbehauelten Patienten, im Median signifikant mehr CD107-positive Zellen (Abb. 6-15 A: 18 % gegenüber 7 %) und der Anteil 2B4-positiver NK-Zellen war signifikant niedriger (Abb. 6-15 E: 70 % 2B4⁺ NK-Zellen gegenüber 90 % bei unbehauelter Patienten). Die

Prozentanteile der anderen untersuchten Marker Perforin (B), Granzym B (C), NKp46 (D) und CD69 (F) waren in den NK-Zellen der TIL der beiden Gruppen vergleichbar, wobei bei Granzym B alle 4 Proben der sunitinibbehandelten Patienten über dem Median der unbehandelten Patienten lagen.

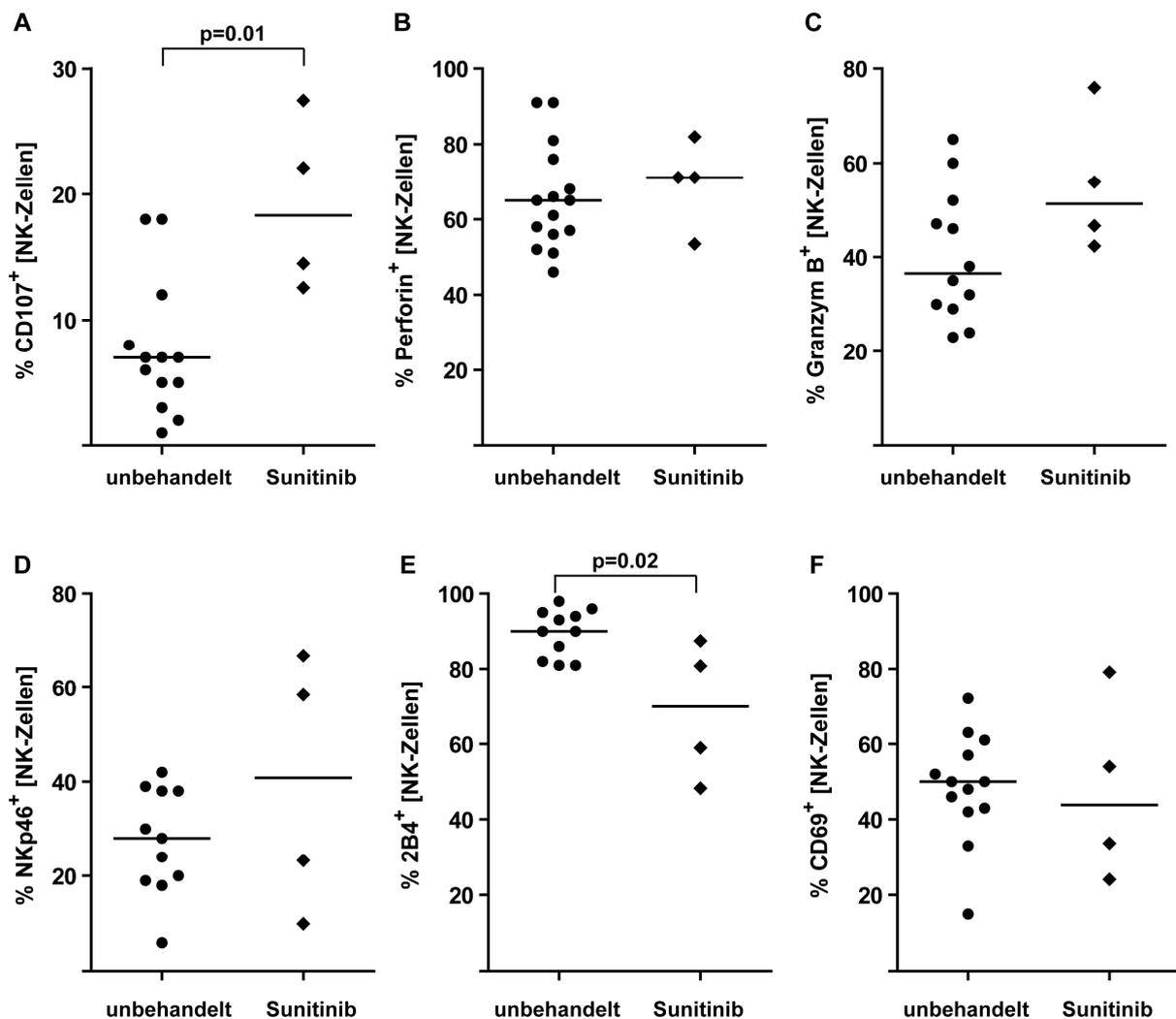


Abb. 6-15: Vergleich der NK-Zellen der TIL von unbehandelten und sunitinibbehandelten Patienten

TIL unbehauelter oder sunitinibbehandelter Patienten wurden wie beschrieben isoliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden NK-Zellen bestimmt und hinsichtlich ihrer Positivität für CD107 nach K562-Stimulation (A), Perforin (B), Granzym B (C), NKp46 (D), 2B4 (E) und CD69 (F) ausgewertet. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der NK-Zellen. Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt und ist als p-Wert angegeben.

Neben den NK-Zellen der TIL wurden auch die CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL der Sunitinibpatienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten untersucht (Abb. 6-16 A-E). Die CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL der Sunitinibpatienten zeigten keine signifikanten Unterschiede im

Anteil der CD107- (A), Perforin- (B), Granzym B- (C), 2B4- (D) und CD69-positiven (E) Zellen im Vergleich zu den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL der unbehandelten Patienten. Allerdings waren 3 der 4 TIL von Sunitinibpatienten in ihrem Anteil an CD107⁺ Zellen deutlich über dem Median der TIL unbehauelter Patienten und entsprachen deren höchstem Wert. Auffällig war weiterhin, dass bei Perforin alle TIL der Sunitinibpatienten unter dem Median der TIL unbehauelter Patienten lagen. Hingegen lagen die TIL der sunitinibbehandelten Patienten hinsichtlich des Anteils Granzym B-positiver Zellen über dem Median der TIL unbehauelter Patienten und entsprachen somit deren höchsten TIL. Für eine Interpretation dieser Beobachtungen müssen noch mehr TIL von Sunitinibpatienten analysiert werden.

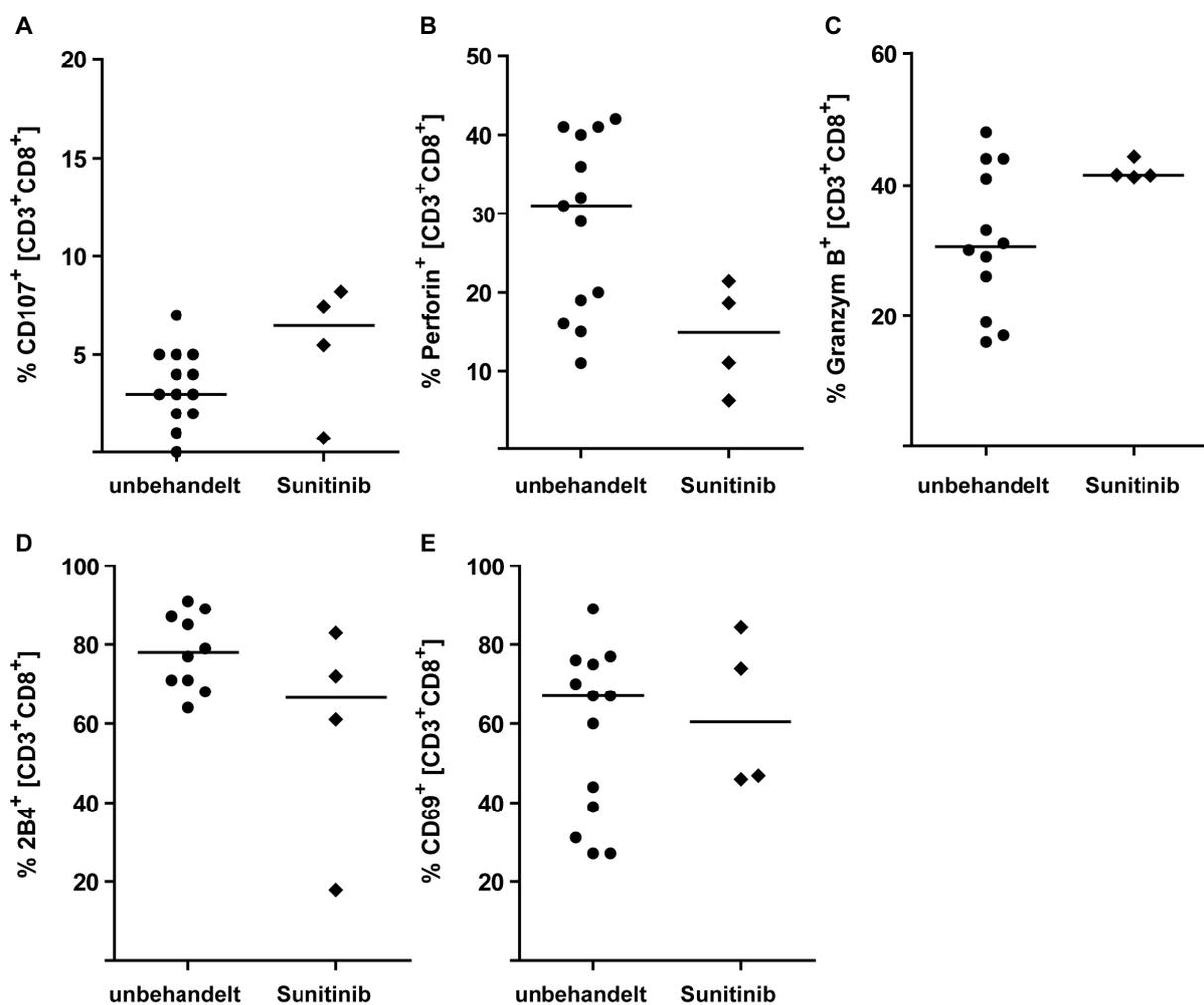


Abb. 6-16: Vergleich der CD3⁺CD8⁺ Zellen in TIL von unbehauelten und sunitinibbehandelten Patienten

TIL unbehauelter oder sunitinibbehandelter Patienten wurden wie beschrieben isoliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die CD3⁺CD8⁺ Zellen bestimmt und hinsichtlich ihrer Anteile für CD107nach P815-Okt3-Stimulation (A), Perforin (B), Granzym B (C), 2B4 (D) und CD69 (E) ausgewertet. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der CD3⁺CD8⁺ Zellen. Ein Symbol steht jeweils für die Zellen eines Patienten. Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an.

6.5 Evaluierung von In-vitro-Tumormodellen

Die Effektorzellen der TIL zeigten Defizite in den zytotoxischen Proteinen, der funktionellen Aktivität und der Rezeptorexpression, wovon einige durch Milieuänderung – Kultivierung in IL-2 – umkehrbar waren. Im nächsten Schritt sollte ein In-vitro-Tumormodell entwickelt werden. Mit Hilfe dieses Modells sollten die ex vivo beobachteten Merkmale induziert werden können, um einerseits zu erlernen, welche Faktoren für deren Induktion verantwortlich sind und um andererseits defizitäre Effektorzellen für mechanistische Untersuchungen verfügbar zu haben. Bei der Etablierung und Evaluierung des Tumormodells wurde der Fokus auf die NK-Zellen gelegt.

6.5.1 In-vitro-Kokultivierung mit hoher Tumorzellanzahl

Zunächst wurden gesunde Spender-PBL, welche als Quelle für NK-Zellen dienten, die keine Defizite aufweisen, mit einer hohen Anzahl an Tumorzellen kokultiviert, welches die In-situ-Tumorsituation reflektieren sollte. Die Versuche wurden so konzipiert, dass es möglich war, den Einfluss von Zellkontakt zusammen mit löslichen Faktoren, nur Zellkontakt bzw. nur lösliche Faktoren zu untersuchen. Nach der Koinkubation wurden die Zellgemische mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die NK-Zellen wurden nach der In-vitro-Kokultivierung auf dieselben Marker wie die NK-Zellen der TIL untersucht, um zu zeigen, ob in diesem In-vitro-Kokultivierungsmodell den NK-Zellen der TIL vergleichbare NK-Zellen entstehen.

Die Analyse der Zytotoxine (Abb. 6-17) ergab, dass Perforin in einer kontaktabhängigen Weise, bei Anwesenheit einer hohen Tumorzellzahl (8x), verloren geht. Die NK-Zellen, welche ohne Tumorzellen bzw. in einem Verhältnis von 1:1 mit Tumorzellen kokultiviert wurden, waren im Median zu 89 % Perforin-positiv. Im Gegensatz dazu waren die NK-Zellen, welche mit einer hohen Tumorzellzahl (Verhältnis 1:8) kokultiviert wurden, im Median nur noch zu 47 % Perforin-positiv. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Tumorzellen fixiert waren, also keine löslichen Faktoren produzieren konnten oder nicht, da bei einer Kokultivierung mit fixierten Tumorzellen der Anteil der Perforin-positiven NK-Zellen im Median ebenfalls auf 56 % absank. Die Tatsache, dass lösliche Faktoren keine Rolle für den Perforinverlust zu spielen schienen, bestätigte die Kultivierung der NK-Zellen in zellfreiem Tumorüberstand, welcher durch Kultivierung einer hohen Konzentration von Tumorzellen über 40 Std. generiert wurde. Bei Kokultur mit den von Tumorzellen sezernierten Faktoren trat kein Perforinverlust auf (8x ÜS: Median 82 % Perforin⁺ Zellen) (Abb. 6-17 A). Im Gegensatz zu Perforin wurde der prozentuale Anteil Granzym B-positiver NK-Zellen durch keine der Kultivierungsbedingungen beeinflusst (Abb. 6-17 B).

Bei der Analyse des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKp46 (Abb. 6-17 C) zeigte sich, dass auch hier Tumorzellkontakt Einfluss auf dessen Expression hat. Während nach einer Kokultivierung ohne Tumorzellen bzw. 1:1 mit Tumorzellen im Median 78 % bzw. 89 % der NK-Zellen NKp46-positiv waren, war der Anteil der NKp46-positiven Zellen nach der Kokultivierung mit hoher Tumorzellzahl höchst signifikant reduziert und lag bei 7 % mit unbehandelten Tumorzellen und bei 6 % mit fixierten Tumorzellen. Wurden die PBL mit zellfreiem Tumorüberstand kultiviert, blieben die NK-Zellen NKp46-positiv.

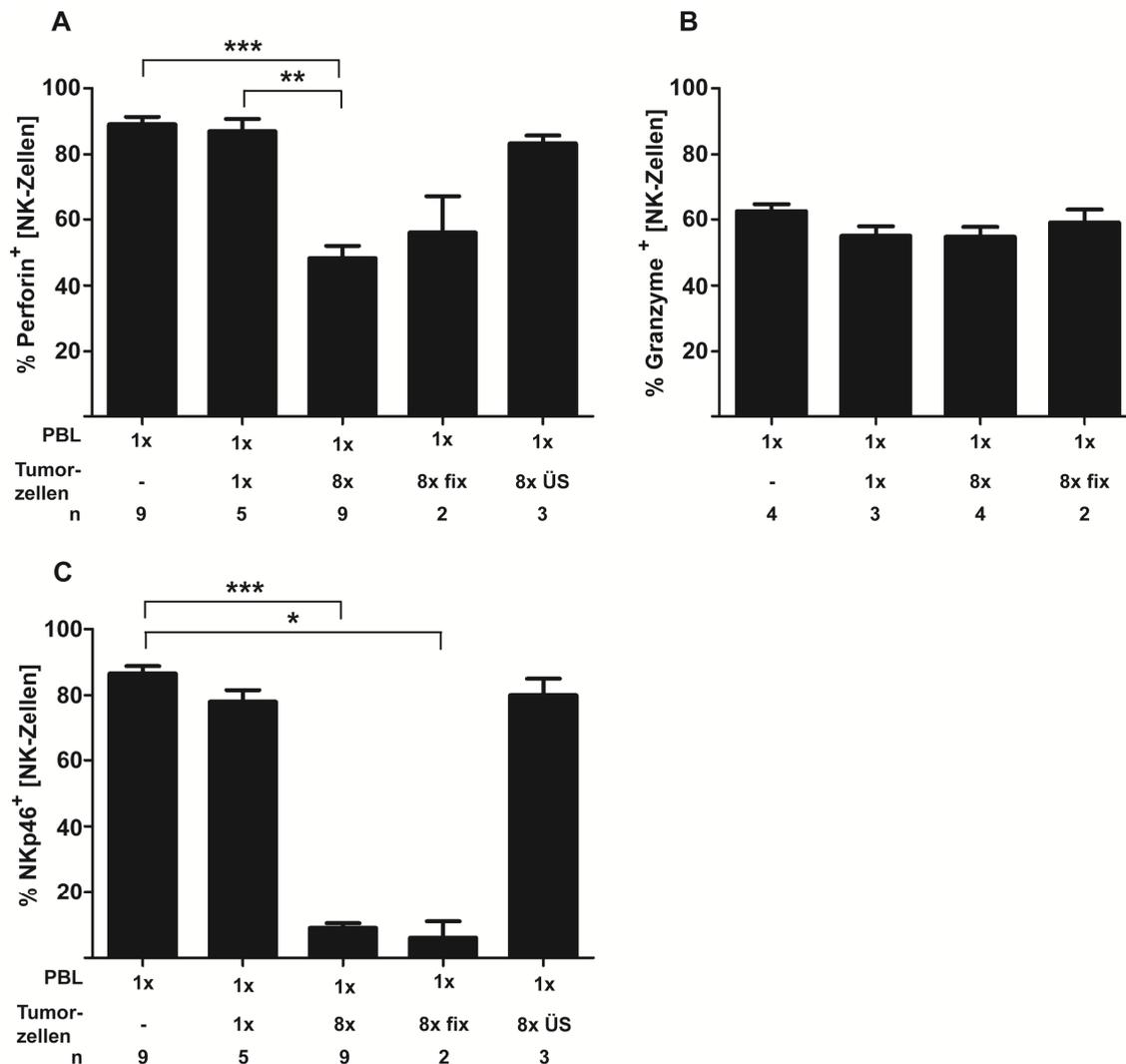


Abb. 6-17: Analyse der Zytotoxine und des NKp46-Rezeptors in NK-Zellen im In-vitro-Kokultivierungsmodell

Gesunde Spender-PBL wurden ohne Tumorzellen, mit Tumorzellen im Verhältnis 1:1 (1x) oder 1:8 (8x), mit fixierten Tumorzellen im Verhältnis 1:8 (8x fix) oder mit zellfreiem Tumorüberstand (8x ÜS) für 24 Std. kokultiviert, anschließend geerntet, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die NK-Zellen wurden mit Hilfe von graphischer Eingrenzung in FlowJo® bestimmt und hinsichtlich ihres Anteils an Perforin- (A), Granzym B- (B) bzw. NKp46-positiven (C) Zellen innerhalb der NK-Zellen. Die Balken sind die Mittelwerte der durchgeführten Experimente (n), die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (Perforin p=0,0004, NKp46 p=0,0003) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Mit der Abregulation von NKp46 und Perforin, aber ohne Verlust von Granzym B, wurde somit mit diesem In-vitro-Kokultivierungsmodell (Zellkontakt bei hoher Tumorzellzahl) der Phänotyp der NK-Zellen in TIL nur teilweise repliziert. Der erniedrigte Anteil Granzym B-positiver NK-Zellen, wie bei TIL gesehen, blieb aus.

In dem In-vitro-Kokultivierungsmodell wurde zusätzlich zum Rezeptor 2B4 auch die Expression des Adaptermoleküls SAP untersucht. SAP ist ausschlaggebend, ob 2B4 nach Ligandbindung eine aktivierende oder inhibierende Signalkaskade auslöst. Ist SAP anwesend, kommt es zu einem aktivierenden Signal. Bei Abwesenheit von SAP kommt es zu einer inhibierenden Signalweiterleitung und die NK-Zelle ist in ihrer Funktion unterdrückt. Auf Grund des Zusammenspiels dieser beiden Faktoren, wurden sie hier zusammen untersucht. Nach der Kokultivierung ohne oder mit einer geringen Anzahl an Tumorzellen, waren 73 % der NK-Zellen positiv für 2B4. Durch Kontakt mit einer hohen Tumorzellzahl, unabhängig ob diese fixiert oder unfixiert waren, stieg der Anteil 2B4-positiver NK-Zellen signifikant an (90 %), wohingegen in NK-Zellen, die nur löslichen Faktoren ohne Zell-Zell-Kontakt ausgesetzt waren, der 2B4-Anteil deutlich reduziert war (40 %) (Abb. 6-18).

SAP wurde nach einer Kultivierung ohne Tumorzellen von 95 % und nach einer Kokultivierung von PBL:Tumorzellen im Verhältnis 1:1 von 82 % der NK-Zellen exprimiert. Nach Inkubation mit einer hohen Tumorzellzahl waren nur noch 14 % der NK-Zellen SAP-positiv. Dieser signifikante Verlust der SAP-Expression trat unabhängig von löslichen Faktoren auch bei Kokultur mit fixierten Tumorzellen auf (14 % SAP-positive NK-Zellen).

Der Zellkontakt war für die Reduktion des SAP-positiven NK-Zellanteils notwendig, da lösliche Faktoren diesen Effekt nicht induzieren konnten (Kokultur mit 8x ÜS: 88 % SAP-positive NK-Zellen).

Das hier angewandte In-vitro-Modell mit Kokultivierung von PBL mit einer hohen Tumorzellzahl induzierte den Rezeptor 2B4 auf NK-Zellen und reduzierte das Adaptermolekül SAP. Somit wurde ein inhibierbarer NK-Phänotyp induziert, welcher bei 2B4-Ligandbindung keine zytotoxische Reaktion ausführen wird.

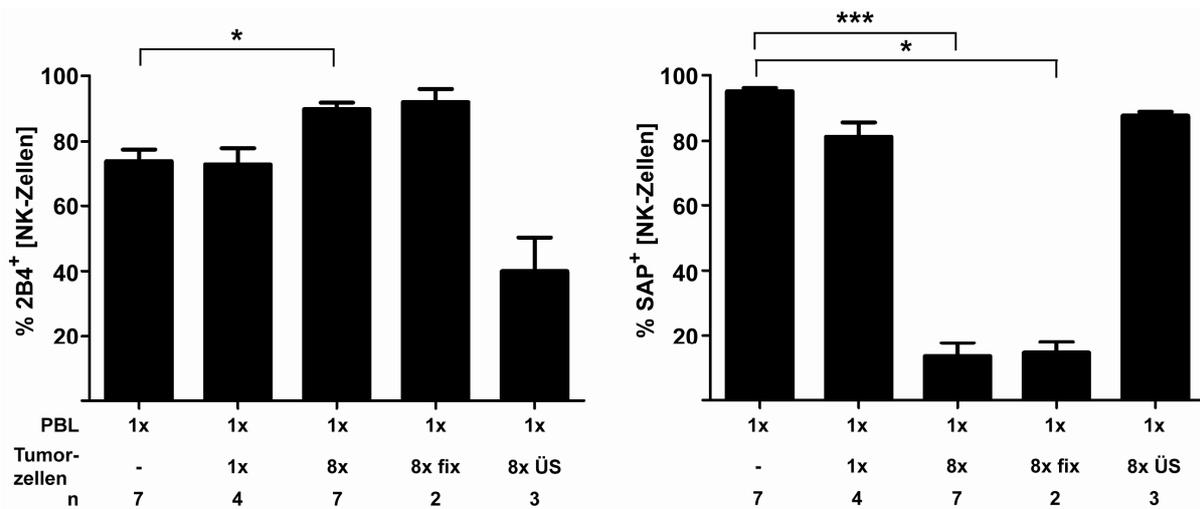


Abb. 6-18: Analyse des 2B4-Rezeptors und des Adaptermoleküls SAP in NK-Zellen im In-vitro-Kokultivierungsmodell

Gesunde Spender-PBL wurden ohne Tumorzellen, mit Tumorzellen im Verhältnis 1:1 (1x) oder 1:8 (8x), mit fixierten Tumorzellen im Verhältnis 1:8 (8x fix) oder mit Tumorüberstand (8x ÜS) für 24 Std. kokultiviert, anschließend geerntet, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die NK-Zellen wurden mit Hilfe von graphischer Eingrenzung in FlowJo® bestimmt und hinsichtlich ihres Anteils an 2B4 und SAP untersucht. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil an 2B4- (links) bzw. SAP- (rechts) positiven Zellen innerhalb der NK-Zellen. Die Balken sind die Mittelwerte der durchgeführten Experimente (n), die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (2B4 p=0,002, SAP p=0,0007) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (*p<0,05, ***p<0,001).

Da für die NK-Zellen der TIL gezeigt werden konnte, dass sie funktionell inhibiert waren, wurde die Fähigkeit zur CD107-Mobilisierung nach Zielzellkontakt bei den im In-vitro-Kokultivierungsmodell hergestellten NK-Zellen untersucht. Dafür wurden die PBL nach den unterschiedlichen Vorkultivierungsbedingungen über 5 Std. mit K562 im Beisein der CD107-Antikörper kokubiert, anschließend mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die NK-Zellen gesunder Spender-PBL sind hauptsächlich ruhende Zellen, die eine relativ schlechte Degranulation zeigten, wenn sie mit Zielzellen stimuliert wurden. So degranulierten in dem Kultivierungsansatz ohne Tumorzellen nur 15 % der NK-Zellen, nach Kokultur mit Tumorzellen im Verhältnis 1:1 bzw. 1:8 12 % bzw. 5 % der NK-Zellen. Trotz der niedrigen Zahlen wurde deutlich, dass die NK-Zellen durch den Kontakt zu Tumorzellen in ihrer Fähigkeit zur Degranulation inhibiert wurden. Eine Inhibition war auch erkennbar, wenn die PBL nur löslichen Faktoren ausgesetzt waren (8 % CD107⁺ NK-Zellen). Die Inhibition durch lösliche Faktoren war bei Stimulation der NK-Zellen mit PMA/Ionomycin nicht mehr vorhanden (lösliche Faktoren: 55 % CD107⁺ NK-Zellen, ohne Tumorzellen: 61 % CD107⁺ NK-Zellen), während die mit Zellkontakt vorkultivierten NK-Zellen weiterhin inhibiert waren (8x Tumorzellen: 10 %) (Abb. 6-19 B). Entweder greifen die löslichen und zellbedingten

Faktoren an unterschiedlichen Schritten in der zur Degranulation führenden Signalkaskade ein oder PMA/I ist ein viel stärkerer Stimulus.

Mit Hilfe der PMA/Ionomycin-Stimulation konnte auch eine IFN- γ -Produktion induziert werden, welche bei K562-Stimulation nicht detektierbar war. Diese IFN- γ -Produktion wurde durch Vorkultur mit Zellkontakt komplett unterdrückt und durch die Anwesenheit löslicher Faktoren von 67 % positiver NK-Zellen auf 16 % reduziert.

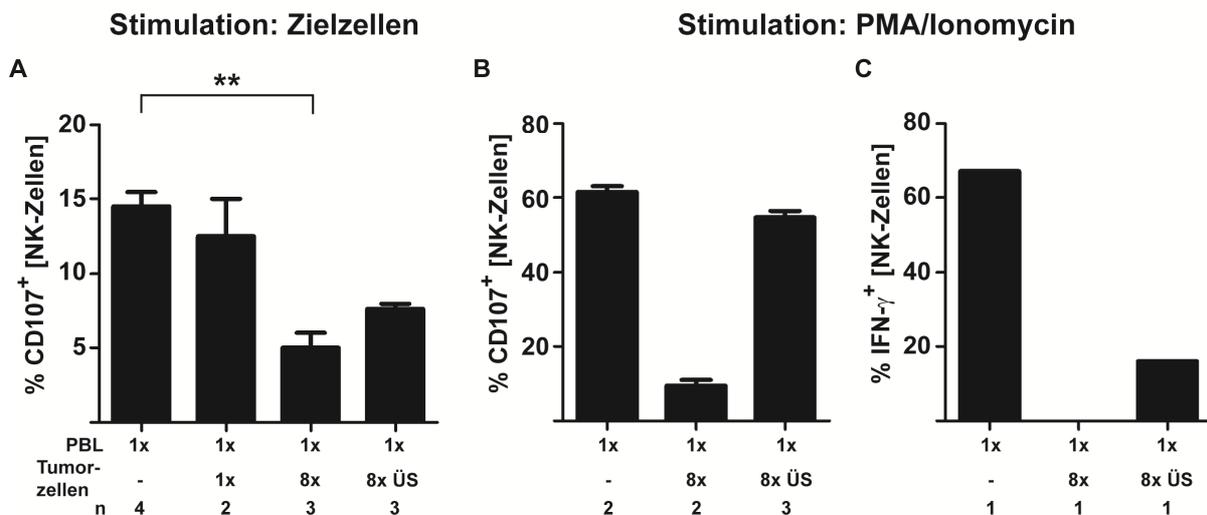


Abb. 6-19: Analyse der funktionellen Aktivität der NK-Zellen im In-vitro-Kokultivierungsmodell

Gesunde Spender-PBL wurden ohne Tumorzellen, mit Tumorzellen im Verhältnis 1:1 (1x) oder 1:8 (8x), mit fixierten Tumorzellen im Verhältnis 1:8 (8x fix) oder mit zellfreiem Tumorüberstand (8x ÜS) für 24 Std. kokultiviert und anschließend für weitere 5 Std. mit Zielzellen (A) oder PMA/I (B,C) stimuliert, um die funktionelle Aktivität zu bestimmen. Danach wurden die Zellen geerntet, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die NK-Zellen wurden mit Hilfe von graphischer Eingrenzung in FlowJo® bestimmt und hinsichtlich ihres Anteils für CD107⁺ (A, B) und IFN- γ ⁺ (C) Zellen untersucht. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil an CD107- (A, B) bzw. IFN- γ - (C) positiven Zellen innerhalb der NK-Zellen. Die Balken sind die Mittelwerte der durchgeführten Experimente (n), die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (CD107 (A) $p=0,02$) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (** $p<0,01$).

Als weiterer Marker wurde CD69 auf in vitro behandelten NK-Zellen untersucht, da in den NK-Zellen der TIL festgestellt wurde, dass ca. die Hälfte der NK-Zellen diesen Aktivierungsmarker exprimierten. Im In-vitro-Kokultivierungsmodell konnte allerdings mit keiner der Kokultivierungsbedingungen eine CD69-Expression auf den NK-Zellen induziert werden. Die NK-Zellen blieben, wie im Ausgangszustand, negativ für CD69 (Daten nicht gezeigt).

Neben der Degranulationsfähigkeit wurde auch die lytische Aktivität der NK-Zellen in einem Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Dieser Test ermöglicht es, die Konsequenz einer Degranulation auf Seiten der Zielzellen zu untersuchen. Die Messgröße ist dabei Chromfreisetzung durch Zelltod nach Inkubation mit Effektorzellen. NK-Zellen IL-2-aktivierter, gesunder Spender-PBL wurden isoliert, für 24 Std. unter verschiedenen Bedingungen (Abb. 6-20) mit Tumorzellen kokultiviert und anschließend für 4 Std. mit Chrom-markierten K562 inkubiert. Anhand der freigesetzten Chrommenge im Überstand kann die spezifische Lyse der K562 berechnet werden. Abb. 6-20 A zeigt den Prozentsatz spezifischer Lyse durch NK-Zellen, welche ohne, mit einer niedrigen Tumorzellzahl (Verhältnis 1:1) oder einer hohen Tumorzellzahl (Verhältnis 1:8) entweder zusammen in einem Reaktionsvolumen (Normalwell) oder unter Zellseparationsbedingungen (Transwell) vorkultiviert wurden. Zusätzlich wurden die NK-Zellen auch mit einer hohen Anzahl fixierter Tumorzellen vorinkubiert.

NK-Zellen, die ohne Tumorzellen (blaue Dreiecke) vorkultiviert wurden, zeigten 60 % spezifische Lyse bei einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 5:1. Mit abnehmendem Verhältnis NK- zu Zielzellen sank die spezifische Lyse. Bei Vorkultivierung unter zellseparierenden Bedingungen (offene Symbole), also ohne Zellkontakt zwischen NK- und Tumorzellen, war bei hoher Tumorzelldichte die lytische Aktivität vergleichbar und bei niedriger Tumorzelldichte leicht erhöht. Eine Inhibition der spezifischen Lyse trat jedoch dann auf, wenn die NK-Zellen in Kontakt mit Tumorzellen vorkultiviert worden waren und zwar bereits bei einer niedrigen Anzahl an Tumorzellen (schwarze Quadrate). Nach Vorkultivierung mit einer hohen Tumorzellzahl (schwarze Kreise) war keine spezifische Lyse mehr zu detektieren. Die Vorkultivierung mit einer hohen Anzahl fixierter Tumorzellen (graue Rauten) unter Zellkontaktbedingungen, wobei keine löslichen Milieufaktoren gebildet wurden, war die lytische Aktivität mit 33 % zwar reduziert, allerdings nicht so stark wie bei hoher Anzahl unfixierter Tumorzellen. Eine Zusammenfassung aller durchgeführten Experimente (Abb. 6-20 B) zeigt, dass eine Kokultivierung mit einer hohen Anzahl an Tumorzellen die lytische Aktivität der NK-Zellen hoch signifikant reduzierte, wenn die Tumorzellen unfixiert waren. Fixierte Tumorzellen erreichten nur etwa die Hälfte des Effekts der unfixierten Tumorzellen. Die Ergebnisse, die durch den Chrom-Freisetzungstest erhalten wurden, bestätigten die der Degranulation: Zellkontakt mit hoher Anzahl an Tumorzellen inhibiert die Degranulation und die lytische Aktivität der NK-Zellen.

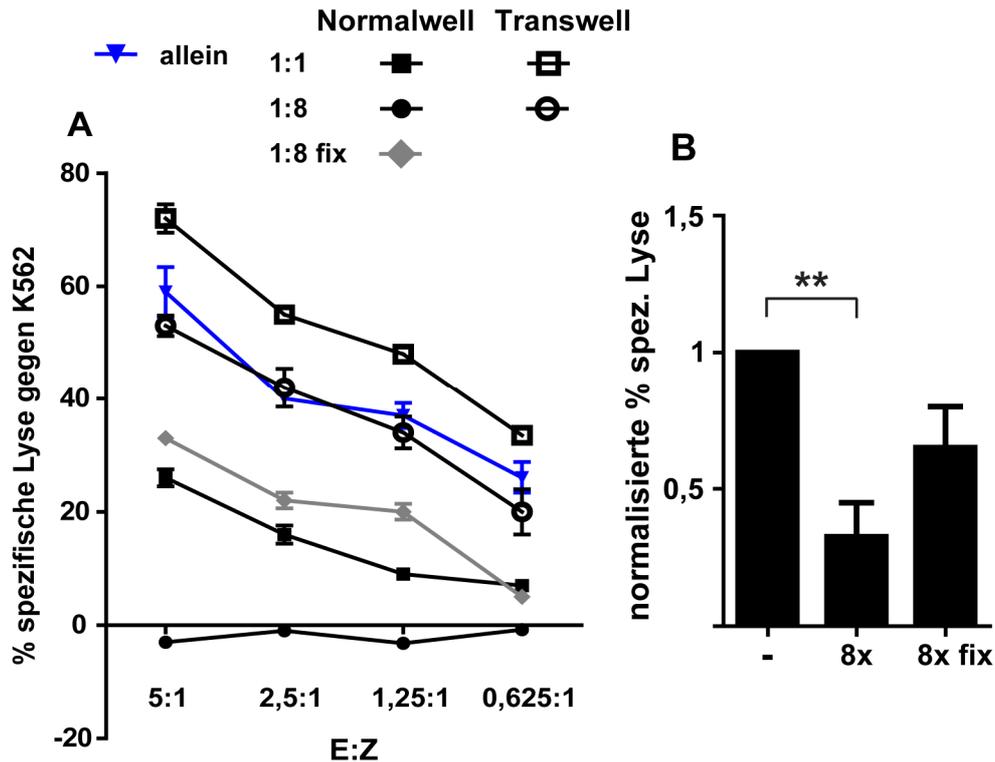


Abb. 6-20: Lytische Aktivität der NK-Zellen im In-vitro-Kokultivierungsmodell

NK-Zellen wurden aus IL-2-aktivierten, gesunden Spender-PBL isoliert und für 24 Std. ohne, mit niedriger (1:1), und mit hoher Tumorzellzahl (unfixiert (1:8) bzw. fixiert (1:8 fix)) in gemischter Vorkultur (Normalwell) bzw. Separationsvorkultur (Transwell) kokultiviert. Anschließend wurden die NK-Kokulturen in einen 4-stündigen Chrom-Freisetzungstest mit K562 eingesetzt. Titrierte NK-Zellen (Effektoren, E) wurden zu einer konstanten Anzahl Zielzellen (Z) gegeben, sodass sich unterschiedliche E:Z Verhältnisse ergaben.

(A) Die y-Achse zeigt den Prozentsatz an spezifischer Lyse. Die Werte sind der Mittelwert der gemessenen Duplikate. Die Fehlerbalken sind die Mittelwertabweichungen.

(B) Zusammenfassung aller durchgeführten Experimente. Die y-Achse zeigt den Prozentsatz spezifischer Lyse normalisiert auf den Ansatz ohne Tumorzellen, die x-Achse beschreibt die Vorkultivierungsbedingungen, wobei „-“ die Bedingungen ohne Tumorzellen, 8x bzw. 8x fix besagt, dass 8x soviel Tumorzellen wie NK-Zellen vorhanden waren. Die Balken sind die Mittelwerte aller Chrom-Freisetzungstests bei einem E:Z von 5:1 (n=4) und die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (p=0,02) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (** p<0,01)

Das In-vitro-Tumormodell (Kokultivierung mit hoher Tumorzellzahl) induzierte NK-Zellen mit einem Phänotyp, der dem der NK-Zellen in TIL in der niedrigen Expression von Perforin und NKp46, der hohen Expression von 2B4 und der reduzierten funktionellen Aktivität glich. Zellkontakt scheint der entscheidende Mechanismus zu sein, der die Entstehung des Phänotyps bewirkt. Unterschiede zu den NK-Zellen der TIL waren, dass die im In-vitro-Kokultivierungsmodell induzierten NK-Zellen weiterhin Granzym B-positiv waren und kein CD69 exprimierten. Um die Tumorbedingungen noch besser nachzustellen, wurde ein weiteres In-vitro-Modell, das Sphäroid-System, angewandt.

6.5.2 In-vitro-3D-Tumormodell

Sphäroide sind dreidimensionale Zellaggregate, die unter reproduzierbaren, standardisierten Bedingungen aus Zelllinien hergestellt werden. Sie haben ähnliche biologische Eigenschaften wie die kleinsten, avaskulären Mikrotumoren in Patienten. Im Sphäroid bilden sich wie im realen Tumor morphologische Differenzierungsareale und biochemische Gradienten aus Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselmetaboliten (Friedrich et al., 2009). Es wurde untersucht, ob mit Hilfe dieses Sphäroidmodells der defizitäre NK-TIL-Phänotyp aus NK-Zellen gesunder Spender generiert werden kann. Hierfür wurden isolierte NK-Zellen, welche für 3-4 Tage mit IL-2 aktiviert wurden, in einem hängenden Tropfen zusammen mit einem Sphäroid koinkubiert, sodass die NK-Zellen in das Sphäroid migrieren konnten. Nach 12 Std. wurden die Sphäroide gewaschen, um nicht eingewanderte NK-Zellen zu entfernen, weitere 12 Std. kultiviert und dann homogenisiert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Parallele Kulturen von NK-Zellen ohne Tumorzellen dienten als Kontrolle. Abb. 6-21 zeigt die Histogramme für die untersuchten Marker, wobei das grau-ausgefüllte Histogramm die Isotypfärbung, die rote Linie die NK-Zellen nach Migration ins Sphäroid und die schwarze Linie die NK-Zellen ohne Sphäroid darstellt.

Die NK-Zellen ohne Sphäroid waren positiv für die zytotoxischen Marker Perforin und Granzym B, sowie für NKp46. Die Expression dieser Marker war bei ins Sphäroid infiltrierte NK-Zellen stark reduziert, was sich in einer Abnahme der medianen Fluoreszenzintensität zeigte. Neben der Reduktion von Perforin, Granzym B und NKp46 bei NK-Zellen im Sphäroid trat eine Zunahme in der Expression des Rezeptors 2B4 auf und der Aktivierungsmarker CD69 wurde induziert. Mit dieser Markerkombination entsprachen die in Sphäroide (Mikrotumore) eingewanderten NK-Zellen den NK-Zellen der TIL.

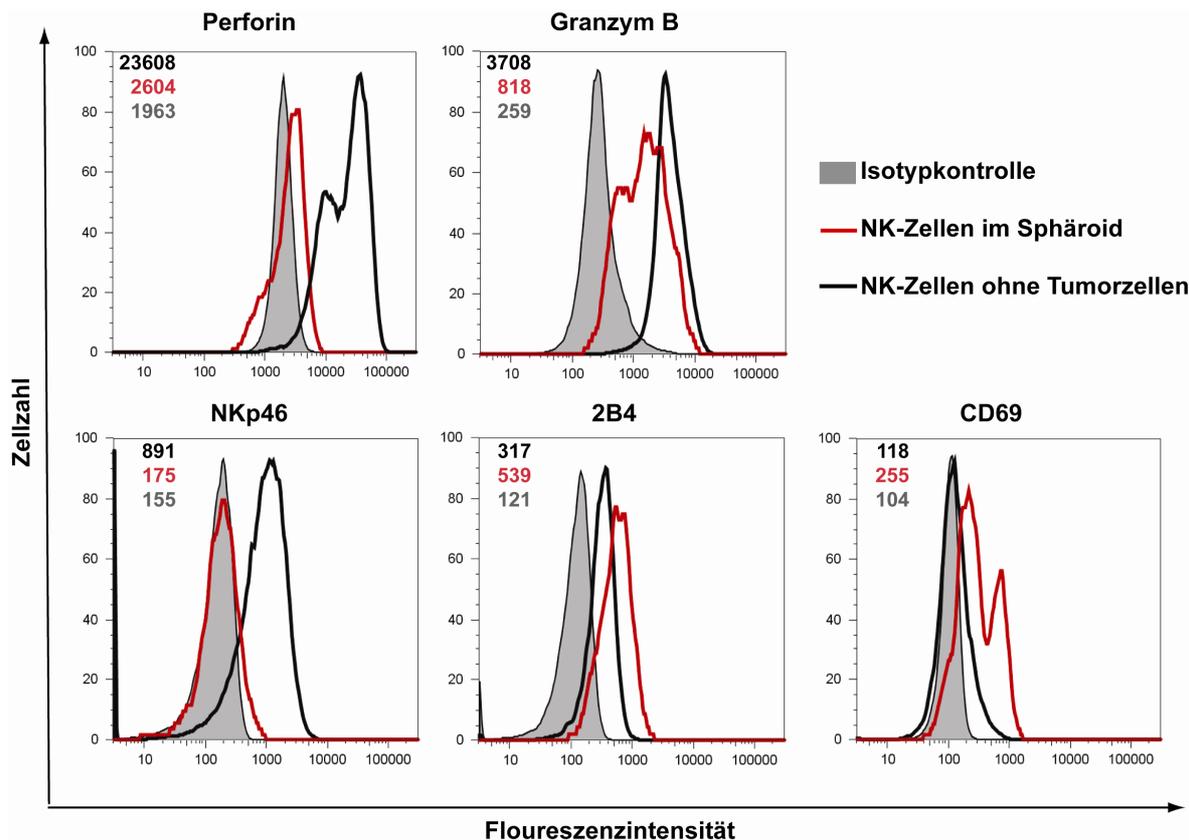


Abb. 6-21: Analyse von Markern in NK-Zellen nach Migration in Mikrotumore

NK-Zellen wurden aus gesunden Spender-PBL isoliert und 3-4 Tage mit IL-2 aktiviert. Anschließend wurden sie mit Sphäroiden (aus einer RCC-Zelllinie generiert) für 12 Std. koinkubiert, damit die NK-Zellen in die Mikrotumore einwandern konnten. Nach einem Waschschrift, um nicht eingewanderte Zellen zu entfernen, wurden weitere 12 Std. kultiviert. Aus den Sphäroiden wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, die mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert wurde. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die NK-Zellen bestimmt und die Expressionsstärke der Marker als Histogramm dargestellt. Die y-Achse zeigt die Zellzahl. Graue, ausgefüllte Histogramme zeigen die Isotypfärbung, rote Linien zeigen die NK-Zellen im Sphäroid und schwarze Linien die NK-Zellen, die ohne Tumorzellen kultiviert wurden. Die MFI der jeweiligen Marker ist in den Diagrammen aufgezeigt.

Die Veränderung in der mittleren Fluoreszenzintensität der Marker reflektiert sich auch im Anteil der Marker-positiven NK-Zellen (Abb. 6-22). Während fast alle NK-Zellen im Ausgangszustand positiv für Perforin und Granzym B waren, war in den NK-Zellen im Sphäroid der Anteil Perforin-positiver (57 %) und Granzym B-positiver (36 %) Zellen stark reduziert. Ebenso sank der Anteil der NKp46-positiven NK-Zellen von 75 % auf 25 % bei Migration ins Sphäroid. Im Gegensatz dazu stieg der Anteil der 2B4-positiven NK-Zellen von 60 % auf 86 % und der der CD69-positiven von 8 % auf 45 %. Die Anteile der Marker-positiven NK-Zellen im Sphäroid waren vergleichbar mit denen, die auch in den NK-Zellen der TIL gefunden wurden.

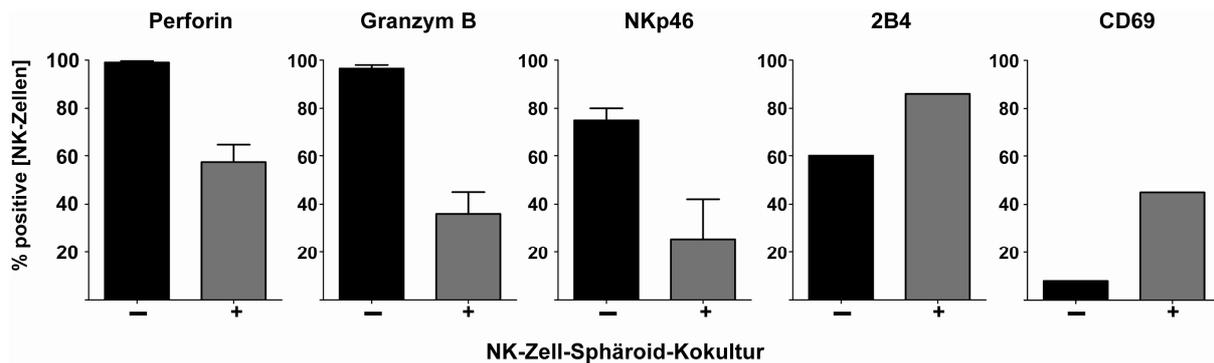


Abb. 6-22: Analyse der Anteile Marker-positiver NK-Zellen nach Migration in Mikrotumore

NK-Zellen wurden aus gesunden Spender-PBL isoliert und 3-4 Tage mit IL-2 aktiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Sphäroiden (aus einer RCC-Zelllinie generiert) für 12 Std. koinkubiert, damit die NK-Zellen in die Mikrotumore einwandern konnten. Nach einem Waschschrift, um nicht eingewanderte Zellen zu entfernen, wurde aus den Sphäroiden eine Einzelzellsuspension hergestellt, die mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert wurde. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die NK-Zellen bestimmt und der Anteil der für die verschiedenen Marker positiven NK-Zellen ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der NK-Zellen. Graue Balken entsprechen NK-Zellen aus der Sphäroidkultur, schwarze Balken sind unbehandelten NK-Zellen, wobei die Balken die Mittelwerte der durchgeführten Experimente sind. Die Fehlerbalken (falls vorhanden) sind die SEM. NK-Zellen, die in Mikrotumore eingewandert waren, waren im Vergleich zu unbehandelten NK-Zellen im Anteil an Perforin (n=3), Granzym B (n=2) und NKp46 (n=2) reduziert und an 2B4 (n=1) und CD69 (n=1) erhöht.

6.6 Myeloische Zellen und deren Einfluss auf Effektorzellen

Eine Medizindoktorantin unserer Arbeitsgruppe entdeckte durch Immunfluoreszenzfärbungen von Nierenzellkarzinomgewebeschnitten einen neuen, bisher nicht beschriebenen myeloischen Phänotyp, der im Gegensatz zu klassischen dendritischen Zellen, die CD209 positiv sind, Koexpression der Marker CD209, CD14 und CD163 aufwies. Diese dreifach-positiven dendritischen Zellen werden im Weiteren mit RCC-DZ (für „durch renal cell carcinoma induzierte DZ“) bezeichnet. Dieser spezielle Phänotyp wurde auch in den TIL nachgewiesen. Die TIL wurden wie beschrieben isoliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Insgesamt wurden 6 TIL-Proben untersucht, wobei Abb. 6-23 beispielhaft die Analyse einer TIL-Probe zeigt. Es ist zu erkennen, dass TIL myeloische (CD11c⁺) Zellen enthielten, welche hauptsächlich CD14- und CD209-positiv waren. Innerhalb der PBMZ waren fast alle CD11c⁺ Zellen stark CD14-positiv und CD209-negativ, was den Monozyten entspricht. Die Abwesenheit des CD209-Markers entspricht der Tatsache, dass im Blut keine dendritischen Zellen vorkommen. Die CD14⁺CD209⁺ Zellen der TIL waren im Vergleich zu den CD209 bzw. CD14 einzel-positiven Zellen der TIL oder PBMZ, auch CD163 positiv. Somit konnte das Vorkommen der RCC-DZ durch ex-vivo-Analysen der TIL bestätigt werden und gezeigt werden, dass dies der dominante myeloische Phänotyp im RCC ist.

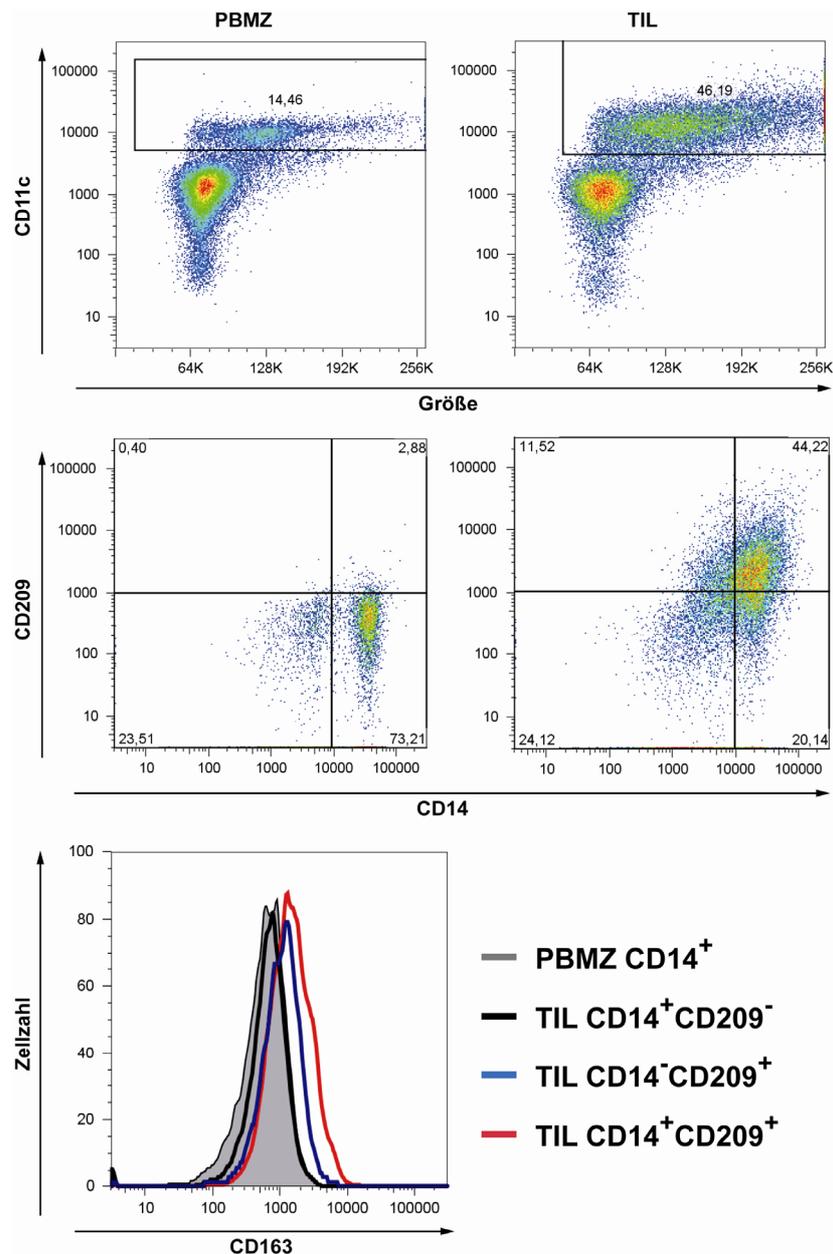


Abb. 6-23: Nachweis der RCC-DZ in TIL mittels Durchflusszytometrie

TIL und PBMZ wurden wie beschrieben isoliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die erste Reihe zeigt Punktwolkendiagramme der PBMZ (links) und TIL (rechts) zur Auswahl der CD11c-positiven (myeloischen) Zellen. Diese sind dann in den Diagrammen der zweiten Reihe gezeigt, wobei die Fluoreszenz von CD209 auf der y-Achse und die von CD14 auf der x-Achse gezeigt sind. Das Histogramm zeigt auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität von CD163 und auf der y-Achse die Zellzahl. Dargestellt sind die Histogramme der angegebenen Zellpopulationen. Diese Daten sind exemplarisch für 6 untersuchte TIL.

6.6.1 Generierung der RCC-DZ im In-vitro-3D-Tumormodell

Um die Frage nach der Entstehung dieses RCC-DZ-Phänotyps zu klären, wurde das in vitro 3D-Sphäroidmodell verwendet. Als Zellpopulation wurden Monozyten aus dem Blut verwendet, da bekannt ist, dass die Monozyten in periphere Gewebe auswandern und dort zu DZ differenzieren können. Daher wurden RCC-Sphäroide mit Monozyten infiltriert und diese nach vier Tagen auf die Expression der Marker CD14, CD209 und CD163 hin durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden in vitro generierte klassische DZ und durch Kultur in Tumorüberstand induzierte RCC-DZ mitgeführt. Letztere Bedingung war in einer parallelen Doktorarbeit (A. Figel) evaluiert worden und hatte gezeigt, dass lösliche Faktoren diesen Phänotyp induzieren können. Wie in Abb. 6-24 zu erkennen, waren die klassischen DZ (schwarz) schwach positiv für CD14 und CD163 und stark positiv für CD209, wohingegen die mit löslichen Faktoren inkubierte Monozyten (blau) stark positiv waren für alle untersuchten Marker. Ebenso waren die Monozyten, die in die Sphäroide migriert waren, in der gleichen Intensität positiv für CD14, CD209 und CD163 wie die in vitro durch Tumorüberstand generierten RCC-DZ.

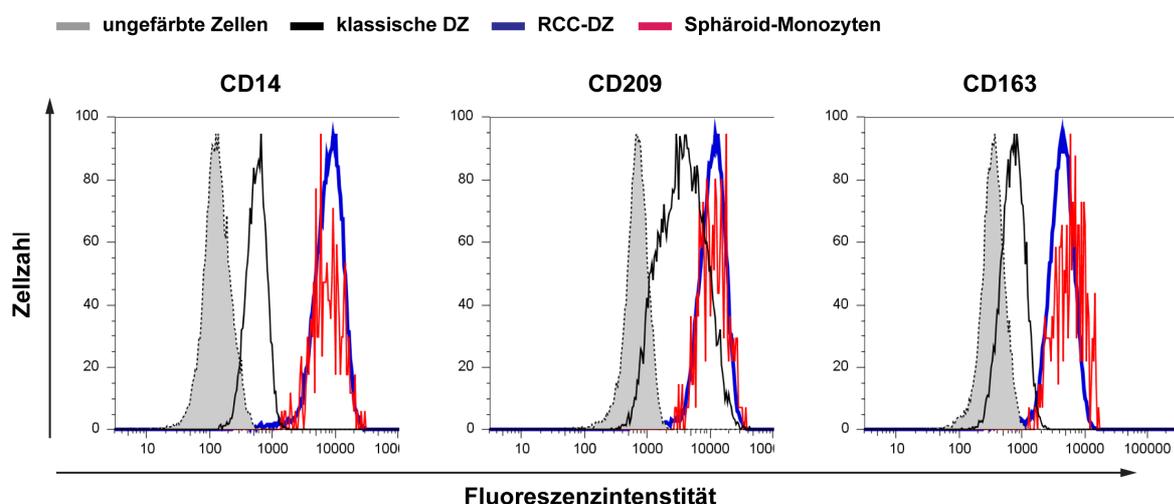


Abb. 6-24: Analyse der Monozyten nach Migration in Mikrotumore

Monozyten wurden wie beschrieben aus Voll-Blut isoliert. Anschließend erfolgte die Generierung der klassischen DZ mit IL-4 und GM-CSF und der RCC-DZ mit RCC-26 Überstand. Die restlichen Monozyten wurden mit Mikrotumoren koinkubiert, um die Monozyten einwandern zu lassen. Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der myeloischen Zellen durch Eingrenzen der lebenden $CD45^+/CD11c^+$ Zellen, wurden Histogramme für die verschiedenen Marker erstellt. Die y-Achse zeigt die Zellzahl, die x-Achse die Fluoreszenzintensität der untersuchten Marker - Bezeichnung über dem Diagramm. Das graue ausgefüllte Histogramm sind ungefärbte Zellen, die schwarze Linie zeigt die Fluoreszenz der klassischen DZ, die blaue Linie die der RCC-DZ und die rote Linie die der Sphäroid-Monozyten.

6.6.2 Einfluss der dendritischen Zellen auf NK-Zellen

Die Interaktion von NK-Zellen mit myeloischen Zellen ist derzeit ein aktuelles Forschungsfeld, da in diesem „crosstalk“ sowohl die myeloischen als auch die NK-Zellen beeinflusst werden und andere Funktionen annehmen können (Walzer et al., 2005; Moretta et al., 2006). In dieser Arbeit sollte der Einfluss der RCC-DZ im Vergleich zu klassischen DZ auf die NK-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die NK-Zellen aus gesunden Spender-PBL 24 Std. mit den myeloischen Zellen aus demselben Spender kokultiviert und danach die Expression von Oberflächenrezeptoren und zytolytischen Proteinen der NK-Zellen, sowie deren funktionellen Aktivität untersucht. Es wurde in einem autologen System - also sowohl die NK-Zellen als auch die myeloischen Zellen stammen von demselben Spender - gearbeitet, um eine allogene Inhibition oder Aktivierung der NK-Zellen zu vermeiden.

Die Analyse der Oberflächenmarker (Abb. 6-25) zeigte, dass der Anteil der CD16-positiven NK-Zellen von 76 % (Kultivierung ohne DZ) und 69 % (Kokultivierung mit klassischen DZ) auf 56 % (Kokultivierung mit RCC-DZ) absank. Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied zwischen den NK-Zellen, die ohne DZ kultiviert wurden und denen die mit DZ kultiviert wurden, konnte für den Rezeptor NKp46 beobachtet werden, wobei der Einfluss klassischer DZ und RCC-DZ vergleichbar war (ohne DZ: 90 %, RCC-DZ: 71 %, klassischen DZ: 78 % NKp46-positiv NK-Zellen).

NKG2D wurde durch die Kultivierung mit DZ nicht verändert. Der Prozentsatz 2B4- bzw. SAP-positiver NK-Zellen nahm bei Kokultivierung sowohl mit RCC-DZ als auch mit klassischen DZ im Vergleich zu Kultivierung ohne DZ zwar ab, jedoch nicht signifikant. Interessanterweise nahm die Expression von CD69 bei Kokultur mit RCC-DZ deutlich zu, was auf eine Aktivierung der NK-Zellen durch RCC-DZ - trotz autologer Situation - hindeutet. Somit zeigten sich keine Unterschiede in der NK-Zellpopulation nach Kokultivierung mit RCC-DZ oder klassischen DZ bis auf die Induktion des CD69 auf NK-Zellen durch die RCC-DZ.

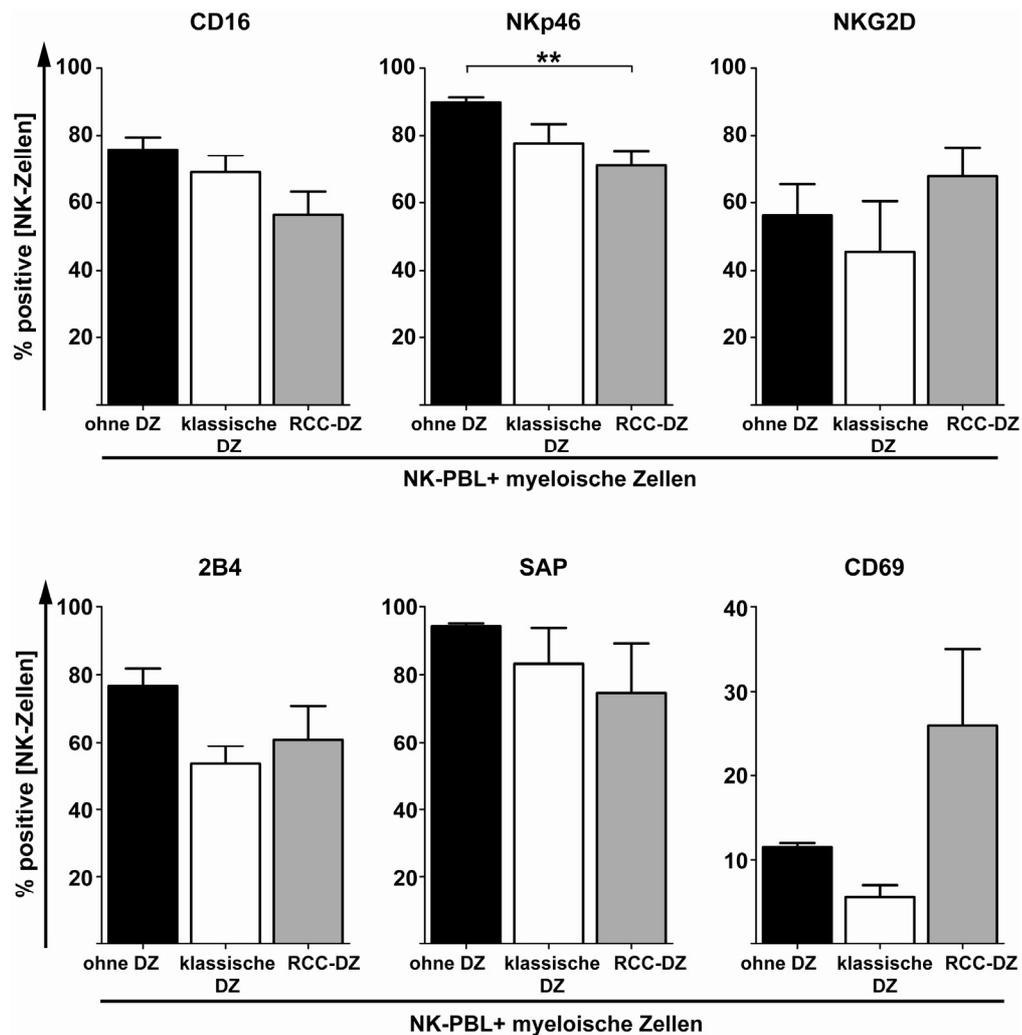


Abb. 6-25: Analyse von Oberflächenmarkern auf NK-Zellen nach Kokultivierung mit autologen DZ

PBL wurden wie beschrieben isoliert und klassische DZ sowie RCC-DZ wie beschrieben aus Monozyten generiert. PBL wurden ohne, mit autologen klassischen DZ oder RCC-DZ für 24 Std. in einem Verhältnis PBL:DZ von 1:0,3 kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die NK-Zellen ausgewählt und der Anteil für CD16-, NKp46-, NKG2D-, 2B4-, SAP- und CD69-positive Zellen bestimmt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen für den jeweiligen Marker. Die x-Achse zeigt die Kokultivierungsbedingungen der PBL mit myeloischen Zellen. Die Balken sind der Mittelwert der durchgeführten Experimente (CD16 n=5, NKp46 n=7, NKG2D n=4, 2B4 n=6, SAP n=5, CD69 n=2), die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (NKp46: p=0,002) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich der Unterschiede mit Post-Hoc-Test nach Dunn (**p<0,01).

Die Untersuchungen der Anteile der Perforin- und Granzym B-positiven NK-Zellen, sowie der Degranulationsfähigkeit der NK-Zellen zeigte, dass zwar die Anteile positiver Zellen durch DZ-NK-Kultur erniedrigt wurden, jedoch sowohl in Kokultur mit klassischen DZ und RCC-DZ (Abb. 6-26). In beiden Kokulturen war der Anteil der Perforin-positiven NK-Zellen mit 70 %, im Vergleich zu NK-Zellen, die ohne DZ (88 %) kultiviert wurden, signifikant reduziert. Der Perforinverlust konnte vermieden werden, wenn die DZ durch eine Membran von den NK-Zellen getrennt waren (Daten nicht gezeigt). Somit ist der Kontakt - und nicht lösliche

Faktoren – mit RCC-DZ bzw. klassischen DZ notwendig, um einen Perforinverlust zu induzieren. Die Reduktion der Granzym B-positiven NK-Zellen und die funktionelle Aktivität, gemessen anhand der CD107-Oberflächenmobilisierung, nach Kokultivierung mit myeloischen Zellen war nicht signifikant. RCC-DZ oder klassische DZ induzierten vergleichbare Effekte; d.h. der RCC-DZ-Typ ist nicht ausschlaggebend für die induzierten Veränderungen.

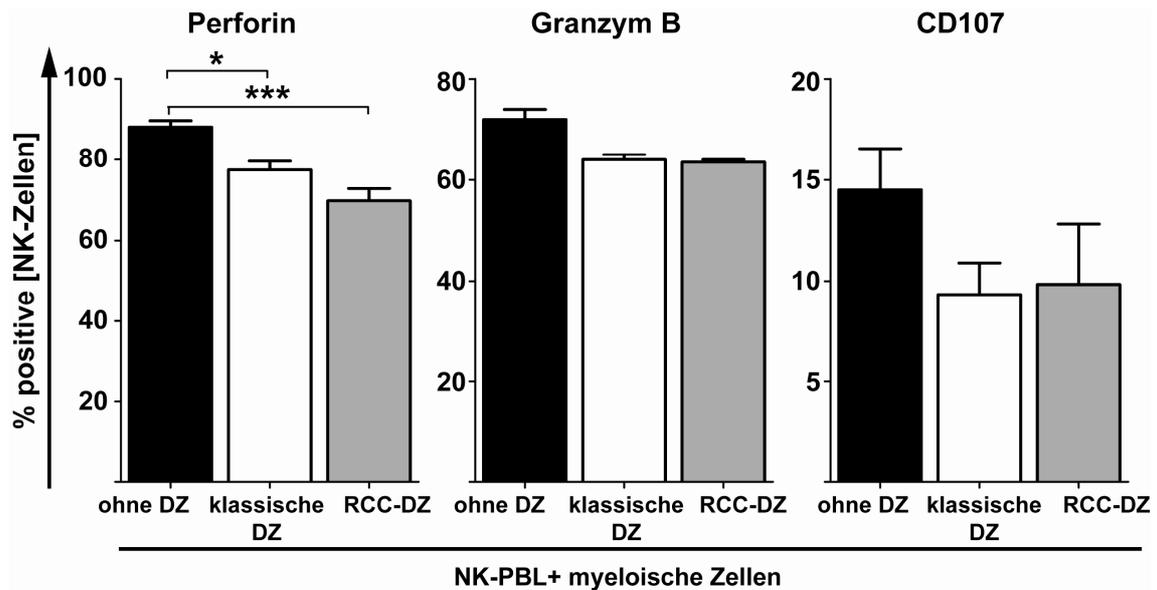


Abb. 6-26: Analyse der Zytotoxine und der CD107-Oberflächenmobilisierung von NK-Zellen nach Kokultivierung mit autologen DZ

PBL wurden wie beschrieben isoliert und klassische DZ sowie RCC-DZ wie beschrieben aus Monozyten generiert. PBL wurden ohne, mit autologen klassischen DZ oder RCC-DZ für 24 Std. in einem Verhältnis PBL:DZ von 1:0,3 kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert, wobei die PBL zur CD107-Oberflächenmobilisierung weitere 5 Std. mit Zielzellen inkubiert wurden. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die NK-Zellen ausgewählt und der Anteil für Perforin-, Granzym B- und CD107-positive Zellen bestimmt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen für den jeweiligen Marker. Die x-Achse zeigt die Kokultivierungsbedingungen der PBL mit myeloischen Zellen. Die Balken sind der Mittelwert der durchgeführten Experimente (Perforin n=9, Granzym B n=2, CD107 n=6), die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (Perforin: p=0,006) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* p<0,05, ***p<0,001).

Da die Inkubation von NK-Zellen mit RCC-DZ oder klassischen DZ eine Reduktion von Perforin induzierte, wurde anschließend gemessen, ob dadurch die lytische Fähigkeit der NK-Population beeinträchtigt wird. Hierfür wurden isolierte NK-Zellen für 24 Std. mit klassischen DZ oder RCC-DZ kokultiviert und anschließend für 4 Std. mit Chrom-markierten K562 inkubiert. Abb. 6-27 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines von vier Versuchen. Die

NK-Zellen, die mit klassischen DZ oder RCC-DZ kultiviert wurden, zeigten bei den getesteten Effektor- zu Zielzellverhältnissen eine vergleichbare spezifische Lyse wie die NK-Zellen, welche ohne DZ kultiviert wurden.

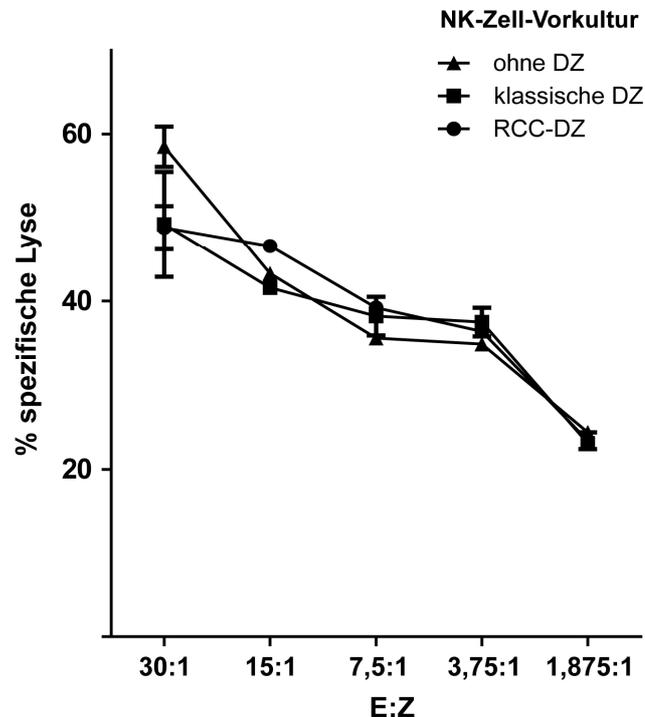


Abb. 6-27: Lytische Aktivität der NK-Zellen nach Inkubation mit autologen DZ

PBL wurden für vier Tage in 100 U/ml kultiviert und anschließend die NK-Zellen über negative Bead-Isolation gewonnen. Diese wurden dann mit zuvor generierten autologen klassischen DZ bzw. RCC-DZ im Verhältnis NK-Zellen:DZ von 1:0,3 für 24 Std. kokultiviert. Danach wurden die NK-Zellen in titriertem Verhältnis für 4 Std. zu Chrom-markierten K562 gegeben. Aus der Chrommenge im Überstand lässt sich der Anteil spezifischer Lyse berechnen, welcher auf der y-Achse dargestellt ist. Die x-Achse zeigt das Effektor:Zielzell (E:Z) Verhältnis. Dargestellt sind NK-Zellen, die ohne DZ (Dreieck), mit klassischen DZ (Viereck) oder mit RCC-DZ (Kreis) kokultiviert wurden. Die Symbole sind der Mittelwert der Duplikate, die Fehlerbalken sind die Mittelwertabweichung. Die Abbildung zeigt beispielhaft einen von vier Versuchen.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen des Einflusses der RCC-DZ auf NK-Zellen, dass anders als bei der In-vitro-Tumorzellkokultur keine gegenläufige Regulation von 2B4 und SAP auftrat. Ferner waren die NK-Zellen nicht funktionell beeinträchtigt und es entstand nicht der NK-TIL-Phänotyp. Die In-vitro-Daten geben somit keinen Hinweis, dass die RCC-DZ zur Entstehung der funktionellen Defizite der NK-Zellen in TIL beitragen.

6.6.3 Einfluss der dendritischen Zellen auf zytotoxische T-Zellen

Neben dem Einfluss auf NK-Zellen wurde auch der Einfluss der RCC-DZ auf zytotoxische T-Zellen untersucht. Als zytotoxische T-Zellen wurde der HLA-A2-reaktive ZTL-Klon JB4

verwendet. Da untersucht werden sollte, ob die myeloischen Zellen die Funktion des ZTL-Klons beeinflussen, durften sie selbst nicht Zielzellen für den ZTL-Klon sein, da sie sonst eine ZTL-Aktivierung auslösen würden. Auf Grund dessen wurden die DZ aus Monozyten HLA-A2-negativer Spender generiert.

Sollte es sich bei den, durch das Tumormilieu induzierten, RCC-DZ um myeloische Suppressor-Zellen handeln, dann sollten sie bei ZTL, wie für MDSC (engl.: myeloid derived suppressor cells) beschrieben, eine Abregulation der CD3 ζ -Kette sowie Apoptoseinduktion bewirken (Otsuji et al., 1996; Nagaraj et al., 2008). Auf Grund dessen wurde die Expression der CD3 ζ -Kette in ZTL nach Inkubation mit RCC-DZ im Vergleich zur Kokultur mit klassischen DZ oder ohne DZ untersucht. Abb. 6-28 zeigt die Fluoreszenzintensität von CD3 ϵ bzw. CD3 ζ der CD45⁺ ZTL als Punktwolkendiagramm. Es wurde keine Veränderung in der Expression von CD3 ϵ oder CD3 ζ nach Inkubation mit RCC-DZ im Vergleich zur Inkubation mit klassischen DZ oder der Kultur ohne DZ beobachtet.

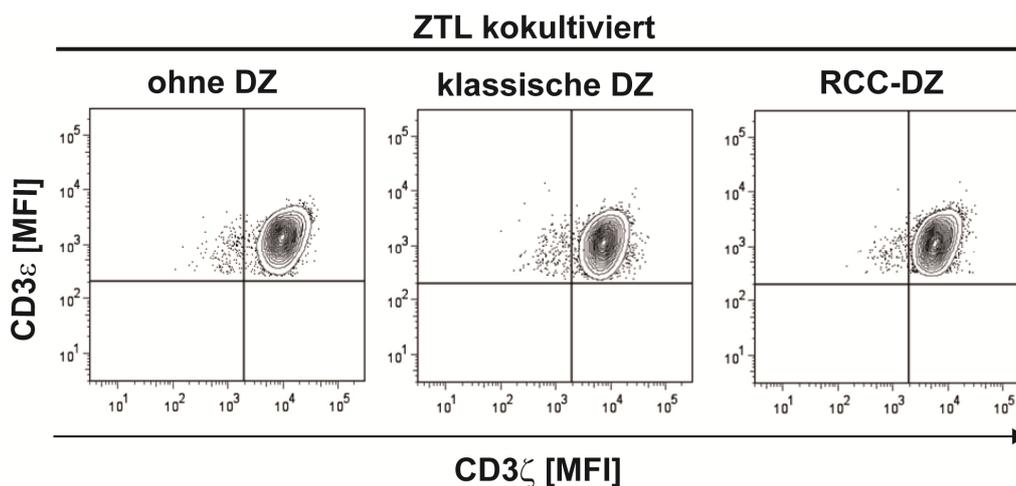


Abb. 6-28: Analyse der CD3 ϵ und CD3 ζ Expression von ZTL nach Koinkubation mit klassischen DZ oder RCC-DZ

HLA-A2-reaktive ZTL wurden ohne, mit allogenen HLA-A2-negativen klassischen DZ oder RCC-DZ für 24 Std. kokultiviert (Verhältnis ZTL:DZ = 1:0,3). Als ZTL wurde der zytotoxische T-Zellklon JB4 verwendet. Nach der Kokultur wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der lebenden CD45⁺CD11c⁻ Zellen wurden diese als Punktwolkendiagramm mit der Fluoreszenz von CD3 ϵ (MFI) auf der y-Achse und der von CD3 ζ (MFI) auf der x-Achse dargestellt. Die Kokultivierungsbedingungen sind über den Diagrammen aufgezeigt.

Zur Untersuchung, ob RCC-DZ in ZTL Apoptose induzieren, wurden ZTL mit unterschiedlichen Mengen an RCC-DZ oder klassischen DZ für 24 Std. kokultiviert und anschließend mit Annexin V und Propidiumjodid (PI) gefärbt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin (PS), das sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle befindet, jedoch während der Apoptose auf die Außenseite der Membran transloziert und somit detektiert werden kann. Durch Markierung von Zellen mit Annexin V

kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Das PI dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische oder tote Zellen ein. Lebende Zellen sind daher Annexin V- und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische bzw. tote Zellen sind Annexin V- und PI-positiv. Wie in Abb. 6-29 zu erkennen, sind die ZTL bei Kultivierung ohne DZ alle lebend; 97 % Annexin V- und PI-negative Zellen. Nach der Kokultivierung der ZTL mit einer niedrigen Anzahl klassischer DZ bzw. RCC-DZ (Verhältnis 1:0,1) war keine Veränderung zu erkennen (97 % lebende Zellen). Hingegen waren nach Kokultivierung mit mehr myeloischen Zellen (1:0,5) mehr ZTL Annexin V- und PI-positiv, jedoch unabhängig ob die Kokultur mit klassischen DZ oder RCC-DZ war. So waren in dem Ansatz mit klassischen DZ 6 % der Zellen Annexin V-positiv und PI-negativ und 5 % der ZTL Annexin V- und PI-positiv. In dem Ansatz mit RCC-DZ waren 7 % der ZTL Annexin V-positiv und PI-negativ und 4 % der ZTL Annexin V- und PI-positiv. Somit waren in den Ansätzen mit myeloischen Zellen etwas mehr tote ZTL enthalten, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen der Kokultivierung mit klassischen DZ und RCC-DZ.

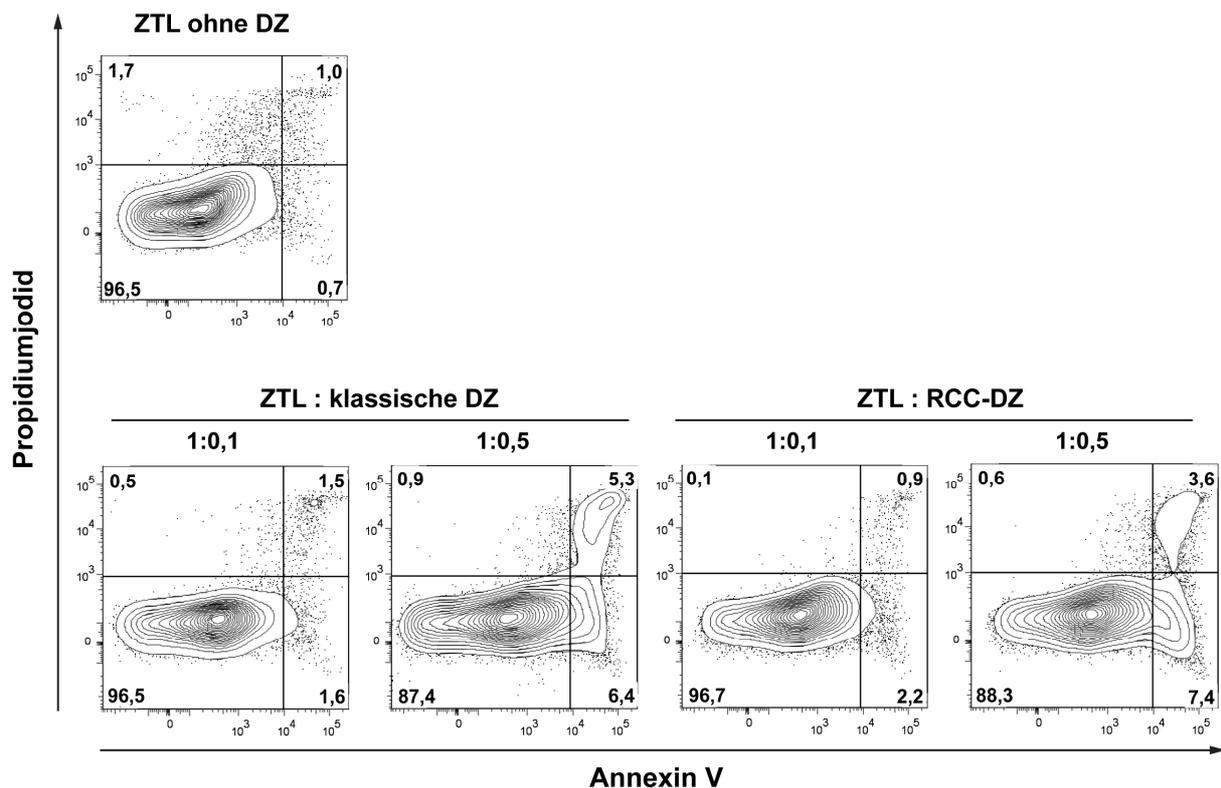


Abb. 6-29: Apoptose in ZTL nach Koinkubation mit klassischen DZ oder RCC-DZ

Klassische DZ und RCC-DZ wurden wie beschrieben aus Monozyten generiert. Anschließend erfolgte eine Kokultivierung mit ZTL (JB4) über 24 Std. im Verhältnis ZTL:DZ von 1:0,1 bzw. 1:0,5. Danach wurden die Zellen zum einen mit Antikörpern zur Detektion der ZTL und zum anderen mit Annexin V und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der CD3⁺ ZTL wurden Konturdiagramme mit der Fluoreszenz von Annexin V auf der x-Achse und der von PI auf der y-Achse erstellt. Die Kokultivierungsbedingungen sind über den Diagrammen gezeigt. Apoptotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-negativ und tote Zellen sind Annexin V- und PI-positiv. Die Zahlen geben den Prozentsatz positiver Zellen im entsprechenden Quadranten an.

Um zu testen, ob RCC-DZ die ZTL in ihrer Fähigkeit zur Abtötung von Tumorzellen beeinflussen, wurde ein Chrom-Freisetzungstest durchgeführt. Hierfür wurden die ZTL zusammen mit einer konstanten Anzahl von markierten Tumorzellen (5:1) ohne DZ, oder mit verschiedenen Mengen an klassischen DZ bzw. RCC-DZ für 4 Std. inkubiert. Da die DZ von Monozyten eines HLA-A2-negativen Spenders generiert wurden, hatten sie keine Zielstruktur für den JB4-ZTL und sollten die cognate ZTL-Tumorzellinteraktion über TZR und pMHC nicht direkt kompetieren. Sollten Veränderungen auftreten, müssen andere Mechanismen verantwortlich sein. Abb. 6-30 zeigt den Anteil spezifischer Lyse der Tumorzellen. Während die ZTL ohne DZ 28 % spezifische Lyse der Tumorzellen (schwarzer Balken) zeigten, steigerte sich durch Zugabe von DZ in Konzentrations abhängiger Weise die lytische Aktivität der ZTL gegen die Tumorzellen. Beide myeloische Typen förderten die Lyseaktivität der ZTL gleichermaßen.

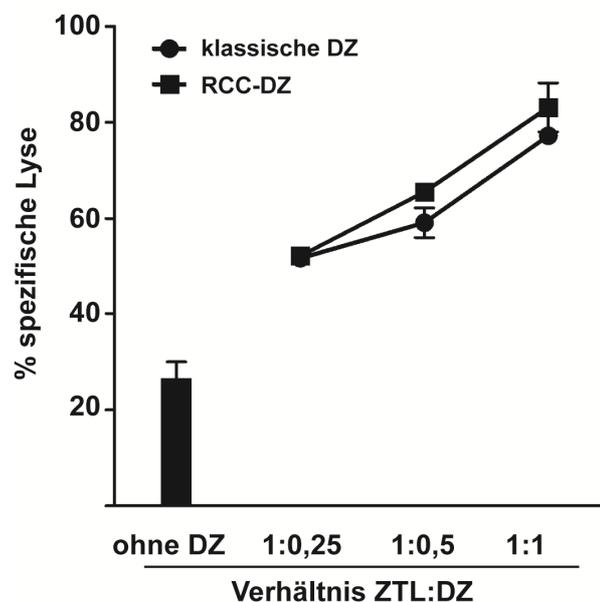


Abb. 6-30: Lytische Aktivität der ZTL im Beisein myeloischer Zellen

Die Zytotoxizität des ZTL-Klons JB4 gegen RCC-26 im Beisein myeloischer Zellen wurde in einem 4 Std. Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Dafür wurde ein konstantes Verhältnis von ZTL:RCC-26 (5:1) mit titrierter Anzahl myeloischer Zellen verwendet. Die klassischen DZ und RCC-DZ wurden wie beschrieben aus Monozyten eines HLA-A2-negativen Spenders generiert. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil spezifischer Lyse der Tumorzellen, die x-Achse das Verhältnis der ZTL:DZ. Der schwarze Balken zeigt die Kultur der ZTL ohne DZ, die Kreise die der ZTL mit klassischen DZ und die Vierecke die der ZTL mit RCC-DZ. Die Symbole sind die Mittelwerte der Duplikate, die Fehlerbalken sind die Mittelwertabweichungen. Die Daten sind exemplarisch für zwei durchgeführte Experimente.

Zusätzlich zum direkten Einfluss der myeloischen Zellen auf die lytische Aktivität der ZTL, wurde getestet, ob die RCC-DZ vielleicht bei Langzeitkokultur die ZTL beeinträchtigen (Abb.

6-31). Dazu wurden die ZTL in verschiedenen Verhältnissen (1:0,25, 1:0,5, 1:1) mit klassischen DZ bzw. RCC-DZ 24 Std. kokultiviert, anschließend geerntet und in einen 4-stündigen Chrom-Freisetzungstest mit RCC-26 eingesetzt. Da die ZTL nicht von den DZ getrennt wurden, waren diese auch noch während der lytischen Inkubation der ZTL mit den Tumorzellen anwesend. ZTL, die ohne DZ kultiviert wurden, zeigten 37 % spezifische Lyse der Tumorzellen. Die Kultivierung mit DZ steigerte die lytische Aktivität der ZTL gegen die Tumorzellen. Bei niedrigem ZTL:DZ Verhältnis, vor allem wenn klassischen DZ verwendet wurden, ging die lytische Aktivität bis auf 60 % zurück.

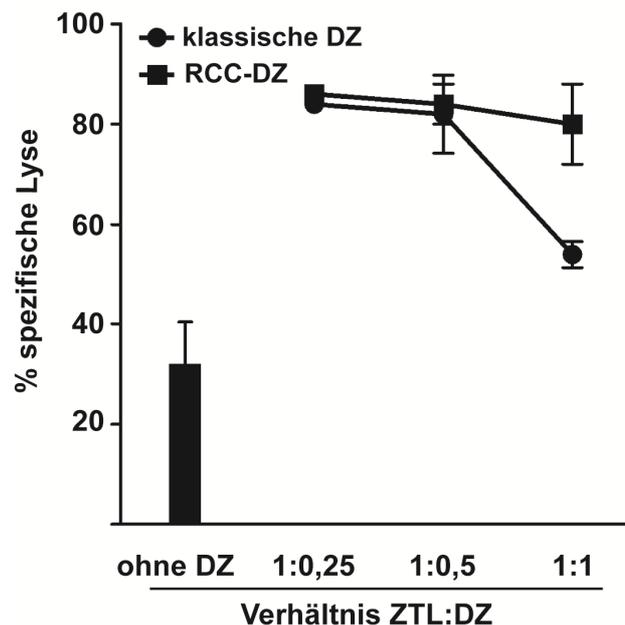


Abb. 6-31: Lytische Aktivität der ZTL nach Kokultivierung mit myeloischen Zellen

Die Zytotoxizität des ZTL-Klons JB4 gegen RCC-26 nach Koinkubation mit myeloischen Zellen wurde in einem 4 Std. Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Die ZTL wurden für 24 Std. mit einer titrierten Anzahl an klassischen DZ oder RCC-DZ kokultiviert und anschließend bei einem konstanten Verhältnis ZTL:RCC-26 von 5:1 die lytische Aktivität bestimmt. Die klassischen DZ und RCC-DZ wurden wie beschrieben aus Monozyten HLA-A2-negativer Spender generiert. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil spezifischer Lyse der Tumorzellen, die x-Achse das Verhältnis der ZTL:DZ. Der schwarze Balken zeigt die Kultur der ZTL ohne DZ, die Kreise die der ZTL mit klassischen DZ und die Vierecke die der ZTL mit RCC-DZ. Die Symbole sind die Mittelwerte der Duplikate, die Fehlerbalken sind die Mittelwertabweichungen. Die Daten sind exemplarisch für zwei durchgeführte Experimente.

Neben der Zytotoxizität wurde als weitere Effektorfunktion die TZR-stimulierte Zytokinsekretion der ZTL nach Vorkultivierung mit DZ analysiert. Dafür wurde die Expression der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer Zytokinfärbung bestimmt. Ferner wurde die CD107-Mobilisierung als Maß für die lytische Aktivität bestimmt. In Abb. 6-32 sind die Ergebnisse von drei Experimenten

zusammengefasst. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil positiver ZTL, normalisiert auf den Ansatz ohne DZ. Die Kultivierung der ZTL mit DZ veränderte die funktionelle Kapazität der ZTL nicht. Der Anteil CD107-, IFN- γ - und TNF- α -positiver Zellen war bei ZTL, die mit klassischen DZ sowie mit RCC-DZ vorkultiviert wurden, vergleichbar mit dem Anteil der ZTL die ohne DZ vorkultiviert wurden. Lediglich der Anteil IL-2-produzierender ZTL war nach der Kultivierung mit RCC-DZ reduziert, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen.

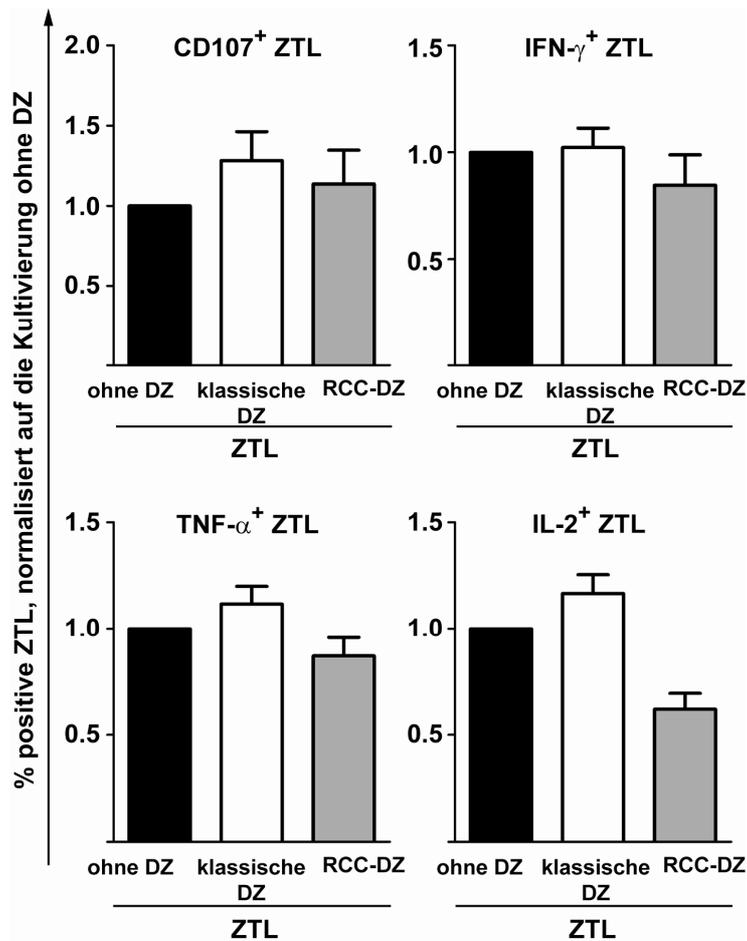


Abb. 6-32: Analyse der pMHC-TZR-induzierten Zytokinsekretion und Degranulation von ZTL nach Koinkubation mit myeloischen Zellen

ZTL wurden mit HLA-A2-negativen klassischen DZ, RCC-DZ oder ohne DZ für 24 Std. (Verhältnis 1:0,3) kokultiviert. Danach wurden die Zellen geerntet und Zielzellen (RCC-26) für 5 Std. (Verhältnis E:T = 1:2) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der lebenden CD45⁺CD3⁺ ZTL wurden die Anteile Zytokin- bzw. CD107-positiver Zellen bestimmt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver ZTL, jeweils normalisiert auf den Ansatz ohne DZ. Die x-Achse gibt die Kokultivierungsbedingungen an. Die Balken sind die Mittelwerte dreier Experimente, die Fehlerbalken sind die SEM.

Die Kokultivierung der ZTL mit myeloischen Zellen führte offensichtlich zu gesteigerter lytischer Aktivität ohne die Fähigkeit zur Zytokinproduktion zu beeinflussen. Wichtig für das

Abtöten von Zielzellen sind die zytolytischen Proteine Perforin und Granzym B. Deren Expression in ZTL wurde nach Inkubation mit klassischen DZ bzw. RCC-DZ untersucht. Wie in Abb. 6-33 zu erkennen, veränderte sich der Gehalt an Perforin und Granzym B der ZTL nach Kokultivation mit klassischen DZ nicht. Allerdings war ein Anstieg in der Expression der lytischen Proteine zu erkennen, nachdem die ZTL mit RCC-DZ kokultiviert wurden.

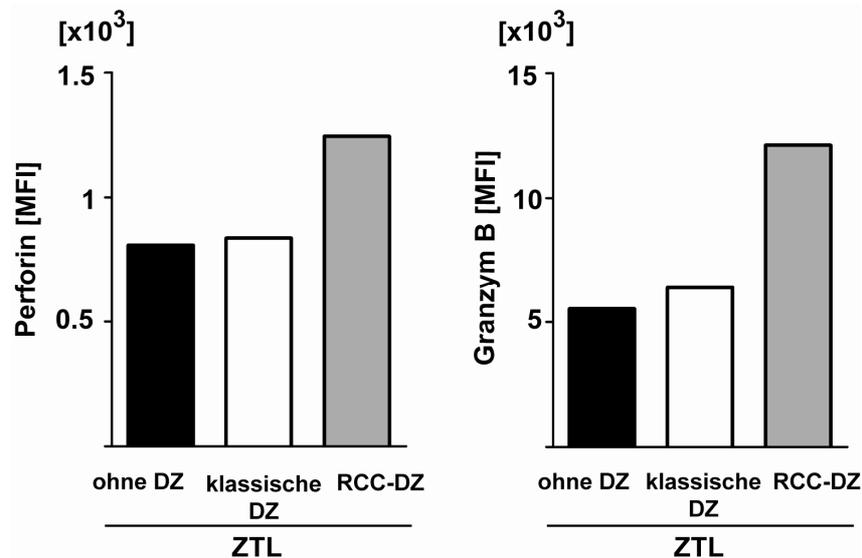


Abb. 6-33: Analyse des Zytotoxingehalts in ZTL nach Kokultivation mit myeloischen Zellen

ZTL wurden für 24 Std. ohne, mit klassischen DZ oder RCC-DZ kokultiviert (Verhältnis ZTL:DZ = 1:0,5) und anschließend mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der lebenden $CD45^+CD3^+$ ZTL wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von Perforin und Granzym B bestimmt. Die y-Achse zeigt die MFI für Perforin (links) bzw. Granzym B (rechts) und die x-Achse die Kokultivierungsbedingungen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass die RCC-DZ nicht die für myeloische Suppressorzellen beschriebenen Eigenschaften besitzen, da sie in ZTL weder $CD3\zeta$ oder $CD3\epsilon$ abregulierten noch Apoptose induzierten. Ebenso beeinträchtigten sie die lytische Aktivität und Zytokinproduktion der ZTL bei Tumorzellerkennung nicht. Vielmehr zeigten die RCC-DZ in ZTL-Kokultur trotz ihres anderen Phänotyps vergleichbare Eigenschaften wie klassische DZ.

6.7 Untersuchung wichtiger Signalmoleküle in den Effektorzellen der TIL

Es konnte gezeigt werden, dass die Effektorzellen der TIL funktionelle Defizite aufweisen. So zeigten die T-Zellen bei Stimulation mittels anti-CD3-Antikörper und die NK-Zellen bei K562-Stimulation keine Degranulation oder Zytokinproduktion. Auf Grund dessen wurde vermutet, dass Signalwege, welche zu Effektorfunktion führen unterbrochen sind. Eine vereinfachte schematische Darstellung des TZR-Signalweges ist in Abb. 6-34 gezeigt. Die Signalweiterleitung beruht auf der Phosphorylierungskaskade verschiedener Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde der Phosphorylierungsstatus ausgewählter Signalproteine nach Stimulation in T- und NK-Zellen bestimmt.

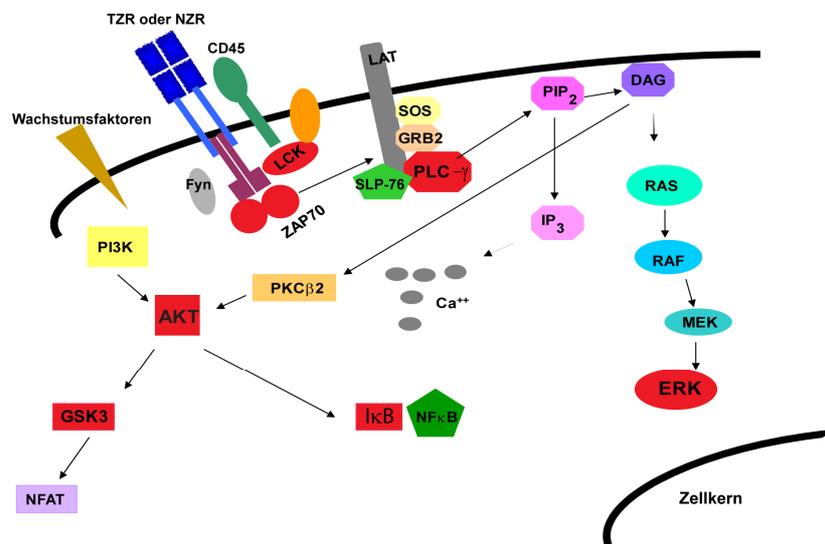


Abb. 6-34: Schematische Übersicht über Signalkaskaden, die zu Zytokinproduktion und Zytotoxizität führen

Das Schema zeigt die Signalwege beginnend am TZR. NK-Zellen benutzen dieselben Signalproteine; anstatt über den TZR wird das Signal über aktivierende Rezeptoren der NK-Zellen wie beispielsweise über NZR ausgelöst. Die Proteine, deren stimulationsinduzierte Phosphorylierung in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in rot dargestellt.

6.7.1 Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von LCK in T- und NK-Zellen

Zunächst wurde das unmittelbar an den TZR angekoppelte Signalprotein LCK untersucht. Für die Analyse wurde die Phosphorylierungsstelle am Tyrosin 505 (Tyr505) mit phosphospezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert (pLCK). Das Tyr505 ist eine inhibitorische Phosphorylierungsstelle (Yamaguchi et al., 1996), die entfernt werden

muss damit eine Aktivierung stattfinden kann. Daher sollte die Phosphorylierung bei erfolgreicher Stimulation abnehmen. Als Kontrollgruppe zu den TIL wurden gesunde Spender-PBL mitgeführt. Stimuliert wurden die T-Zellen der TIL über den TZR mit anti-CD3-Antikörpern und die NK-Zellen in den TIL mit K562. Nach Auswahl der CD3-positiven Zellen bzw. der NK-Zellen wurde die MFI der Fluoreszenz für phosphoryliertes LCK bestimmt und der Fluoreszenzwert der stimulierten Probe auf den Wert ohne Stimulation normalisiert. Die Abb. 6-35 zeigt, dass die MFI für pTyr505 des LCK-Proteins der stimulierten Probe in T-Zellen und NK-Zellen der PBL sowie der TIL vergleichbar abnahm. Dies ist gleichbedeutend mit einer Dephosphorylierung des phosphorylierten LCK-Proteins am Tyr505. Somit wurde die inhibitorische Phosphorylierung reduziert und das Signalprotein LCK für eine nachfolgende aktivierende Phosphorylierung freigegeben. In TIL scheint dieser erste Schritt, die Entfernung der inhibitorischen Tyr-Phosphorylierung, bei Stimulation korrekt zu erfolgen.

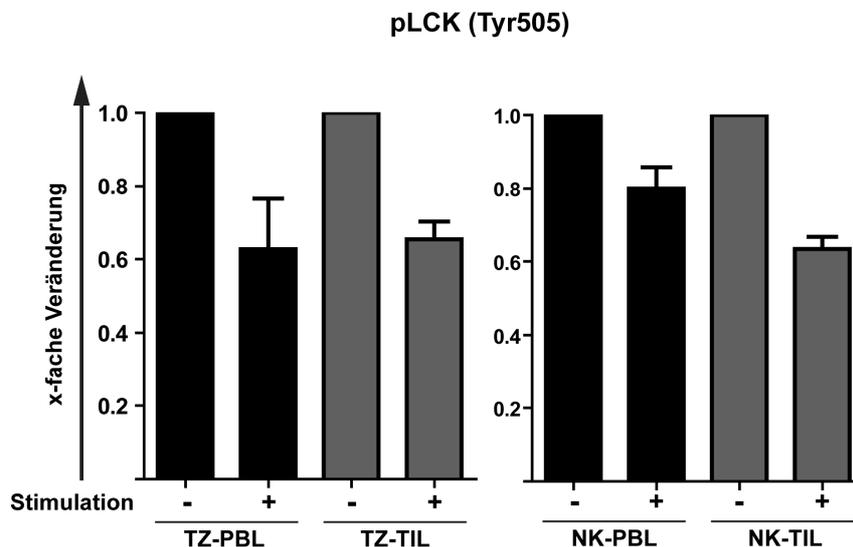


Abb. 6-35: Analyse der Tyr505-Phosphorylierung des LCK in T- und NK-Zellen nach Stimulation

TIL wurden wie beschrieben isoliert. Als Kontrolle wurden gesunde Spender-PBL mitgeführt. Die T-Zellen wurden über den TZR mit P815-OKT3, die NK-Zellen mit K562 für 4 Min. stimuliert, anschließend fixiert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der T- (TZ) bzw. NK-Zellen wurde die MFI für pLCK (Tyr505) bestimmt. Die y-Achse zeigt die x-fache Veränderung bezogen auf den unstimulierten Ansatz. Die Balken sind der Mittelwert der durchgeführten Experimente (n=3), die Fehlerbalken sind die SEM.

6.7.2 Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von PLC- γ 2 in T-Zellen

Als nächstes wurde die Phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2) untersucht. Diese bildet mit GRB2, SOS und LAT einen wichtigen Signalkomplex, der von den proximalen Signalmolekülen aktiviert wird. TIL, NIL und gesunde Spender-PBL wurden über den TZR für 4 Min. stimuliert, anschließend mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zur Auswertung

der Daten wurden die CD3⁺ Zellen ausgewählt und die MFI des phosphorylierten PLC- γ 2 bestimmt.

Abb. 6-36 zeigt die Veränderung der Fluoreszenzintensität nach der Stimulation bezogen auf den unstimulierten Wert. Es ist zu erkennen, dass die T-Zellen der PBL, TIL und NIL PLC- γ 2 nach Stimulation in gleichem Maße phosphorylierten. Durch die Stimulation nahm die MFI der PLC- γ 2, verglichen mit der jeweiligen unstimulierten Kontrolle, bei den PBL um 1,7, bei den TIL um 1,8 und bei den NIL um 1,4 zu. Somit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der PLC- γ 2 in den T-Zellen der TIL in vergleichbarem Ausmaß zu der in PBL und NIL durchgeführt wurde.

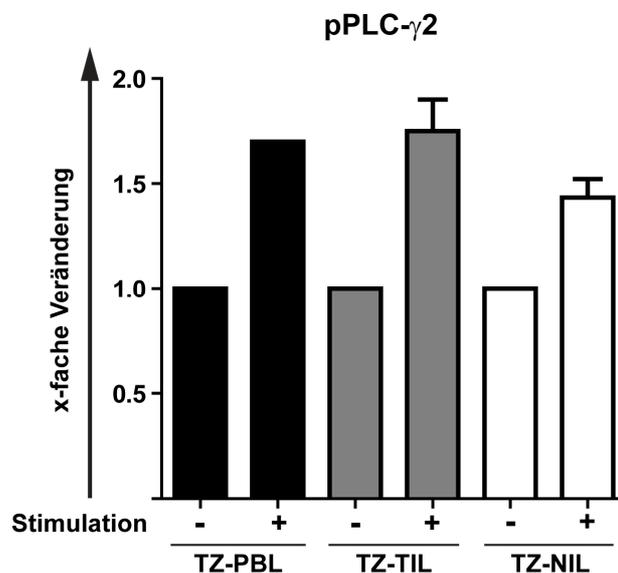


Abb. 6-36: Analyse der Phosphorylierung von PLC- γ 2 in T-Zellen nach Stimulation

TIL und NIL wurden wie beschrieben isoliert. Als Kontrolle wurden gesunde Spender-PBL mitgeführt. Die T-Zellen wurden über den TZR mit anti-CD3 Antikörper und anschließend Quervernetzen für 4 Min. stimuliert, anschließend fixiert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der T-Zellen (TZ) wurde die MFI für pPLC- γ 2 bestimmt. Die y-Achse zeigt die x-fache Veränderung bezogen auf den unstimulierten Ansatz. Die Balken sind die Mittelwerte der MFI der durchgeführten Experimente mit verschiedenen TIL, NIL (n=3) bzw. PBL (n=1); die Fehlerbalken sind die SEM.

6.7.3 Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von ERK in T- und NK-Zellen

Die aktivierte PLC- γ 2 spaltet PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in DAG (Diazylglyzerol) und IP₃ (Inositoltriphosphat), was zu einer Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen und zur Einleitung des RAS-Signalweges führt. Am Ende des RAS-MAP-Kinase Signalweges steht ERK, welches an der Auslösung der Degranulation mitbeteiligt ist. Da die T- und NK-Zellen der TIL in der Degranulation gestört waren, sollte die Phosphorylierung von ERK nach

Stimulation untersucht werden. TIL, NIL und gesunde Spender-PBL wurden mit dem chemischen Agens PMA/Ionomycin stimuliert und die ERK-Phosphorylierung am Threonin 202 und Tyrosin 204 der T- und NK-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde hier mit PMA/Ionomycin stimuliert und nicht über den TZR, weil der Stimulus so nah wie möglich oberhalb von ERK erfolgen sollte um auszuschließen, dass ein Ausbleiben der ERK-Phosphorylierung nicht auf weiter oben liegende Defekte beruht. In Abb. 6-37 ist die MFI für phosphoryliertes ERK in den beiden Effektorzellgruppen verschiedener TIL, NIL und PBL dargestellt. In T- und NK-Zellen der PBL und NIL war nach Stimulation die Phosphorylierung des ERK-Proteins deutlich erhöht, wohingegen in T- und NK-Zellen der TIL die Phosphorylierung deutlich niedriger war. Der Unterschied in der MFI von phosphoryliertem ERK zwischen T- bzw. NK-Zellen der TIL und NIL war signifikant.

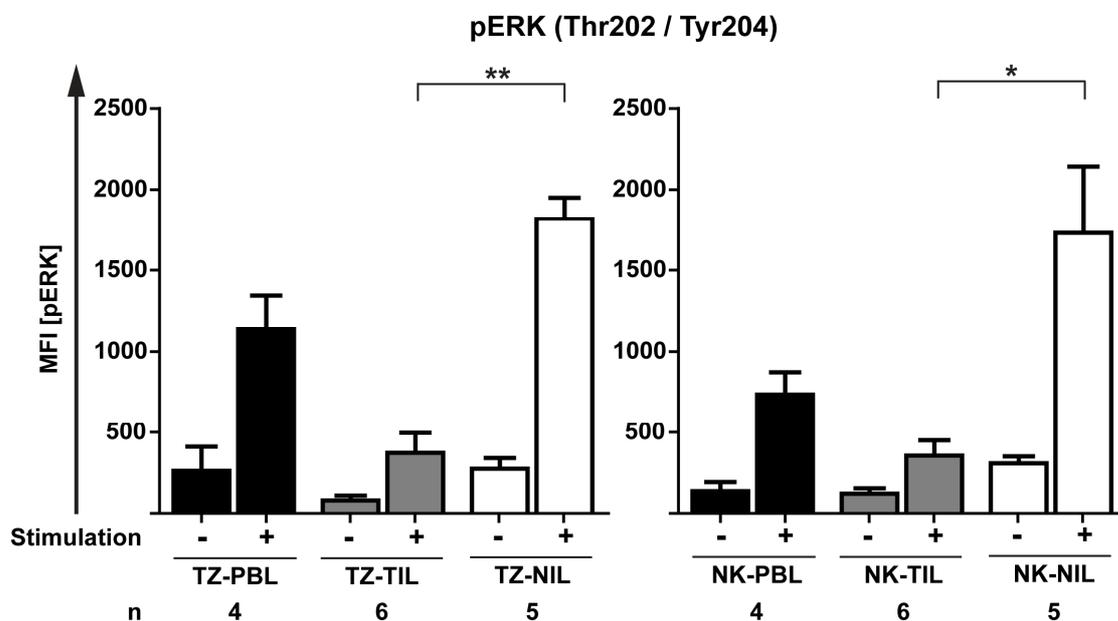


Abb. 6-37: Analyse der ERK-Phosphorylierung am Threonin 202 und Tyrosin 204 in T- und NK-Zellen nach Stimulation

TIL und NIL wurden wie beschrieben isoliert. Als Kontrolle wurden gesunde Spender-PBL mitgeführt. Die T- und NK-Zellen wurden für 8 Min. mit PMA/I stimuliert, anschließend fixiert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der T- (TZ) bzw. NK-Zellen wurde die MFI für phosphoryliertes ERK bestimmt. Die y-Achse zeigt die MFI des phosphorylierten ERK-Proteins. Die Balken sind die Mittelwerte der MFI der durchgeführten Experimente (n) mit verschiedenen TIL, NIL bzw. PBL; die Fehlerbalken sind die SEM. Im linken Diagramm sind die Werte für T-Zellen gezeigt, rechts die NK-Zellen. Die schwarzen Balken sind die PBL, die grauen Balken die TIL und die weißen Balken die NIL. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (TZ: $p=0,004$, NK: $0,02$) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Offensichtlich ist in TIL die Signalkaskade unterhalb von PLC- γ 2 und oberhalb von ERK abgeschwächt. Um auszuschließen, dass die reduzierte Phosphorylierung des ERK-Proteins

nicht auf Grund einer niedrigeren ERK-Proteinexpression auftrat, wurden die ERK-Proteinmenge in den Effektorzellen von drei TIL bzw. NIL durchflusszytometrisch gemessen. Wie in Abb. 6-38 zu erkennen, wiesen die T-Zellen und die NK-Zellen der TIL eine vergleichbare Menge an ERK-Protein auf wie die entsprechende Zellpopulation der NIL.

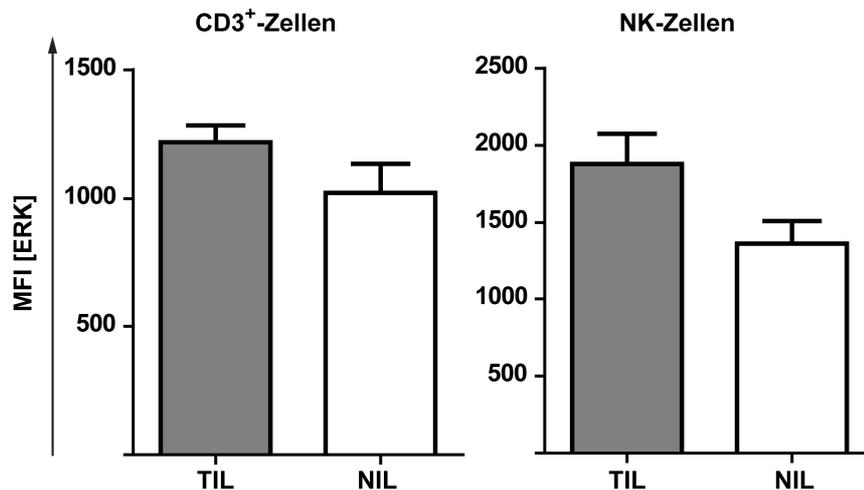


Abb. 6-38: Bestimmung der ERK-Proteinmenge in T- und NK-Zellen der TIL und NIL

TIL und NIL wurden wie beschrieben isoliert. Zur Bestimmung der ERK-Proteinmenge wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der CD3⁺ und NK-Zellen wurde die mittlere Fluoreszenz (MFI) von ERK ermittelt, welche auf der y-Achse dargestellt ist. Die Balken sind die Mittelwerte der drei untersuchten TIL bzw. NIL, die Fehlerbalken sind die SEM.

6.7.4 Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von AKT in T- und NK-Zellen

AKT ist ein Signalmolekül, welches in T- und NK-Zellen beispielsweise über die PI3-Kinase oder PKC-β2 aktiviert werden kann. Eine Phosphorylierung führt zur Aktivierung von AKT, welche auf viele nachfolgende Proteine einwirkt und wichtig ist für Zellüberleben, -proliferation, -differenzierung und Zytokinproduktion. Es wurde untersucht, ob nach Stimulation die Signalweiterleitung in T- und NK-Zellen der TIL, NIL und PBL zu einer Phosphorylierung und daher Aktivierung von AKT führt.

Zur Analyse der AKT-Phosphorylierung wurden TIL, NIL und PBL mit PMA/Ionomycin für 8 Min. stimuliert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der T- bzw. NK-Zellen wurde die MFI des am Serin 473 phosphorylierten AKT-Proteins bestimmt (Abb. 6-39). Die T- und NK-Zellen der PBL phosphorylierten AKT nach Stimulation, was in einem Anstieg der MFI von phosphoryliertem AKT zu erkennen war, wohingegen die beiden Zellgruppen der NIL schon einen höheren Phosphorylierungszustand im unstimulierten Zustand aufwiesen, welcher durch die PMA/Ionomycin Stimulation nicht

anstieg. Bei den T- und NK-Zellen der TIL wurde nur ein sehr geringer Anstieg der MFI des phosphorylierten AKT-Proteins beobachtet und die MFI blieb signifikant unter dem Wert der T-Zellen der PBL. Offensichtlich gibt es in den TIL Defizite, die zu einer reduzierten AKT-Phosphorylierung in T- und NK-Zellen der TIL führte.

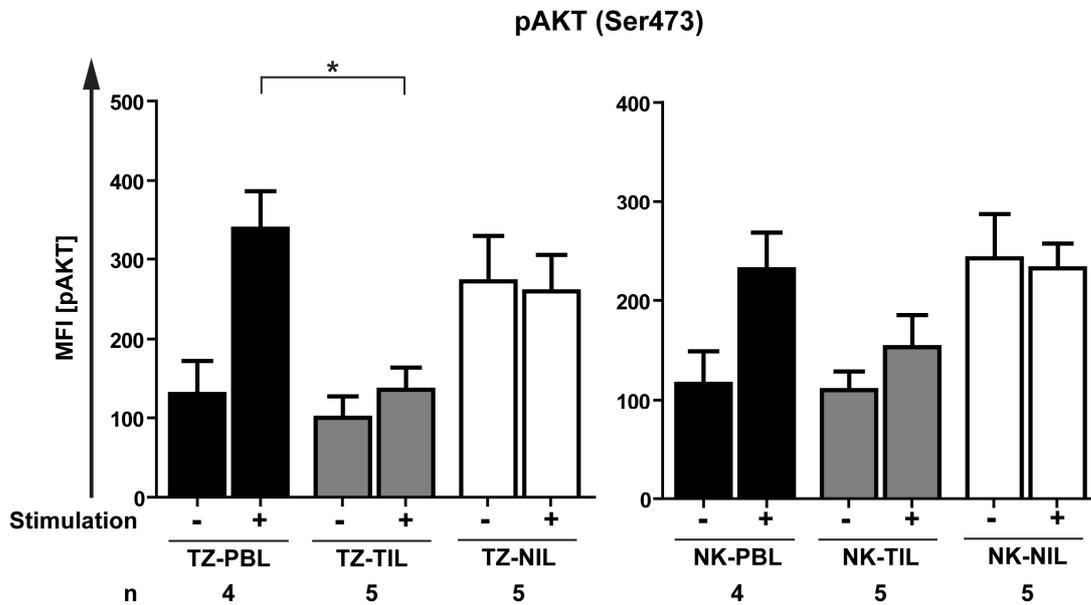


Abb. 6-39: Analyse der AKT-Phosphorylierung am Serin 473 in T- und NK-Zellen nach Stimulation

TIL und NIL wurden wie beschrieben isoliert. Als Kontrolle wurden gesunde Spender-PBL mitgeführt. Die T- und NK-Zellen wurden für 8 Min. mit PMA/Ionomycin stimuliert, anschließend fixiert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der T- (TZ) bzw. NK-Zellen wurde die MFI für phosphoryliertes AKT bestimmt. Die y-Achse zeigt die MFI des phosphorylierten AKT-Proteins. Die Balken sind die Mittelwerte der MFI der durchgeführten Experimente (n) mit verschiedenen TIL, NIL bzw. PBL; die Fehlerbalken sind die SEM. Im linken Diagramm sind die Werte für T-Zellen gezeigt, rechts die NK-Zellen. Die schwarzen Balken sind die PBL, die grauen Balken die TIL und die weißen Balken die NIL. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis (TZ: $p=0,03$) ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* $p<0,05$).

6.7.5 Überprüfung der Spezifität des durchflusszytometrischen Fluoreszenzsignals des phosphospezifischen ERK- bzw. AKT-Antikörpers

Um die Spezifität der durchflusszytometrischen Messung der eingesetzten phosphospezifischen Antikörper für ERK und AKT zu überprüfen, wurden Inhibitoren der Phosphorylierung des jeweiligen Proteins eingesetzt. Hierfür wurden PBL in An- oder Abwesenheit des Inhibitors mit PMA/Ionomycin stimuliert und durchflusszytometrisch mit den entsprechenden Phosphoantikörpern analysiert. Nach Auswahl der T-Zellen wurde die MFI des jeweiligen Signalproteins bestimmt. Zur Inhibierung der ERK-Phosphorylierung wurde

der MEK1-Inhibitor PD98059 verwendet. In Abb. 6-40 (links) ist zu erkennen, dass bei Stimulierung in Anwesenheit des Inhibitors (rotes Histogramm) der Anstieg der MFI ausblieb und gleich war mit dem unstimulierten Ansatz (grau). Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich für den phosphospezifischen AKT-Antikörper (Abb. 6-40 rechts). Unterdrückt wurde die AKT-Phosphorylierung durch den Einsatz von Perifosin. In Anwesenheit dieses Inhibitors war die Fluoreszenzintensität für phosphoryliertes AKT deutlich reduziert im Vergleich zu der stimulierten Probe ohne Inhibitor (schwarz). Die Inhibierung war nicht komplett, da, wie später auch in Western-Blot Analysen bestätigt wurde, die Konzentration des Perifosins zu gering eingesetzt war. Diese Ergebnisse zeigten, dass die durch Stimulation und Antikörperfärbung beobachtete Zunahme der Fluoreszenz nicht auf unspezifische Bindung/Färbung durch den phosphospezifischen Antikörper zurückzuführen ist, sondern auf die stimulierte Phosphorylierung des entsprechenden Proteins.

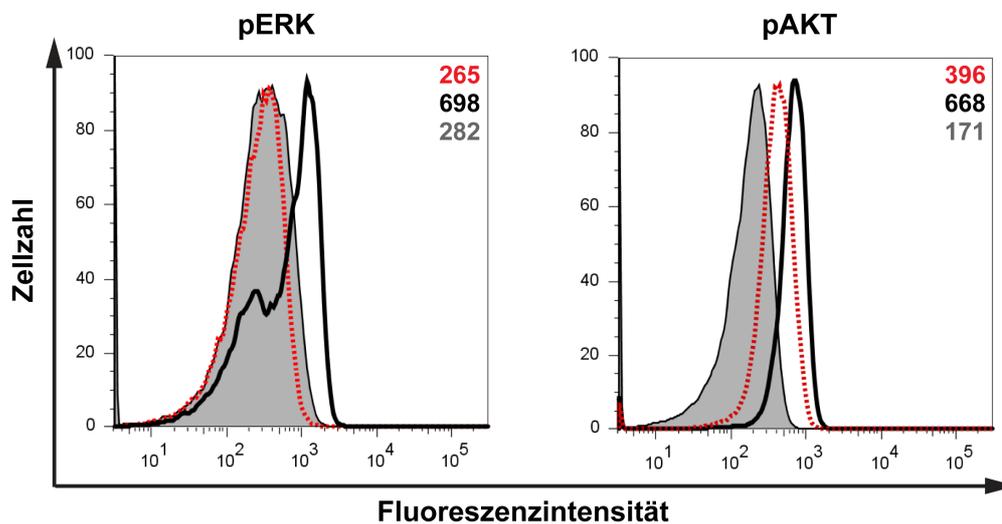


Abb. 6-40: Untersuchung der Spezifität der Antikörperbindung gegen pERK und pAKT in T-Zellen

PBL wurden in An- oder Abwesenheit von Inhibitoren der ERK- (PD98059) bzw. AKT- (Perifosin) Phosphorylierung mit PMA/I stimuliert, fixiert, mit phosphospezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der T-Zellen wurden die Fluoreszenzen des unstimulierten Ansatzes (grau), des stimulierten Ansatzes ohne Inhibitor (schwarz) und des stimulierten Ansatzes mit Inhibitor (rot) als Histogramme dargestellt. Die jeweilige MFI ist als Zahlenwert im Diagramm angegeben.

6.7.6 Bio-Plex™ Phosphoproteinbestimmung in T- und NK-Zellen der TIL

Neben der durchflusszytometrischen Analyse einiger Signalproteine wurde zusätzlich ein BIO RAD Bio-Plex™ zur Bestimmung von Phosphoproteinen (=Phospho-Plex) durchgeführt.

Zum einen konnten hier bestimmte Signalproteine untersucht werden, für die eine durchflusszytometrische Analyse nicht möglich war, zum anderen sollten die bisherigen Ergebnisse der ERK-Phosphorylierung mittels einer anderen Methode bestätigt werden. Hierfür wurden durch Zellseparation die CD8⁺(TZ) und CD56⁺(NK)-Zellen aus PBL von zwei Spendern und aus TIL von 3 Tumoren isoliert, unstimuliert belassen oder mit PMA/Ionomycin stimuliert und die Zelllysate im Phospho-Plex eingesetzt. Abb. 6-41 zeigt das Ergebnis für die beiden Effektorzellgruppen der TIL im Vergleich zu PBL, wobei die x-fache Veränderung des Signals nach der Stimulation bezogen auf den unstimulierten Ansatz dargestellt ist. Die T- und NK-Zellen der PBL waren in der Lage ERK nach Stimulation zu phosphorylieren (T-Zellen zeigten eine 50-fache Zunahme und NK-Zellen eine 23-fache), während mit Zellen der TIL dies nicht auftrat (T-Zellen zeigten nur eine 5-fache Zunahme und NK-Zellen eine 4-fache). Für die ERK-Phosphorylierung zeigte sich somit, dass diese in T- und NK-Zellen der TIL viel weniger ausgeprägt war als in PBL. Damit bestätigten sich die durchflusszytometrisch erhaltenen Ergebnisse im Phospho-Plex.

JNK, ein weiteres Protein der MAP-Kinase-Superfamilie, wies in den T- und NK-Zellen der TIL im Vergleich zu den Zellen der PBL ebenfalls eine geringere Phosphorylierung nach Stimulation auf. T-Zellen in TIL zeigten eine 1,4-fache Zunahme der JNK-Phosphorylierung und NK-Zellen in TIL eine 1,2-fache wohingegen T-Zellen in PBL eine 2,1-fache Zunahme zeigten und NK-Zellen in PBL eine 2,6-fache.

GSK3 und I κ B sind in der Signalkaskade nach AKT platziert. Beide waren in T- und NK-Zellen der TIL schwächer phosphoryliert als in den entsprechenden Zellen der PBL. Während bei den T-Zellen der PBL: eine Signalzunahme von 3,6 für GSK3 und 8,6 für I κ B zu sehen war, war es bei den T-Zellen der TIL nur 1,4 für GSK3 und 1,7 für I κ B. Ebenso war bei den NK-Zellen der PBL eine Signalzunahme von 6 für GSK3 und 3,2 für I κ B zu beobachten, wobei es bei den NK-Zellen der TIL nur 1,5 für GSK3 und 0,9 für I κ B war. Die geringe Phosphorylierung von GSK3 und I κ B in Effektorzellen der TIL kann als Konsequenz der beobachteten abgeschwächten Phosphorylierung und damit schwachen Aktivierung von AKT gesehen werden. Die schwache Phosphorylierung von GSK3 und I κ B hat Folgen für die Regulation der Aktivität weiterer Proteine wie die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B, die für die Auslösung z.B. von Zytokinprodukten wichtig sind.

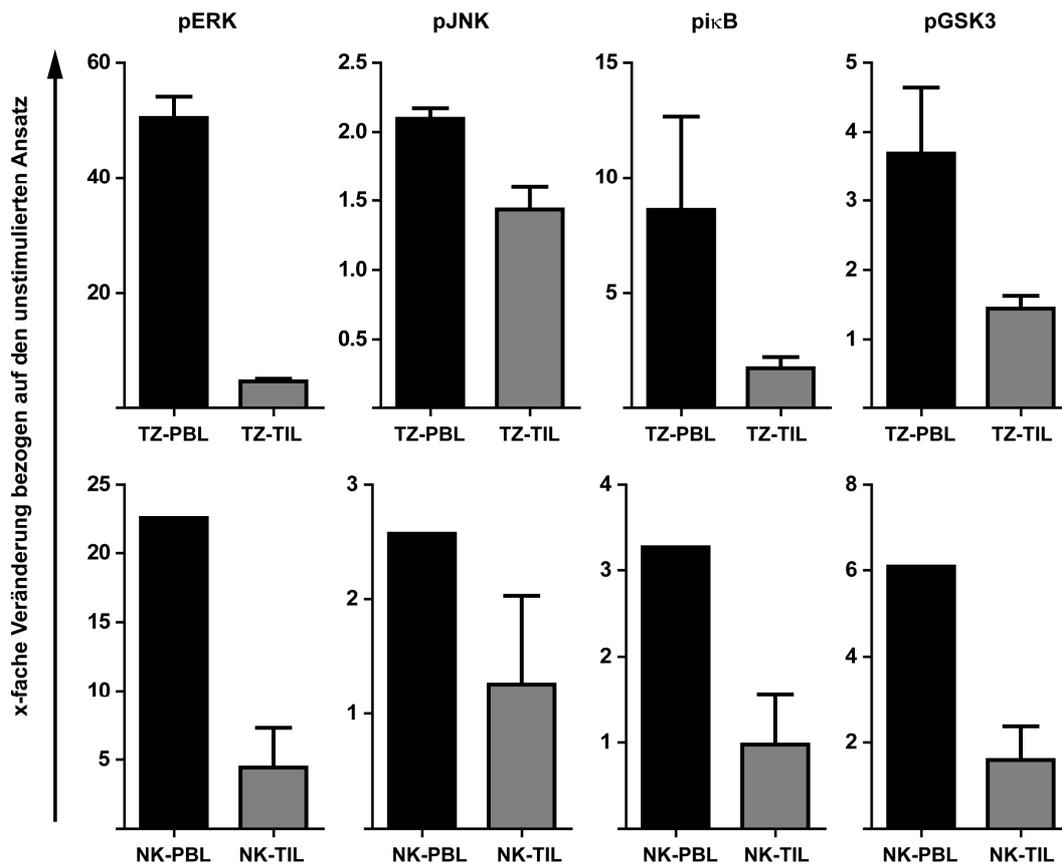


Abb. 6-41: Bio-Plex™ Phosphoproteinbestimmung von Signalproteinen in CD8⁺ und NK-Zellen der TIL und PBL

CD8⁺ (TZ) und CD56⁺ (NK) Zellen wurden aus TIL und als Vergleichsgruppe aus PBL mit magnetischen Beads isoliert, mit PMA/I für 8 Min. stimuliert und die Zellysate in einen Bio-Plex™ zur Phosphoproteinbestimmung eingesetzt. Die y-Achse zeigt die Signaländerung der stimulierten Probe um das x-fache bezogen auf die unstimulierte Probe. Die untersuchten Signalproteine stehen als Titel über dem jeweiligen Diagramm. Die Balken sind die Mittelwerte der TIL von unterschiedlichen Patienten bzw. PBL verschiedener Spender. Die Fehlerbalken sind die SEM (n TZ-PBL:2, n TZ-TIL:3, n NK-PBL:1, n NK-TIL: 3). Signifikanzen konnten auf Grund niedriger Probenanzahl nicht ermittelt werden.

6.7.7 Analyse des Diacylglycerols in T- und NK-Zellen der TIL

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Signalmoleküle zu Beginn der Kaskade (LCK, PLC- γ 2) in TIL vergleichbar zu der in NIL und PBL war, jedoch Moleküle, die am Ende der Kaskade (ERK, AKT, JNK, GSK3, I κ B) stehen schwächer phosphoryliert wurden. Daher wurde ein dazwischenliegendes Signalmolekül – Diacylglycerol (DAG) – untersucht. Für CD4⁺ T-Zellen wurde beschrieben, dass T-Zell-Anergie entsteht, wenn DAG durch überaktive Diacylglycerol-Kinase (DGK) in PA (Phosphatidylsäure) umwandelt wird (Zha et al., 2006).

Zunächst wurde mit Hilfe des In-vitro-Kokultivierungsmodell (siehe 6.5.1) untersucht, ob in Anwesenheit des Inhibitors der DGK der durch Kokultur mit hoher Tumorzellzahl induzierte

Funktionsverlust der T- bzw. NK-Zellen verhindert werden kann. PBL, als Quelle für funktionsfähige T- und NK-Zellen, wurden ohne Tumorzellen, mit einer niedrigen (Verhältnis 1:1) oder mit einer hohen Anzahl (Verhältnis 1:8) an Tumorzellen für 24 Std. mit oder ohne DGK-Inhibitor kultiviert. Anschließend wurde die funktionelle Aktivität der T- und NK-Zellen mittels des CD107-Mobilisierungstests, wobei auch hierbei der Inhibitor anwesend war, bestimmt. Abb. 6-42 zeigt den Anteil CD107-positiver Zellen innerhalb der CD3⁺CD8⁺ (links) und der NK-Zellen (rechts). Bei PBL, die ohne Tumorzellen kultiviert wurden, konnte ein Anteil CD107-positiver Zellen von 18 % für CD3⁺CD8⁺ Zellen und 38 % für NK-Zellen bestimmt werden. Durch die Kokultivierung mit einer niedrigen Tumorzellzahl veränderte sich die funktionelle Aktivität der Effektorzellen nicht, während der Anteil CD107-positiver Zellen nach der Kultivierung mit einer hohen Tumorzellzahl deutlich reduziert war: So degranulierten innerhalb der CD3⁺CD8⁺ nur noch 8 % und innerhalb der NK-Zellen nur noch 16 % der Zellen. Die Gabe des DGK-Inhibitors hatte keinen Einfluss bei Kultur ohne oder mit niedriger Tumorzellzahl, verhinderte jedoch den Verlust der funktionellen Aktivität bei Zellen, die mit einer hohen Tumorzellzahl vorkultiviert wurden: Mit Inhibitor zeigten 23 % der CD3⁺CD8⁺ und 27 % der NK-Zellen funktionelle Aktivität.

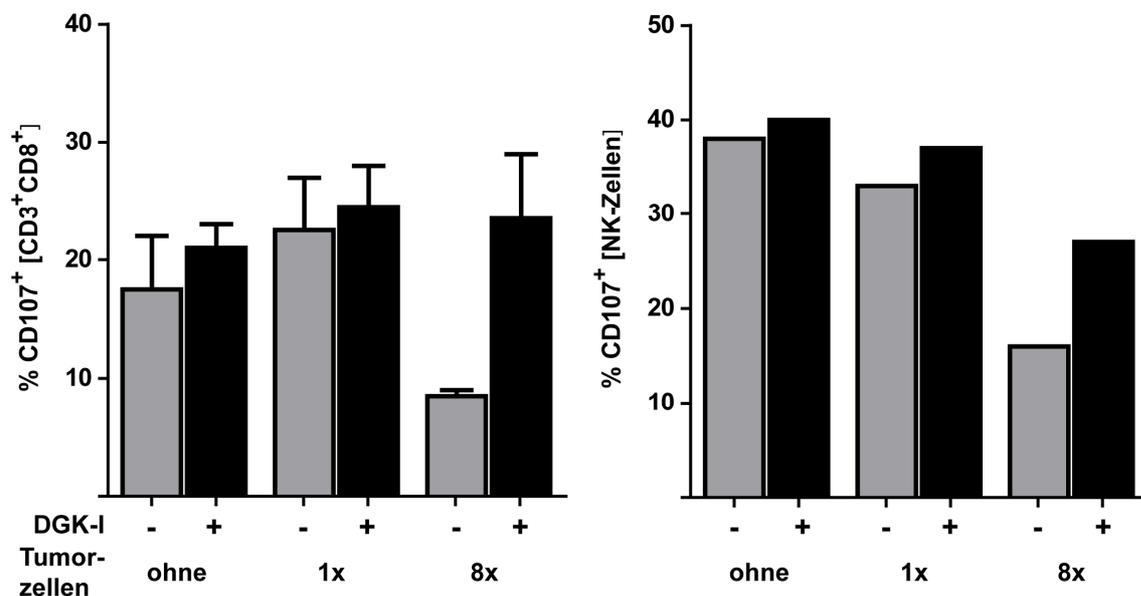


Abb. 6-42: Einfluss des DGK-Inhibitors auf die CD107-Oberflächenmobilisierung von CD3⁺CD8⁺ und NK-Zellen nach Inkubation mit Tumorzellen

PBL gesunder Spender wurden ohne, mit einer niedrigen Anzahl (Verhältnis 1:1) oder mit einer hohen Anzahl (Verhältnis 1:8) Tumorzellen für 24 Std. kokultiviert. Die Vorkultivierung erfolgte in An- oder Abwesenheit des DGK-Inhibitors. Anschließend wurde die funktionelle Aktivität mittels des CD107-Mobilisierungstests (+/- DGK-Inhibitor) analysiert. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil CD107-positiver Zellen innerhalb der CD3⁺CD8⁺ (links) bzw. der NK-Zellen (rechts). Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente mit PBL verschiedener Spender (CD3⁺CD8⁺ n=2, NK-Zellen n=1), die Fehlerbalken sind die SEM.

Durch die Zugabe des DGK-Inhibitors konnte somit der Funktionsverlust verhindert werden. Dies deutet darauf hin, dass der Abbau von DAG zu PA mitverantwortlich ist für die Induktion des Funktionsverlustes.

Als nächstes wurde untersucht, ob Effektorzellen, die bereits funktionell defizient sind, durch Inhibition der DGK ihre funktionelle Aktivität wieder erlangen können. Hierfür wurden TIL und NIL für 5 Std. mit Zielzellen ohne DGK-Inhibitor bzw. in Anwesenheit des DGK-Inhibitors stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abb. 6-43 zeigt die Mittelwerte der Anteile CD107-positiver T- bzw. NK-Zellen von 5 verschiedenen TIL bzw. NIL. Die Analyse der CD3⁺ TIL ergab, dass durch DGK-I der Anteil degranulierender Zellen signifikant von im Mittel 12 % auf 18 % anstieg. Dies ist eine Verbesserung um 50 %. Bei den T-Zellen der NIL, welche bessere Degranulationseigenschaften als die der TIL hatten, wurde in Anwesenheit des Inhibitors nur eine geringe Steigerung des Anteils degranulierender Zellen erreicht. Ebenso wie bei den T-Zellen der TIL verbesserte sich die funktionelle Aktivität der NK-Zellen der TIL durch die Zugabe des DGK-Inhibitors. Hier stieg der Anteil CD107-positiver NK-Zellen von 8 % ohne Inhibitor auf 22 % mit Inhibitor, was nahezu eine Verdreifachung aktiver Zellen bedeutet. Bei den NK-Zellen der NIL hatte die DGK-Inhibition keinen Effekt. Die für die TIL und NIL erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass durch Inhibition der DGK auch bei bereits funktionell gestörten Effektorzellen die Fähigkeit zur Degranulation verbessert werden kann.

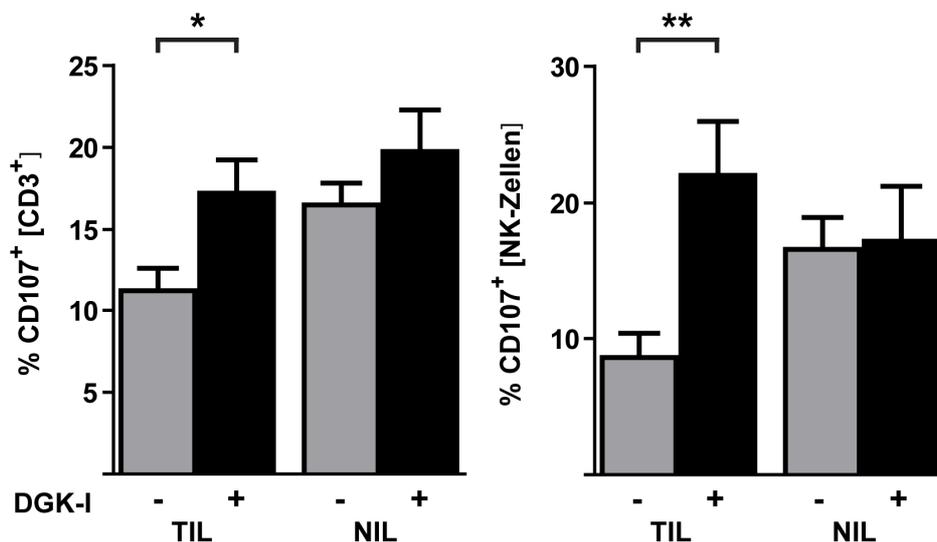


Abb. 6-43: Einfluss des DGK-Inhibitors auf funktionell defiziente Effektorzellen der TIL

TIL und NIL wurden wie beschrieben isoliert. Zur Bestimmung der funktionellen Aktivität wurden TIL und NIL in An- oder Abwesenheit des DGK-Inhibitors in den CD107-Mobilisierungstest eingesetzt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil CD107-positiver Zellen innerhalb der CD3⁺ (links) bzw. NK-Zellen (rechts). Die Balken sind die Mittelwerte der fünf untersuchten TIL bzw. NIL, die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* p<0,05; **p<0,01).

Abschließend sollte noch untersucht werden, ob die T- und NK-Zellen der TIL im Gegensatz zu denen der NIL mehr DGK-Protein aufweisen. Hierfür wurden die TIL und NIL desselben Patienten mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der T- bzw. NK-Zellen wurde der DGK-Gehalt der Zellen mittels Histogrammen dargestellt. Wie in Abb. 6-44 zu erkennen, exprimierten die CD3-positiven Zellen der TIL mit einer MFI von 3449 deutlich mehr DGK Protein als die CD3-positiven Zellen der NIL mit einer MFI von 1496. Ebenso wiesen auch die NK-Zellen der TIL (MFI 4552) mehr DGK auf als die NK-Zellen der NIL (MFI 2301). Die Abbildung zeigt exemplarisch 1 von 5 untersuchten Tumor-Normalnierenpärchen. Die erhöhte Proteinexpression in TIL-Effektorzellen zusammen mit dem gezeigten positiven Effekt der DGK-Inhibition legen nahe, dass eine überexprimierte DGK im Tumormilieu eine wichtige Rolle für die funktionelle Inaktivität der Effektorzellen spielen könnte.

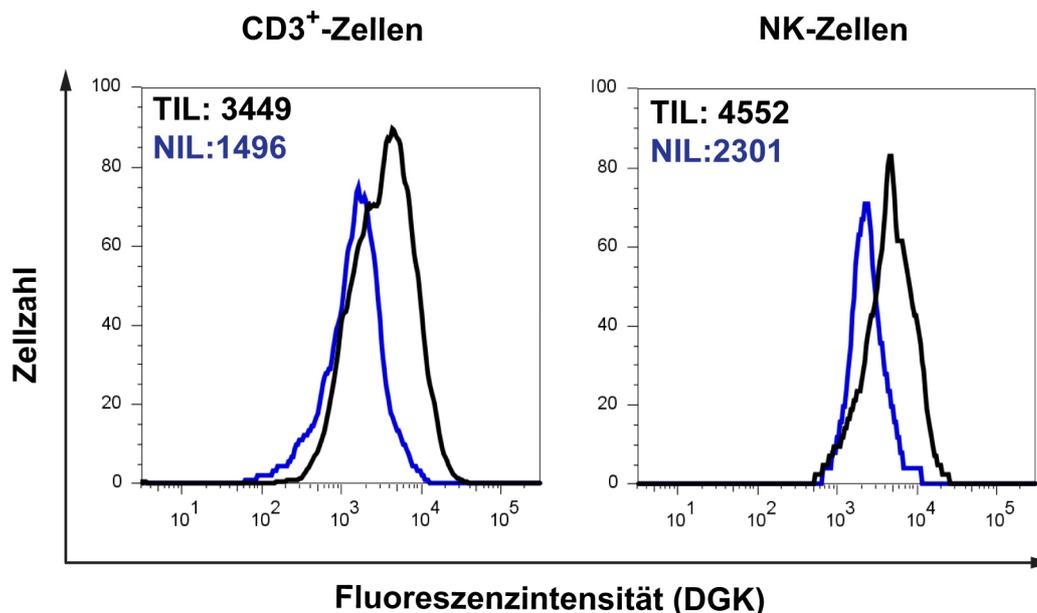


Abb. 6-44: Diazylglyzerolkinasenmenge in den Effektorzellen der TIL

TIL und NIL wurden wie beschrieben isoliert. Zur Bestimmung der Expression der DGK wurden TIL und NIL derselben Patienten mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der CD3⁺ bzw. NK-Zellen wurde die Fluoreszenzintensität der DGK mittels Histogrammen veranschaulicht. Die y-Achse zeigt die Zellzahl und die x-Achse die Fluoreszenzintensität. Das blaue Histogramm stellt die NIL, das schwarze die TIL dar. Die MFI der DGK ist als Zahlenwert in den Diagrammen angegeben. Die Abbildung zeigt beispielhaft 1 von 5 untersuchten Patienten.

6.7.8 Durchflusszytometrische Analyse der ERK-Phosphorylierung der kultivierten T- und NK-Zellen der TIL nach Stimulation

Wie bereits gezeigt wurde, konnte die funktionelle Aktivität der T- und NK-Zellen der TIL durch die Kultivierung für 48 Std. in niedrigdosiertem IL-2 Medium verbessert werden. Dadurch stellte sich die Frage, ob die Signalweiterleitung - also die Phosphorylierung der Signalproteine ERK und AKT - durch diese Art der Kultivierung auch verbessert wurde.

Die TIL wurden wie beschrieben in 50 U/ml IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die kultivierten TIL und als Kontrolle die nicht kultivierten TIL derselben Patienten mit PMA/I stimuliert. Danach wurden die Zellen mit phosphospezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der CD3⁺ bzw. der NK-Zellen wurde die MFI des phosphorylierten ERK-Proteins der jeweiligen Population bestimmt und in Abb. 6-45 dargestellt. Die Phosphorylierung des ERK-Proteins im unstimulierten Zustand, also die Grundphosphorylierung, war bei den Effektorzellen der kultivierten TIL höher als bei den unkultivierten (MW MFI: CD3⁺: unkultiviert 80, kultiviert 316; NK-Zellen: unkultiviert 187, kultiviert 654). Nach Stimulation war die MFI sowohl bei unkultivierten als auch bei kultivierten TIL höher als im unstimulierten Zustand, wobei im Mittelwert die der kultivierten CD3⁺ Zellen der TIL signifikant höher (MW MFI: 935) war, als die der unkultivierten (MW MFI: 348). Auch bei den NK-Zellen der TIL war die MFI des phosphorylierten ERK-Proteins im kultivierten Zustand nach Stimulation signifikant höher (MW MFI: 1608) als im unkultivierten (MW MFI: 419). Somit verbesserten sich die Signalweiterleitung und die damit einhergehende ERK-Phosphorylierung durch die IL-2-Kultivierung.

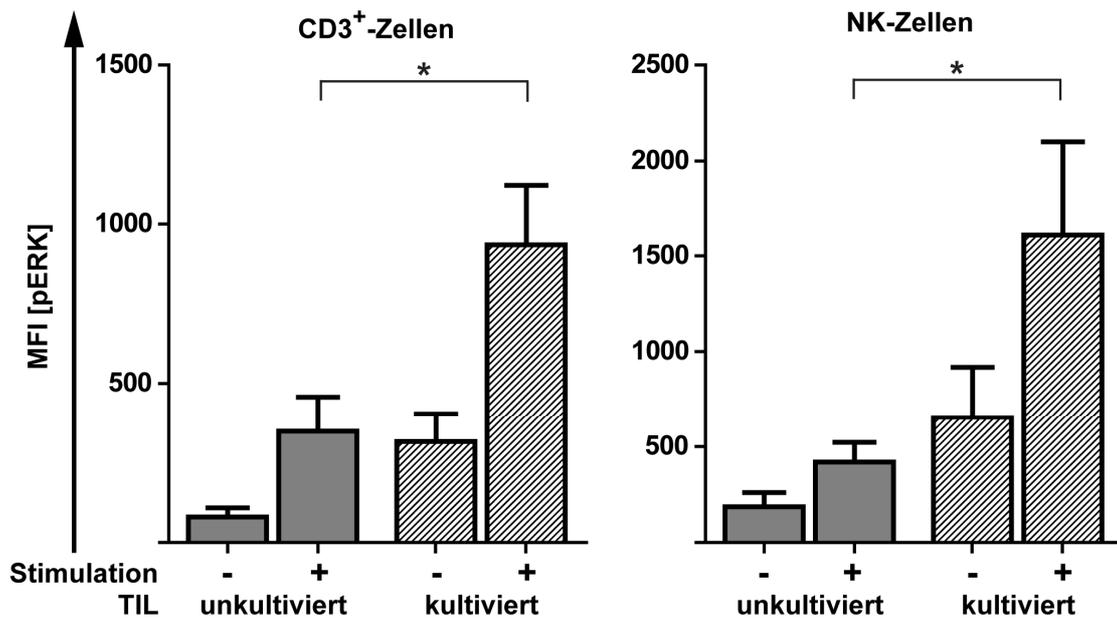


Abb. 6-45: Analyse der ERK-Phosphorylierung nach Stimulation bei unkultivierten und kultivierten TIL

TIL wurden wie beschrieben isoliert und für 48 Std. mit IL-2 kultiviert. Zur Bestimmung der ERK-Phosphorylierung wurden die Zellen für 8 Min. mit PMA/I stimuliert, fixiert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die CD3⁺ bzw. NK-Zellen ausgewählt und die MFI des phosphorylierten ERK-Proteins der jeweiligen Population ermittelt. Die y-Achse zeigt die MFI des phosphorylierten ERK-Proteins. Die Balken sind die Mittelwerte der untersuchten TIL verschiedener Patienten (unkultiviert n=6, kultiviert n=4), die Fehlerbalken sind die SEM. Die Stimulations- und Kultivierungsbedingungen sind unter dem Diagramm aufgeführt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* p<0.05).

6.7.9 Durchflusszytometrische Analyse der AKT-Phosphorylierung der kultivierten T- und NK-Zellen der TIL nach Stimulation

Die TIL wurden wie beschrieben in 50 U/ml IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die kultivierten TIL sowie als Kontrolle die nicht kultivierten TIL derselben Patienten mit PMA/Ionomycin stimuliert. Danach wurden die Zellen mit phosphospezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Auswahl der CD3⁺ bzw. der NK-Zellen wurde die MFI des phosphorylierten AKT-Proteins der jeweiligen Population bestimmt und in Abb. 6-46 dargestellt. Die Phosphorylierung des AKT-Proteins im unstimulierten Zustand, also die Grundphosphorylierung, war bei den Effektorzellen der kultivierten TIL etwa doppelt so hoch als bei den unkultivierten (CD3⁺: unkultiviert 102, kultiviert 199; NK-Zellen: unkultiviert 105, kultiviert 203). Nach Stimulation stieg die MFI bei unkultivierten CD3-Zellen der TIL nur wenig an (MW MFI: 151), während eine deutliche MFI-Zunahme bei den

kultivierten CD3⁺-Zellen der TIL (MW MFI: 348) auftrat. Die MFI des phosphorylierten AKT-Proteins nach Stimulation war bei kultivierten CD3-Zellen der TIL signifikant höher als bei unkultivierten. Auch bei den NK-Zellen der kultivierten TIL war die MFI des phosphorylierten AKT-Proteins nach Stimulation höher (MW MFI: 253) als in unkultivierten TIL (MW MFI: 146). Somit verbesserte sich die AKT-Phosphorylierung durch die IL-2-Kultivierung.

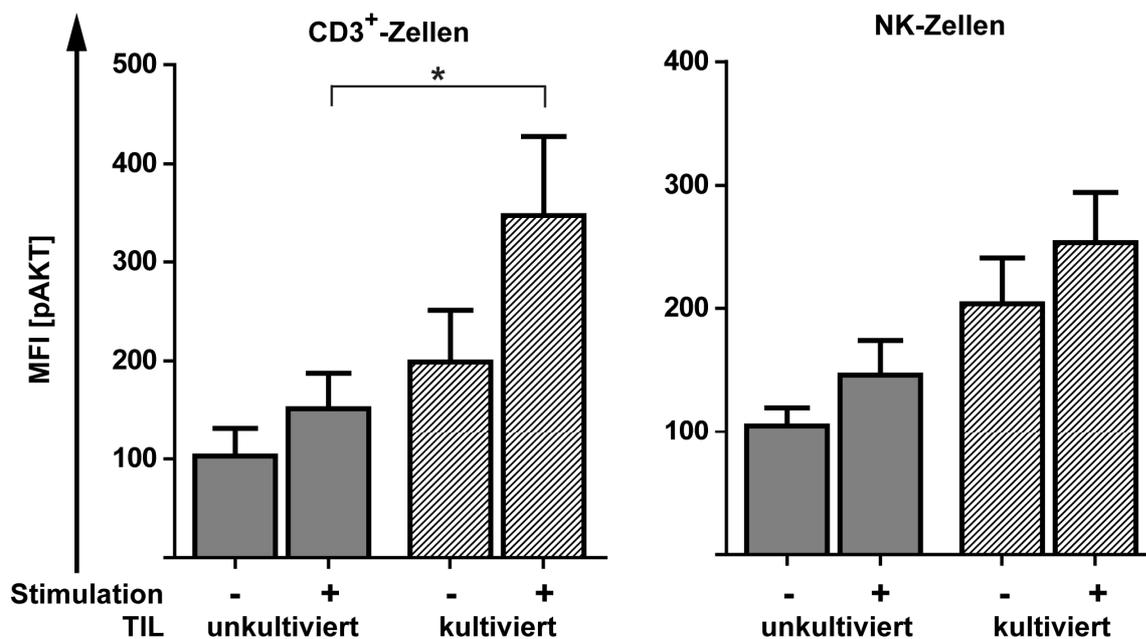


Abb. 6-46: Analyse der AKT-Phosphorylierung nach Stimulation bei kultivierten TIL

TIL wurden wie beschrieben isoliert und für 48 Std. mit IL-2 kultiviert. Zur Bestimmung der AKT-Phosphorylierung wurden die Zellen für 8 Min. mit PMA/I stimuliert, fixiert, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion in FlowJo® wurden die CD3⁺ bzw. NK-Zellen ausgewählt und die MFI des phosphorylierten AKT-Proteins der jeweiligen Population ermittelt. Die y-Achse zeigt die MFI des phosphorylierten AKT-Proteins. Die Balken sind die Mittelwerte der untersuchten TIL verschiedener Patienten (n=5), der Fehlerbalken sind die SEM. Die Stimulations- und Kultivierungsbedingungen sind unter dem Diagramm aufgeführt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn (* p<0.05).

6.7.10 Bestimmung der p27kip-Expression in den Effektorzellen unkultivierter und kultivierter TIL

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die IL-2-Kultivierung der TIL zu einer erhöhten AKT-Phosphorylierung in den CD3⁺ und NK-Zellen führte, wurde überprüft, ob die Unterschiede sich auf nachfolgende Proteine des Signalweges auswirken. Hierfür wurde p27kip untersucht, welches bei inaktiver AKT-Kinase hoch exprimiert sein sollte, wohingegen eine phosphorylierte, aktive AKT eine geringere p27kip-Expression zur Folge hätte. Wieder

wurden parallel die CD3⁺ und NK-Zellen der unkultivierten im Vergleich zu kultivierten TIL untersucht. Wie in Abb. 6-47 zu erkennen, war die MFI von p27kip der CD3⁺ und NK-Zellen bei den drei untersuchten TIL im unkultivierten Zustand deutlich höher, verglichen mit den Zellen nach der Kultivierung.

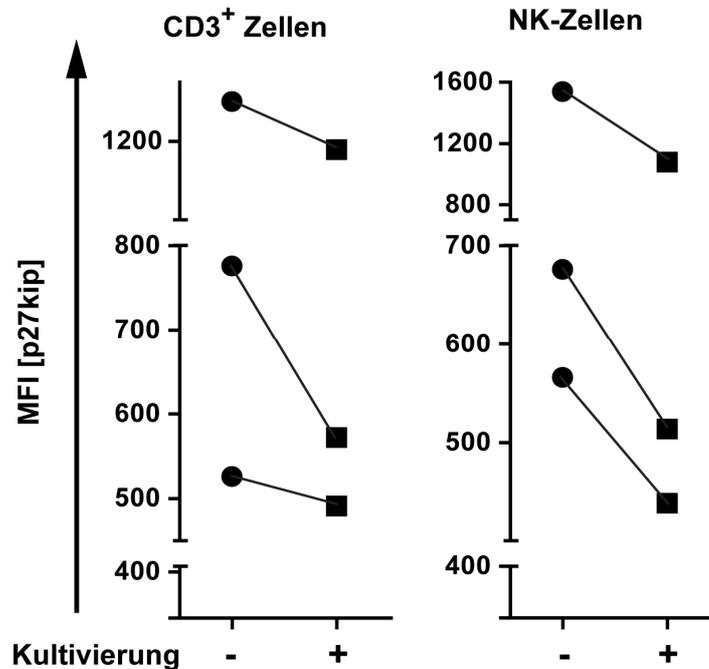


Abb. 6-47: Analyse der p27kip-Menge in CD3⁺ und NK-Zellen kultivierter TIL im Vergleich zu unkultivierten TIL

TIL wurden wie beschrieben isoliert und kultiviert. Zur Bestimmung der p27kip-Expression wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch graphische Selektion der CD3⁺- bzw. der NK-Zellen in FlowJo® wurde die MFI von p27kip bestimmt. Die y-Achse zeigt die MFI von p27kip. Jedes Symbol steht für einen untersuchten TIL, wobei die Kreise die unkultivierten und die Vierecke die kultivierten TIL darstellen. Die Werte eines Patienten vor und nach Kultivierung sind durch Linien verbunden. Die Effektorzellen sind über dem Diagramm aufgeführt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass sich der veränderte Phosphorylierungszustand der AKT-Kinase in den nachfolgenden Proteinen der Signalkaskade umsetzt. Da eine hohe p27kip-Expression mit Zellzyklusarrest assoziiert ist, könnte es sein, dass die Effektorzellen der TIL im Zellzyklus arretiert sind und durch IL-2-Kultivierung ein Eintritt in den Zellzyklus stattfindet. Um dies genauer zu untersuchen bedarf es der Analyse weiterer Moleküle des Zellzykluses wie z.B. Cyclin D und Cyclin E.

7 DISKUSSION

Das Nierenzellkarzinom stellt sich als ein immunologisches Dilemma dar, da es trotz des reichhaltigen Lymphozyteninfiltrats zu keiner Tumorabstoßung kommt. Unter den Lymphozyten befinden sich $CD8^+$ T- und NK-Zellen, die lytische Aktivität gegenüber Tumorzellen besitzen, aber nur dann wenn sie in vitro kultiviert werden (Schendel et al., 1997; Schleypen et al., 2006). Dieselben TZR, die in vitro Tumorreaktivität zeigten, konnten auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Jantzer et al., 1998). Offensichtlich sind Effektorzellen mit der prinzipiellen Fähigkeit für eine antitumorale Reaktion vorhanden, aber sie scheinen die Tumorzellen nicht abzustößen. Spontane Remissionen und das Ansprechen auf Immuntherapie deuten jedoch darauf hin, dass die unterdrückte Immunreaktion im Tumor überkommen werden kann (De Riese et al., 1991; Schendel et al., 1997). Um dies besser verstehen und eine therapeutische Konsequenz daraus ableiten zu können, ist es notwendig das Lymphozyteninfiltrat in seinen Eigenschaften genauer zu charakterisieren.

7.1 Gewebeproben

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit mehr als 70 % der häufigste Typ aller Nierentumore und als der immunsensitive Typ beschrieben. Jeder Nierenzellkarzinomsubtyp bietet ein spezifisches histologisches Bild, zeigt unterschiedliche genetische Alterationen, weist verschiedene klinische Verläufe auf und spricht unterschiedlich auf systemisch applizierte Therapeutika an. Für die Charakterisierung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) wurden daher ausschließlich Tumoren des klarzelligen Typs untersucht. Dadurch konnte sicher gestellt werden, dass Unterschiede zwischen den TIL-Populationen nicht auf Unterschiede zwischen den Tumortypen beruhen. So könnten TIL der verschiedenen Nierenzellkarzinomsubtypen unterschiedliche Eigenschaften besitzen, da die Chemoimmuntherapie nur bei einigen Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom zur Tumorkontrolle führt, jedoch bei anderen Nierenzellkarzinomsubtypen keine Effektivität zeigt (Steiner et al., 2006; Herrmann et al., 2007).

Zusätzlich zu den TIL wurden auch die NIL charakterisiert, welche aus Normalnierengewebe isoliert wurden. Es handelt sich hierbei um Gewebeproben aus dem nicht vom Tumor befallenen Bereich der tumortragenden Niere. Da das RCC von einer Kapsel umgeben ist, sind solche nicht-malignen Areale eindeutig auszuwählen. Histopathologisch zeigten sie auch keine Tumorbereiche. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass das

Tumorwachstum in der Niere Veränderungen im Normalgewebe bewirkt, die sich auf die Lymphozyteninfiltration auswirken. Beispielsweise könnte es durch das platzbeanspruchende Tumorwachstum zu Kompression und dadurch zu Entzündungen kommen. Bisher gibt es noch keine Veröffentlichungen über eine Charakterisierung von Lymphozyten aus Normalnierengewebe.

7.2 Ex-vivo-Untersuchung des Lymphozyteninfiltrats

7.2.1 Isolierung der TIL und NIL

Zur Isolierung der infiltrierenden Lymphozyten wurde ein bei Mausnieren angewandtes Protokoll adaptiert (Vielhauer et al., 2004). Dieses beinhaltet sowohl eine mechanischen Zerkleinerung der Tumor- bzw. Normalnierenstücke mit Skalpell und Schere, als auch einen daran anschließenden enzymatischen Verdau der Gewebestücke. Als Enzyme wurden Kollagenase und DNase verwendet. Kollagenasen spalten die Peptidbindung zwischen Prolin und anderen Aminosäuren und sind somit in der Lage Kollagenfasern abzubauen, die als Stützgewebe den Zusammenhalt von Zellen in Organen bewirken. Dadurch wird das Tumor- und Normalnierengewebe aufgelockert, sodass die Immunzellen leichter aus dem Gewebeverbund gewonnen werden können. Da die Zerkleinerung von Gewebe immer mit der Zerstörung und Lyse von einigen Zellen einhergeht, wird DNS aus diesen Zellen freigesetzt. Ein solcher DNS-Gehalt im Medium wurde als Ursache für das Verklumpen von Zellen während der Gewebsdisintegration beschrieben. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Desoxyribonuklease (DNase) zum Dissoziationsmedium verringert.

Um sicherzustellen, dass nur die TIL und NIL analysiert wurden, die die Blutbahn verlassen und in das Gewebe ausgewandert waren, wurden die Gewebestücke nach der Zerkleinerung mehrmals mit Puffer gewaschen. Die durch Auswaschen erhaltene Zellsuspension wurde als TZL (tumorzirkulierende Leukozyten) bezeichnet, weil es sich vermutlich um nicht ins Tumorgewebe ausgewanderte Zellen handelt. Sie zeigten in ersten Analysen andere Eigenschaften als die TIL. Sie reichten sich in ihren Merkmalen (z.B. höherer Anteil an Perforin- und Granzym B-positiven Zellen, sowie bessere Degranulation der TZL im Vergleich zu den Zellen der TIL) zwischen den peripheren Blutlymphozyten und den isolierten tumorinfiltrierenden Zellen ein.

Als TIL bzw. NIL wurden nur die Zellen verwendet, die nach dem enzymatischen Verdauschritt gewonnen wurden. Das Isolierungsprotokoll war zeitaufwändig; so dauerte

eine parallele Isolation von TIL und NIL ca. 4-6 Stunden. Da die Proben frühestens Mittag, meistens erst am Nachmittag aus dem Operationssaal abgeholt werden konnten, war es nicht möglich die Zellen direkt nach Isolation zu analysieren. Sie wurden kryokonserviert und am Tag des Versuches aufgetaut.

Die Zellausbeute der 16 im Rahmen dieser Arbeit aufgearbeiteten Tumoren bzw. Normalnieren war sehr unterschiedlich. Prinzipiell war die erhaltene Zellzahl aus den Normalnierengewebestücken um ein Vielfaches geringer als die aus den Tumorgewebestücken. Dies entspricht auch den Daten der immunhistochemischen bzw. Immunfluoreszenzanalyse der Gewebeschnitte der eigenen Arbeitsgruppe und den Literaturdaten (Heinemann et al., 1987; Tomita et al., 1991), die zeigten, dass das Normalnierengewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe sehr viel geringer von Immunzellen infiltriert ist. Auch die Zellausbeute der unterschiedlichen Tumorgewebestücke war variabel. Allerdings waren auch die erhaltenen Tumorproben nicht immer von gleicher Größe, wobei der Gewebebrei vor dem ersten Verdauungsschritt nach Zentrifugation meist eine Sedimentgröße von 3-5 ml aufwies. Auch das Tumorstadium beeinflusst die Zellausbeute, da gezeigt wurde, dass eine hohe Anzahl an TIL im Gewebe des Nierenzellkarzinoms mit einem weiter fortgeschrittenen Tumorstadium korrelierten (Yoshida et al., 1986; Nakano et al., 2001).

Um die durch das Tumormilieu ausgelösten Defekte zu erfassen, wurden für diese Arbeit TIL und NIL direkt nach der Isolierung aus dem Tumor kryokonserviert, um mögliche verändernde Einflüsse z.B. durch Kultivierung zu minimieren. In der Vergangenheit lag das Interesse vor allem in der Suche nach tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen, die möglicherweise für eine Immuntherapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom eingesetzt werden könnten oder für die Identifizierung tumorassoziierter Peptide nützlich sein würden. Einige solcher TIL wurden bereits beschrieben (Schendel et al., 1993; Schendel et al., 1997; Leisegang et al., 2010). Sie wurden jeweils durch eine Langzeitkultivierung verschiedener TIL-Populationen gewonnen (Koo et al., 1991; Finke et al., 1992; Schendel et al., 1993; Schendel et al., 1997). Dabei zeigte sich, dass sich sowohl die Populationen als auch die funktionellen Eigenschaften der TIL durch diese Langzeitkultivierung veränderten. Somit kann mit dieser Methode nicht mehr bestimmt werden, welche Eigenschaften die TIL in situ besaßen, also am Ort, an welchem Abstoßung stattfinden müsste. Im Rahmen dieser Arbeit wurden parallel zu unkultivierten TIL auch TIL untersucht, die für 48 Std. in niedrigdosiertem IL-2-Medium (50 U/ml) kultiviert worden waren. Dies sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die CD8⁺ T- und NK-Zellen der TIL in ihren Eigenschaften verändern, sobald sie dem Tumormilieu entnommen werden. Die verwendete IL-2 Menge wurde sehr niedrig ausgewählt, da Zellen nicht neu differenziert werden sollten, sondern lediglich die bereits differenzierten Effektorzellen unterstützt und möglicherweise aus ihrer funktionellen Paralyse erweckt werden sollten. Dies könnte neue

Erkenntnisse für Therapien bringen, bei denen isolierte TIL ex vivo behandelt und aktiviert werden, um sie dann dem Patienten zum Schutz vor Rückfällen und Metastasen zurückzuspritzen.

7.3 Die Leukozytensubpopulationen der TIL und NIL

Die Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen und die Interaktion zwischen verschiedenen Subtypen sind wichtig für einen optimalen Ablauf einer Immunantwort. NK-Zellen beeinflussen die adaptive Immunantwort durch die Interaktion mit dendritischen Zellen und können auch die Funktion der T-Zellen regulieren (Raulet, 2004). Ebenso ist die zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort und Gedächtnisantwort verringert oder nicht vorhanden, wenn es keine CD4⁺ T-Zell-vermittelte Hilfe gibt (Kalams et al., 1998; Sun et al., 2003). Da die Anteile der Subgruppen in verschiedenen Geweben und im Blut unterschiedlich sein können, unabhängig davon ob eine maligne Erkrankung vorliegt, wurden die TIL zusätzlich zu PBMZ auch zu NIL aus nichtmalignem Nierengewebe verglichen. Um die Prozentanteile der Lymphozytenpopulation vergleichen zu können wurden die B-Zellen in den PBL ausgeschlossen, da das RCC und Normalnierengewebe kaum B-Zellen (< 1 % CD19⁺ Zellen) enthalten und somit die prozentuale Zusammensetzung hinsichtlich T- und NK-Zellen nicht vergleichbar gewesen wäre. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an NK-Zellen im Median in den untersuchten TIL, NIL und PBMZ vergleichbar war. Der Anteil der NK-Zellen in TIL zeigte eine große Streuung, da es TIL mit fast gar keinen NK-Zellen gab (1 %) und solche mit fast 40 %. Auch der Anteil der T-Zellen war im Median in TIL, NIL und PBMZ gleich. Allerdings zeigte sich in der Zusammensetzung der T-Subgruppe bei den TIL ein verschobenes CD4⁺:CD8⁺ T-Zell-Verhältnis verglichen mit PBMZ und NIL. Für Blutlymphozyten sind unterschiedliche Werte - abhängig von Geschlecht und Alter - für das CD4⁺:CD8⁺ Verhältnis innerhalb der T-Zellen beschrieben. Der Median einer Analyse von 468 gesunden Blutspendern liegt bei 1,88 (Amadori et al., 1995). Die in dieser Arbeit untersuchten PBMZ gesunder Spender bzw. NIL lagen innerhalb der Spannweite dieser Analyse. Die TIL hingegen wiesen einen Wert von 0,9 auf, hatten also annähernd gleiche Anteile an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. In Abhängigkeit vom Tumorstadium und dem Differenzierungsgrad wurde von Igarashi et al. bei RCC-Patienten ein verändertes Infiltrationsmuster von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in TIL beobachtet. Tumoren in Stadium III/IV und Differenzierungsgrad III/IV zeigten in der Regel eine Zunahme der CD8⁺ T-Zellen assoziiert mit einer Abnahme von CD4⁺ T-Zellen, wobei die Prognose dieser Patienten als schlecht beurteilt wurde (Igarashi et al., 1992). Nach Nakano et al. (Nakano et al., 2001)

lässt sich der Umstand, dass mit der Entdifferenzierung eines Nierenzelltumors der Anteil an CD8⁺ Zellen unter den TIL ansteigt, mit der zunehmenden Antigenität der Tumorzellen bei steigender Tumordifferenzierung erklären. Die erhöhte Zahl an CD8⁺ TIL wird auch als Reaktion auf die zunehmende proliferative Potenz der Tumorzellen gewertet. Da sich dadurch aber die Überlebenszeit der Patienten nicht verbessert, sondern sogar negativ korreliert, erweist sich diese Immunreaktion im Hinblick auf eine erfolgreiche Tumorabwehr als ineffektiv. Eventuell sind nicht genügend CD4⁺ T-Zellen vorhanden, um eine ausreichende CD4⁺ T-Zell-Hilfe für eine optimale ZTL-Aktivität bereitzustellen (Kalams et al., 1998).

Myeloische Zellen sind neben den Effektorlymphozyten eine wichtige Subgruppe des Immunsystems. Sie sind in der Lage sowohl Immunaktivität als auch Toleranz zu vermitteln. Die Bestimmung des Anteils der myeloischen Zellen erfolgte anhand des CD14 Oberflächenmoleküls. CD14 wird im Blut von Monozyten und im Gewebe von Makrophagen exprimiert, jedoch nicht von klassischen dendritischen Zellen (DZ). Damit durch die Vorauswahl mit der Software FlowJo® myeloische Zellen auf Grund ihrer größeren und granulärereren Erscheinung nicht ausgeschlossen wurden, wurde das Auswahlfenster (FSC-SSC), anders als bei der Beurteilung der Lymphozyten, größer gewählt und der Anteil innerhalb aller lebenden CD45⁺ Zellen bestimmt. Im Median waren die CD14⁺ Zellen der TIL, NIL und PBMZ nicht unterschiedlich. Es gab jedoch 6 TIL, deren Anteil an CD14⁺ Zellen über dem Median lag (zwischen 25 % und 77 %). Wie weitere Analysen der Arbeitsgruppe, neben denen aus dieser Arbeit zeigten, sind die Mehrzahl der CD14⁺ Zellen im RCC auch CD209-positiv und stellen somit einen neuen, speziell im Tumormilieu differenzierten Phänotyp an myeloischen Zellen dar (Manuskript in Bearbeitung). Ebenso zeigte sich, dass Tumoren mit hohem CD209⁺ Zellgehalt selten TNM-Klassifikationen mit einem guten prognostischen Ausgang hatten. Daher wurde vor allem auch in dieser Arbeit der Einfluss dieser Zellen auf die zytotoxischen Effektorlymphozyten (ZTL und NK-Zellen) untersucht. Die diesbezüglich erhaltenen Ergebnisse werden später diskutiert.

7.4 Charakterisierung der T- und NK-Zellen in TIL und NIL

Wie bereits erwähnt, konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Degranulationstests gezeigt werden, dass direkt aus dem Tumor isolierte CD3⁺CD8⁺ und NK-Zellen eine sehr geringe Degranulationsaktivität aufweisen. Damit wurden die zuvor mit Hilfe des 4 Std. Chromfreisetzungstest erworbenen Daten (Schleypen et al., 2006), die einen Mangel an lytischer Aktivität gezeigt hatten, mit einem neuen Test, der direkt die Aktivität der

Effektorzellen abfragt, bestätigt. Der CD107-Mobilisierungstest ermöglicht direkt die funktionelle Kapazität bzw. funktioneller Inaktivierung der Effektorzellen abzufragen. Da die T-Zellen mit anti-CD3-Antikörpern, welche an die P815-Zelllinie gekoppelt waren, und NK-Zellen mit der MHC-Klasse-I-negativen Zelllinie K562 stimuliert wurden, kann eine funktionelle Inaktivität nicht durch eine suboptimale Stimulation erklärt werden. Beim Nachweise der Degranulationsfähigkeit wurde nicht mit PMA/Ionomycin stimuliert, um eine physiologische Stimulation nachzuahmen und auch Defekte, die direkt am TZR vorkommen können, nicht zu übersehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit, als auch weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Granulaexozytose in RCC-Gewebeschnitten, deuten darauf hin, dass die Lymphozyten im Tumorgewebe in einem funktionell inaktiven Zustand vorliegen. Die Effektorzellen der NIL dagegen zeigten im CD107-Oberflächenmobilisierungstest funktionelle Aktivität. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die funktionelle Inaktivität der TIL durch die Isolierungsmethode induziert wurde. Vielmehr scheint eine spezifische, durch das Tumormilieu bedingte Inaktivierung vorzuliegen. Eine mögliche funktionelle Inaktivität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten wurde bislang nur indirekt aus klinischen Beobachtungen abgeleitet, weil die Tumoren trotz einer hohen Anzahl an TIL nicht abgestoßen wurden. Durch die hier erhobenen Daten wurde somit die funktionelle Inaktivität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten direkt gezeigt. Desweiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die funktionelle Inaktivität isolierter TIL bereits durch eine zweitägige Aktivierung der TIL in niedrigdosiertem IL-2 aufgehoben werden kann; die Inaktivität der TIL ist demnach reversibel. In den hier untersuchten TIL war die funktionelle Aktivität nach der IL-2-Kultivierung bei den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL im Median auf das 6-fache und bei den NK-Zellen der TIL auf das 4-fache im Vergleich zu den unbehandelten, nativen Zellen angestiegen. Diese durch die IL-2-Kultivierung erworbene funktionelle Aktivität der NK-Zellen korrelierte mit dem Anteil der NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten von unbehandelten TIL. Schleyen et al zeigten (Schleyen et al., 2006), dass NK-Zellen von TIL, die einen NK-Anteil von über 20 % aufweisen, lytische Aktivität gegenüber MHC-Klasse-I negativen Tumorzellen nach In-vitro-Kultivierung aufwiesen. Eine bestätigende Korrelation ergab sich, indem der Anteil der degranulierenden NK-Zellen nach IL-2-Kultivierung mit dem Prozentsatz der NK-Zellen in unkultivierten TIL korrelierte. Somit sind NK-Zellen in TIL, die einen hohen Anteil an NK-Zellen besitzen, außerhalb des Tumormilieus besser reaktivierbar. Auch der Anteil Perforin-positiver Zellen innerhalb der NK-Zellen in TIL im unbehandelten Zustand korrelierte mit der Fähigkeit zur CD107-Mobilisierung nach IL-2-Kultivierung. Offensichtlich sind NK-Zellen mit einem hohen Anteil Perforin-positiver Zellen weniger durch das Tumormilieu inhibiert und können die funktionelle Aktivität daher besser wieder erlangen. Mit drei TIL wurde eine Kultivierung ohne IL-2 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass NK-Zellen kein IL-2 benötigten um die Fähigkeit zur Degranulation zu erlangen. Denkbar wäre, dass

inhibitorische Zellpopulationen verringert werden oder ganz verschwinden. So war im unkultivierten Zustand ein deutlich höherer Anteil an CD14⁺ Zellen in der Leukozytenpopulation der TIL enthalten als nach der IL-2-Kultivierung. Vermutlich adhärten die CD14⁺ Zellen am Plattenboden, wurden nicht mitgeerntet und waren daher bei der Funktionsabfrage nicht anwesend. Weitere Untersuchungen (gezieltes Entfernen von Subpopulationen) sind nötig, um diese Vermutungen zu konkretisieren.

Die CD3⁺CD8⁺ Zellen in TIL hingegen benötigten IL-2 um Degranulationsfähigkeit zu erlangen. Ihre Degranulationsfähigkeit blieb ohne IL-2 deutlich unter dem Anteil der mit IL-2-kultivierten TIL (Daten nicht gezeigt). IL-2 könnte somit eine direkte Rolle bei der Reversion von Degranulationsdefekten der CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL spielen, indem diese direkt durch IL-2 aktiviert werden. Auch eine indirekte Rolle ist denkbar, indem andere Zellpopulationen, wie die NK-Zellen aktiviert werden, welche dann wiederum die funktionelle Aktivität der T-Zellen fördern könnten.

Die funktionelle Konsequenz einer Degranulation ist die lytische Aktivität. Dazu müssen die lytischen Granula mit den Zytotoxinen Perforin und Granzym B gefüllt sein, da diese eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von Tumorzellen spielen und bei ihrer Abwesenheit Tumoren schneller wachsen (van den Broek et al., 1995; Smyth et al., 1999). Ein großer Anteil der CD8⁺ T- und NK-Zellen der TIL war Perforin- und Granzym B-negativ. Somit wäre, selbst wenn die Zellen degranulieren würden, eine Tumorabstoßung nicht zu erwarten. Allerdings sind auch ZTL aus Perforin-knockout-Mäusen beschrieben, die Tumoren in vivo abstoßen (Seki et al., 2002). Wir konnten aber innerhalb der Arbeitsgruppe mit Hilfe unserer In-vitro-Systeme zeigen, dass ZTL, die Perforin-negativ gemacht wurden, nicht lytisch sind. Dies konnte auch hier für die NK-Zellen bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass Perforin-reduzierte NK-Zellen unabhängig von der Granzym B-Expression Zielzellen nicht lysierten. Dies zeigt zu mindestens in vitro die Bedeutung des Perforins für die Bekämpfung von Tumorzellen.

Durch IL-2-Kultivierung konnten Perforin- und Granzym B-Defizite revertiert werden. Allerdings reichte eine bloße Kultivierung ohne IL-2 nicht aus, um die Perforin- und Granzym B-Expression in NK-Zellen der TIL zu induzieren. Die Expression von Perforin war in NK-Zellen nach der Kultivierung der TIL ohne IL-2 sogar niedriger als im Ausgangszustand und die Expression von Granzym B vergleichbar mit dem Ausgangszustand. Somit sind die NK-Zellen der TIL nach der Kultivierung ohne IL-2 zwar fähig zur Granulaexozytose aber vermutlich nicht lytisch. Dies soll in zukünftigen Experimenten getestet werden.

Auch bei den CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL blieb bei Kultivierung ohne IL-2 die deutliche Induktion der zytolytischen Proteine, wie sie bei der Kultivierung mit IL-2 beobachtet wurde, aus. Zwei der drei TIL zeigten doppelt so viele und ein TIL halb so viele Perforin-positive

CD3⁺CD8⁺ Zellen nach der Kultivierung ohne IL-2 im Vergleich zum Ausgangszustand. Die Granzym B Expression veränderte sich durch die Kultivierung ohne IL-2 nicht. Die Induktionen der zytolytischen Proteine in CD3⁺CD8⁺ Zellen der TIL benötigt IL-2 (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Mechanismus des Tumormilieus eine Tumorzellzerstörung durch NK-Zellen zu verhindern, ist die Abregulation aktivierender NK-Zellrezeptoren. Bei den hier untersuchten TIL zeigte sich eine stark verminderte Population NKp46-positiver NK-Zellen. NKp46 ist der bedeutendste zytotoxizitätsvermittelnde Rezeptor (Sivori et al., 1999) und wichtig für die Tumorzellerkennung. Ein beschriebener Mechanismus, der zum Verlust des NKp46-Rezeptors führen kann, ist der Abbau von Tryptophan zu L-Kynurenin durch 2,3-Dioxygenase (IDO). Durch eine hohe IDO-Aktivität im Tumor wird das Abbauprodukt L-Kynurenin angereichert, welches die Expression von NKp46 inhibiert und das darüber vermittelte Abtöten von Tumorzellen (Della Chiesa et al., 2006). RCC-Zellen können in vitro IDO exprimieren (Riesenberg et al., 2007).

NKG2D ist ein weiterer aktivierender NK-Rezeptor. Seine Expression wird durch Ligandbindung (MICA/B) abreguliert und führt zu inhibierten NK-Zellen. Lösliche MICA-Liganden werden vom RCC produziert und dies soll ein immuninhibitorischer Mechanismus des Nierenzellkarzinoms sein. (Groh et al., 2002; Holdenrieder et al., 2006). Allerdings war hier eine NKG2D-Abregulation bei den NK-Zellen in TIL nicht nachzuweisen.

ZTL und NK-Zellen zeigten erhöhte Expression des CD69-Rezeptors, welcher als früher Aktivierungsmarker gilt. Gleichzeitig waren sie aber funktionsinhibiert. Da CD69 in CD8⁺ T- und NK-Zellen der TIL aber nicht der NIL erhöht war, scheinen für die Induktion von CD69 tumorassoziierte Faktoren verantwortlich zu sein. Die erhöhte CD69-Expression könnte durch chronische Aktivierung im Tumormilieu bedingt sein und ein Zeichen von Erschöpfung darstellen. Dies ist auch in anderen Situationen beschrieben (Sancho et al., 2005).

7.5 Induktion des NK-TIL Phänotyps bei NK-Zellen gesunder Spender durch tumormilieuadaptierte In-Vitro-Kultur

In der vorliegenden Arbeit konnten einige Unterschiede zwischen NK-Zellen in TIL und NIL bzw. PBMZ aufgedeckt werden, die mit verringerter funktioneller Kapazität assoziiert sind. Analysen zum Mechanismus waren auf Grund geringer Zellzahlen mit TIL und NIL nicht möglich. Außerdem gibt es keinen Vergleichswert, wie die Zellen vor dem Einwandern ins

Tumormilieu ausgestattet waren. Wenn das Tumormilieu *in vitro* rekapituliert werden kann, dann könnten zu Grunde liegende Mechanismen aufgeklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *In-vitro*-Kokulturmmodelle etabliert und evaluiert. Es zeigte sich, dass eine hohe Tumorzellzahl, aber nicht eine niedrige, zum Verlust von Perforin und NKp46 führte. Die Bedeutung des Zell-Zell-Kontaktes, unabhängig von Tumorzellproduzierten Faktoren, zeigte sich durch die Verwendung einer hohen Anzahl an fixierten Tumorzellen, die hier ebenfalls den Verlust von Perforin und NKp46 induzieren konnten. Lösliche Tumormilieufaktoren allein hatten keinen Einfluss auf die Perforin- oder NKp46-Expression der NK-Zellen. Dies steht im Gegensatz zur Beobachtung bei T-Zellen, in welchen lösliche Faktoren zum Perforinverlust führten. Neben einer verminderten Markerexpression war auch die Degranulationsfähigkeit der NK-Zellen nach der Kultivierung mit einer hohen Tumorzellzahl deutlich reduziert. Lösliche Milieufaktoren hatten geringeren inhibitorischen Einfluss. Diesbezüglich waren die NK-Zellen mit den ZTL vergleichbar.

Mit Hilfe des Suspensionskultursystems mit hoher Tumorzellzahl konnten aus NK-Zellen gesunder Spender solche mit Defiziten in der NKp46-Expression, der Degranulationsfähigkeit und der lytischen Aktivität induziert werden. Als Ursache für die Induktion dieser Defekte wurde Zellkontakt identifiziert. Andere Eigenschaften der NK-Zellen der TIL, wie der niedrige Anteil an Granzym B- bzw. der hohe Anteil an CD69-positiven Zellen, wurde im *In-vitro*-Kokultivierungsmodell nicht beobachtet. Somit scheint die Kokultivierung mit einer hohen Tumorzellzahl nicht exakt den Gegebenheiten im Tumor zu entsprechen. Dennoch war dieses System sinnvoll, weil eine NK-Zellpopulation mit Defizienz in NKp46 und Perforin generiert werden konnte und somit die Bedeutung dieser Marker für die lytische Aktivität untersucht werden kann. Dies ist mit TIL-Proben schwierig, weil sie komplexe Zellpopulationen und verschiedene Anteile an NK-Zellen aufweisen. NK-Zellen, die mit einer hohen Tumorzellzahl kokultiviert wurden zeigten keine lytische Aktivität gegenüber K562. Lösliche Faktoren spielten eine untergeordnete Rolle, da auch fixierte Tumorzellen diese Defekte auslösten. Als Ursache für das Ausbleiben der lytischen Konsequenz ist primär die beobachtete Inhibition der Degranulation, da Degranulation für die Übertragung der lytischen Proteine in die Zielzelle nötig ist. Die Ursache für das Ausbleiben der Degranulation ist derzeit nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung könnte im Syntaxin 11 liegen, welches ein SNARE (engl.: soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) Protein ist und wichtig für die Fusion biologischer Membranen. Bryceson et al (Bryceson et al., 2007) zeigten, dass in NK-Zellen von Patienten mit FHL-4 (Familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose, Gendefekt im Syntaxin-11) die Degranulation blockiert ist. Ob im Tumormilieu Syntaxin-11-Protein abreguliert wird ist derzeit noch nicht untersucht.

Das *In-vitro*-Kokultivierungsmodell mit einer hohen Tumorzellzahl brachte defizitäre NK-Zellen hervor, die dem *In-situ*-Phänotyp der NK-Zellen in TIL mit reduziertem Anteil an

Perforin- und NKp46-positiven Zellen, sowie verringerter Degranulationsfähigkeit ähnlich waren. Jedoch fehlten Merkmale der NK-Zellen der TIL, wie der reduzierte Granzym B-Anteil oder die Induktion von CD69. In einem zweiten In-vitro-Modell wurden Tumorzellen als dreidimensionale „Mikrotumoren“ mit NK-Zellen kultiviert. Dies reflektiert die in vivo Situation in vielen Eigenschaften, wie Nährstoff-, Metabolit- und Sauerstoffgradienten (Friedrich et al., 2009). Die Inkubation gesunder Spender NK-Zellen mit RCC-Sphäroiden induzierte den identischen Phänotyp der NK-Zellen der TIL: So traten jetzt mit Verlust von Perforin und NKp46 auch die vorher nicht beobachtete Reduktion von Granzym B und Induktion von CD69 auf. Mit Hilfe des Sphäroidmodells können nun weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wie beispielsweise NK- und auch T-Zellen manipuliert werden müssen, damit sie dem Inhibitionsmechanismus des Tumormilieus widerstehen können. Ebenso könnte getestet werden, ob durch die Zugabe von Zytokinen oder anderen Stoffen zu der Sphäroidkultur die Effektorzellfunktion gestärkt und Tumorzellen abgetötet werden können.

7.6 Induktion von 2B4 und Verlust von SAP in NK-Zellen als ein Mechanismus der funktionellen Inhibition im Tumormilieu

Die Korrelationsanalysen der TIL-Daten ergaben eine inverse Beziehung zwischen dem Anteil 2B4-positiver NK-Zellen in TIL und dem Anteil CD107-positiver NK-Zellen. Je mehr 2B4-positive NK-Zellen in TIL vorhanden waren, desto schlechter war die Zielzell-induzierte Fähigkeit zur Degranulation. Es ist bekannt, dass der 2B4-Rezeptor eine duale Rolle hinsichtlich der Funktionalität der NK-Zellen besitzt (Chlewicki et al., 2008). Entscheidend dabei ist das Adaptermolekül SAP, welches bei Anwesenheit eine aktivierende und bei Abwesenheit eine inhibierende Signalkaskade einleitet (Parolini et al., 2000). In der humanen Dezidua wurden NK-Zellen beschrieben, deren Aktivität durch Quervernetzen des 2B4-Rezeptors inhibiert wurde. Neben der zytolytischen Aktivität wurde auch die IFN- γ -Produktion unterdrückt. Als Grund hierfür wurde die defizitäre Expression des SAP-Proteins in NK-Zellen nachgewiesen, wodurch die NK-Zellen der Dezidua durch CD48-positive Zellen inhibierbar wurden (Vacca et al., 2006). Nahezu alle NK-Zellen in TIL exprimierten den 2B4-Rezeptor. Die beobachtete inverse Korrelation zwischen dem Anteil 2B4-positiver NK-Zellen und deren Degranulationsfähigkeit, könnte durch das Fehlen des SAP-Moleküls bedingt sein. In den TIL konnte die SAP-Expression nicht gemessen werden, da eine Abgrenzung von positiver und negativer Fluoreszenz für SAP nicht eindeutig erkennbar war. Im In-vitro-System konnte aber gezeigt werden, dass sowohl durch die Suspensionskokultivierung mit einer hohen Tumorzellzahl, als auch durch die Migration ins Sphäroid, der 2B4 Rezeptor auf

den NK-Zellen hochreguliert wurde und SAP abnahm. Somit könnte der Verlust des SAP-Moleküls einen Mechanismus der tumorbedingten NK-Zell-Inhibition, ähnlich dem in der Dezidua, darstellen.

7.7 Tumormilieuinduzierte RCC- DZ zeigen keine inhibitorischen Effekte auf NK- und zytotoxische T-Zellen

Die RCC-DZ, welche von einer Kollegin aus der Arbeitsgruppe durch Färbungen von Gewebeschnitten als tumorresidente Leukozytenpopulation entdeckt worden war, konnten auch in der TIL-Population ex vivo mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp entsteht, wenn Monozyten in Sphäroide einwandern, also einem Tumormilieu ausgesetzt sind. Diese RCC-DZ waren im Gegensatz zu klassischen DZ CD48 positiv. Da DZ an der Balance zwischen Aktivität und Inhibition der Immunantwort beteiligt sind (Steinman, 2007), wurde vermutet, dass diese RCC-DZ eventuell die funktionellen Defizite der NK-Zellen und CD3⁺CD8⁺ in TIL mitverschulden würden. Literaturdaten zeigen, dass CD209⁺CD14⁺ Zellen in der Dezidua früher Schwangerschaften die NK-Zellpopulation negativ regulieren, um den allogenen Embryo zu schützen (Kammerer et al., 2003). In Analogie könnten ähnliche Zellen im Tumormilieu die Immunkompetenz verhindern und dadurch die Fortdauer des Tumors gestatten. Ergebnisse der In-vitro-Kokultivierung von RCC-DZ mit NK-Zellen erbrachte jedoch keine Evidenz, dass die RCC-DZ die funktionelle Aktivität der NK-Zellen beeinflussen. Bei Kokultivierung mit RCC-DZ und auch mit klassischen DZ sank zwar der Anteil Perforin- und NKp46-positiver NK-Zellen und der Anteil CD69-positiver NK-Zellen stieg (nur bei Kokultur mit RCC-DZ), aber es hatte keinen Einfluss auf die Zielzell-induzierte Degranulation oder lytische Aktivität der NK-Zellen. Präliminäre Untersuchungen in Tumorgewebe mittels Mehrfarbenfluoreszenzfärbung und Auswertung am Konfokalmikroskop deuten weiterhin darauf hin, dass Interaktionen zwischen NK-Zellen und CD209⁺ CD14⁺ DZ im Tumorgewebe selten sind, während Kontakte mit T-Zellen häufig vorkommen. In diesen Kontakten zeigten die T-Zellen allerdings keine verringerte CD3 ζ - und CD3 ϵ -Expression. Auch in der In-vitro-Kokultur induzierten die RCC-DZ keine Abregulation von CD3 ζ oder CD3 ϵ in ZTL. Ebenso induzierten sie weder Apoptose, noch inhibierten sie die Zytotoxizität oder die Zytokinproduktion von ZTL. RCC-DZ scheinen somit auch auf ZTL keine inhibitorischen Effekte auszuüben.

7.8 Defekte in der Phosphorylierung distaler Signalproteine in Effektorzellen der TIL

Es konnte nachgewiesen werden, dass die T- und NK-Effektorzellen der TIL bei Stimulation keine funktionelle Aktivität zeigten. Daher wurden Defekte in der Signalkaskade vermutet. Zum Nachweis der Phosphorylierung von Signalproteinen musste erst ein Protokoll für die Durchflusszytometrie etabliert werden. Ebenso musste die richtige Art und Dauer der Stimulation, um die Phosphorylierung der unterschiedlichen Proteine zu induzieren, ermittelt werden. Es wurden letztendlich Daten zur Phosphorylierung von LCK an Tyr505, ZAP70, PLC- γ 2, ERK und AKT generiert.

Literaturdaten ließen vermuten, dass die Phosphorylierung proximaler Signalmoleküle in Effektorzellen der TIL defekt sein könnte. So wurde in einer humanen Tumor-Impfstudie beobachtet, dass eine erhöhte LCK-Phosphorylierung des inhibitorischen Tyr505 für peptidspezifische, nichttumorreaktive CD8⁺ T-Zellen charakteristisch war (Beyer et al., 2009). Andere Daten in Mausmodellen zeigten, dass CD8⁺ tumorinfiltrierende T-Zellen im proximalen T-Zellrezeptorsignal gestört sind (Monu et al., 2007). Im Gegensatz dazu wiesen die in dieser Arbeit untersuchten NK- und CD3⁺ Zellen der TIL keine Phosphorylierungsdefizite in den proximalen Signalmolekülen wie LCK, ZAP70 und PLC- γ 2 auf. Dagegen zeigten beide Effektorzellgruppen der TIL nach Stimulation eine reduzierte ERK- und AKT-Phosphorylierung. Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte ERK-Phosphorylierung nicht auf einer reduzierten Proteinexpression beruht, da TIL und Kontrollen gleich viel ERK-Protein aufzeigten. Für die T- und NK-Zell-Effektorfunktionen - Degranulation und Zytokinproduktion - stellen ERK und AKT wichtige Signalmoleküle dar (Berg et al., 1998; Jiang et al., 2000). Eine schematische Darstellung des Signalweges und der beobachteten Phosphorylierungsereignisse in TIL ist in Abb. 7-1 zusammengefaßt.

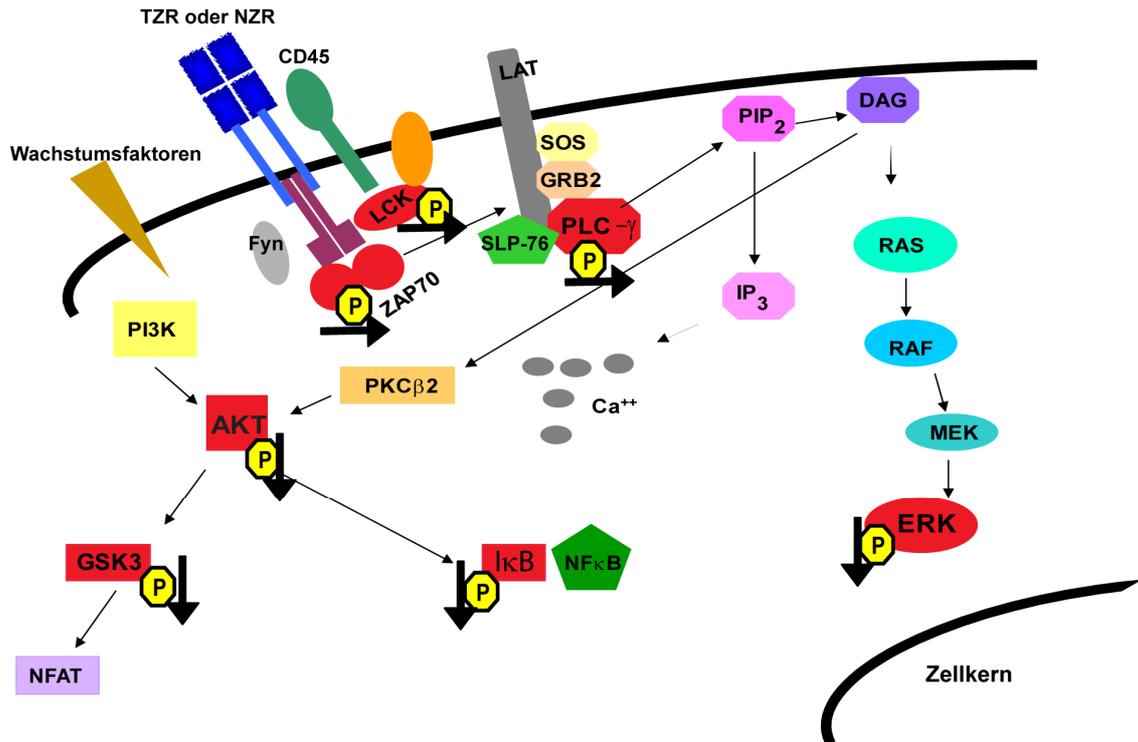


Abb. 7-1: Unterschiede in der stimulationsinduzierten Phosphorylierung einiger Signalproteine in TIL im Vergleich zu PBMZ und NIL

Gezeigt sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Signalproteine (rot) sowie der Einfluss des Tumormilieus auf die Phosphorylierung dieser Proteine (schwarze Pfeile). Die Phosphorylierung nach Stimulation von LCK, ZAP70 und PLC- γ 2 war in den Effektorzellen der TIL vergleichbar mit den Zellen der NIL und PBMZ (horizontale Pfeile), jedoch die von ERK, AKT, GSK3 und I κ B war reduziert (senkrechter Pfeil nach unten).

Ein Zusammenhang zwischen ERK- und AKT-Phosphorylierung und der funktionellen Aktivität wurde auch durch die Analyse der IL-2-kultivierten TIL bestärkt. Die durch die IL-2-Kultivierung verbesserte Degranulation und IFN- γ -Produktion der CD3⁺ und NK-Zellen in TIL ging einher mit einer stärkeren Phosphorylierung von ERK und AKT. Dies deutet darauf hin, dass die durch das Tumormilieu induzierte Blockade in der ERK- und AKT-Phosphorylierung reversibel war.

Durch eine aktive AKT-Kinase werden nachfolgende Proteine, wie beispielsweise die Foxo Transkriptionsfaktoren, phosphoryliert und somit unterdrückt. Ein Zielgen dieser Transkriptionsfaktoren ist das Zellzyklusprotein p27kip. Eine hohe p27kip Proteinexpression führt zum Zellzyklusarrest, da es ein Zellzyklus regulatorischer mitotischer Inhibitor der CDK-Aktivität ist. Die beobachtete hohe Expression in TIL könnte bedeuten, dass die TIL im Tumormilieu im Zellzyklus arretiert sind. Hier wurde gezeigt, dass durch IL-2-Kultivierung die konstitutive AKT-Phosphorylierung höher lag und die p27kip-Expression reduziert war als in

unkultivierten TIL. Ob mit der Reduktion von p27kip ein Eintritt der TIL in den Zellzyklus einhergeht, soll durch Analyse weiterer Zellzyklusproteine wie Cyclin D und Cyclin E untersucht werden.

Die reduzierte ERK-Phosphorylierung in TIL konnte auch durch eine weitere Methode, nämlich durch das Multiplex-Verfahren (Phosphoplex-Bestimmung), bestätigt werden.

Ferner brachte diese Methode hervor, dass auch Signalmoleküle, wie GSK3 und I κ B, die von einer aktiven AKT-Kinase phosphoryliert werden würden, bedingt durch das Ausbleiben der AKT-Phosphorylierung im Tumormilieu, ebenfalls nicht phosphoryliert wurden. Das Ausbleiben der Phosphorylierung von I κ B im Tumormilieu hat zur Folge, dass I κ B nicht abgebaut wird und NF κ B im Zytoplasma zurück gehalten wird. Dies führt dazu, dass es seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor für Gene der Proliferation und Zytokinproduktion nicht erfüllen kann. GSK3 wird durch die AKT-vermittelte Phosphorylierung inhibiert. Bleibt die AKT-Phosphorylierung im Tumormilieu aus, ist dort GSK3 aktiv und phosphoryliert NFAT, was zum Rücktransport ins Zytoplasma führt, sodass es im Zellkern keine Gene für Zytokine wie IL-2 anschalten kann. Diese Vorgänge und die nachgewiesenen Veränderungen in TIL und Konsequenzen sind in Abb. 7-2 zusammengefasst.

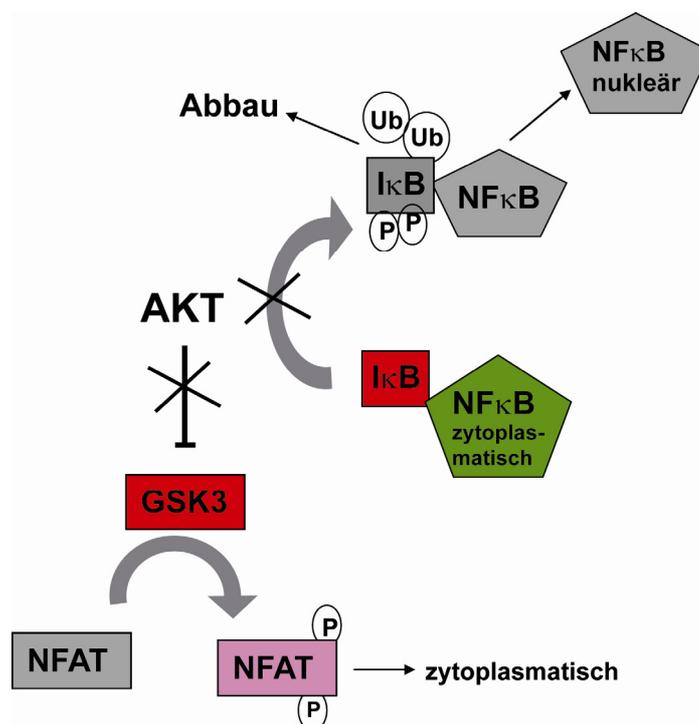


Abb. 7-2: Mögliche Auswirkungen der reduzierten AKT-Phosphorylierung in den Effektorzellen der TIL auf nachfolgende Signalproteine

NF κ B liegt an I κ B gebunden zytoplasmatisch vor. Da I κ B durch die inaktive AKT nicht phosphoryliert wird, wird I κ B nicht ubiquitinyliert und nicht degradiert. Somit kann NF κ B nicht in den Zellkern wandern. Ebenso wird GSK3 nicht durch die inaktive AKT phosphoryliert und gehemmt, sondern ist aktiv und phosphoryliert NFAT, welches dadurch zytoplasmatisch vorliegt, da es nicht in den Zellkern migrieren kann.

Die nachgewiesenen, durch das Tumormilieu induzierten, Defekte in den Signalmolekülen ERK und AKT können den Verlust der Effektorfunktionen erklären und nehmen Einfluss auf Proliferation und Überleben der NK- und T-Zellen in TIL. Da proximale Schritte bis zur PLC- γ offensichtlich in TIL normal induziert wurden, wird vermutet, dass sich eine Blockade zwischen PLC- γ und den späten Signalmolekülen ERK bzw. AKT befinden muss. In dieser Position befindet sich unter anderem Diazylglyzerol (DAG). In der Literatur wurde beschrieben, dass durch Diazylglyzerolkinase (DGK) DAG zu Phosphatidylsäure (PA) abgebaut wird und Anergie in CD4⁺ T-Zellen induziert wurde (Zha et al., 2006). Ein Abbau von DAG würde die Signalweiterleitung unterbrechen und sich in einer reduzierten ERK- und AKT-Phosphorylierung ausdrücken. Hier konnte gezeigt werden, dass durch den pharmakologischen Inhibitor der DGK (DGK-I) der Verlust der Degranulationsfähigkeit der CD3⁺ und NK-Zellen im In-vitro-Kokultivierungsmodell verhindert werden konnte. Zusätzlich war in Anwesenheit des DGK-Inhibitors die Zielzell-induzierte Fähigkeit zur Degranulation in funktionell defizienten T- und NK-Zellen der TIL verbessert. Es konnte auch gezeigt werden, dass sowohl T- als auch NK-Zellen der TIL mehr DGK besaßen als die Zellen der NIL. Somit könnte eine überexprimierte DGK und die damit einhergehende Reduktion verfügbaren DAGs ein Inhibierungsmechanismus in den Effektorzellen der TIL sein. Eine DGK-Inhibition bei Tumorpatienten, eventuell auch in Kombination mit adoptivem Zelltransfer, könnte die TIL funktionell reaktivieren und zum Funktionserhalt adoptiv transferierter Zellen beitragen.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
CD	engl.:cluster of differentiation
CML	engl.:cell mediated lysis
Cy5	Cyanin 5
DAG	Diazylglyzerol
DGK	Diazylglyzerolkinase
DGK-I	Diazylglyzerolkinaseinhibitor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	engl.: forward scatter (Vorwärtsstreuung)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GSK3	Glykogen Synthase Kinase-3
Gy	Gray
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HS	Humanserum
IL	Interleukin
IFN- α	Interferon-alpha
ITAM	Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
ITIM	Tyrosin-basiertes Inhibitionsmotiv
I κ B	Inhibitor von NF κ B
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
MACS	engl.: magnet activated cell sorting
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MFI	mittlere/mediane Fluoreszenzintensität
Min.	Minute

NF κ B	nukleärer Faktor kappa B
NIL	normalniereninfiltrierende Lymphozyten
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PB	Pacific Blue
PBL	engl.: peripheral blood lymphocytes (Lymphozyten des peripheren Blutes)
PBMZ	engl.: peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	engl.: phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Acetat
RCC	engl.: renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom)
rpm	engl.: rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI 1640	engl.: Roesewell Park Memorial Institute Medium 1640
SEM	engl.: standard error of the mean
Ser	Serin
Std.	Stunde
Thr	Threonin
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
Tyr	Tyrosin
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Amadori, A., R. Zamarchi, et al. (1995). "Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans." Nat Med **1**(12): 1279-83.
- Arnon, T. I., H. Achdout, et al. (2004). "The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46." Blood **103**(2): 664-72.
- Atzpodien, J., A. Korfer, et al. (1990). "Home therapy with recombinant interleukin-2 and interferon-alpha 2b in advanced human malignancies." Lancet **335**(8704): 1509-12.
- Balkwill, F., K. A. Charles, et al. (2005). "Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease." Cancer Cell **7**(3): 211-7.
- Barry, M. and R. C. Bleackley (2002). "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." Nat Rev Immunol **2**(6): 401-9.
- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.
- Berg, N. N., L. G. Puente, et al. (1998). "Sustained TCR signaling is required for mitogen-activated protein kinase activation and degranulation by cytotoxic T lymphocytes." J Immunol **161**(6): 2919-24.
- Beyer, M., J. Karbach, et al. (2009). "Cancer vaccine enhanced, non-tumor-reactive CD8(+) T cells exhibit a distinct molecular program associated with "division arrest anergy"." Cancer Res **69**(10): 4346-54.
- Billadeau, D. D., J. L. Upshaw, et al. (2003). "NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway." Nat Immunol **4**(6): 557-64.
- Bloushtain, N., U. Qimron, et al. (2004). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46." J Immunol **173**(4): 2392-401.
- Bossi, G. and G. M. Griffiths (2005). "CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle." Semin Immunol **17**(1): 87-94.
- Brown, M. H., K. Boles, et al. (1998). "2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48." J Exp Med **188**(11): 2083-90.

- Bryceson, Y. T., M. E. March, et al. (2005). "Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells." J Exp Med **202**(7): 1001-12.
- Bryceson, Y. T., E. Rudd, et al. (2007). "Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients." Blood **110**(6): 1906-15.
- Cerwenka, A., J. L. Baron, et al. (2001). "Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11521-6.
- Cerwenka, A. and L. L. Lanier (2003). "NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer." Tissue Antigens **61**(5): 335-43.
- Chattopadhyay, P. K., M. R. Betts, et al. (2009). "The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression." J Leukoc Biol **85**(1): 88-97.
- Chen, R., F. Relouzat, et al. (2004). "Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors." Mol Cell Biol **24**(12): 5144-56.
- Chlewicki, L. K., C. A. Velikovsky, et al. (2008). "Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244)." J Immunol **180**(12): 8159-67.
- Chow, L. Q. and S. G. Eckhardt (2007). "Sunitinib: from rational design to clinical efficacy." J Clin Oncol **25**(7): 884-96.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-40.
- De Riese, W., K. Goldenberg, et al. (1991). "Spontaneous regression of metastatic renal carcinoma with long-term survival." Br J Urol **68**(1): 98-100.
- Della Chiesa, M., S. Carlomagno, et al. (2006). "The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function." Blood **108**(13): 4118-25.
- Eissmann, P., L. Beauchamp, et al. (2005). "Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244)." Blood **105**(12): 4722-9.
- Fauriat, C., E. O. Long, et al. (2009). "Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition." Blood **115**(11): 2167-76.

- Finke, J. H., P. Rayman, et al. (1992). "Characterization of a human renal cell carcinoma specific cytotoxic CD8+ T cell line." J Immunother (1991) **11**(1): 1-11.
- Fishman, M. and S. Antonia (2003). "Novel therapies for renal cell carcinoma--an update." Expert Opin Investig Drugs **12**(4): 593-609.
- Frey, M., N. B. Packianathan, et al. (1998). "Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets." J Immunol **161**(1): 400-8.
- Friedrich, J., C. Seidel, et al. (2009). "Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach." Nat Protoc **4**(3): 309-24.
- Froelich, C. J., K. Orth, et al. (1996). "New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis." J Biol Chem **271**(46): 29073-9.
- Gasser, S., S. Orsulic, et al. (2005). "The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor." Nature **436**(7054): 1186-90.
- Gastl, G., T. Ebert, et al. (1996). "Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma." J Urol **155**(1): 361-7.
- Groh, V., J. Wu, et al. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-8.
- Heinemann, D., P. J. Smith, et al. (1987). "Expression of histocompatibility antigens and characterisation of mononuclear cell infiltrates in human renal cell carcinomas." Br J Cancer **56**(4): 433-7.
- Herrmann, E., O. Brinkmann, et al. (2007). "Treatment of metastatic papillary renal cell carcinoma with immunochemotherapy with interleukin 2, interferon-alpha and 5-fluorouracil." J Clin Oncol **25**(abstract 15644).
- Holdenrieder, S., P. Stieber, et al. (2006). "Soluble MICA in malignant diseases." Int J Cancer **118**(3): 684-7.
- Igarashi, T., S. Murakami, et al. (1992). "Changes on distribution of CD4+/CD45RA- and CD8+/CD11- cells in tumor-infiltrating lymphocytes of renal cell carcinoma associated with tumor progression." Eur Urol **22**(4): 323-8.
- Jacobs, R., G. Hintzen, et al. (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." Eur J Immunol **31**(10): 3121-7.

- Jacobs, R., M. Stoll, et al. (1992). "CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation." Blood **79**(12): 3239-44.
- Janeway, C. and P. Treavers (2008). "Immunobiology." Taylor&Francis.
- Jantzer, P. and D. J. Schendel (1998). "Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo." Cancer Res **58**(14): 3078-86.
- Jiang, K., B. Zhong, et al. (2000). "Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells." Nat Immunol **1**(5): 419-25.
- Kalams, S. A. and B. D. Walker (1998). "The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses." J Exp Med **188**(12): 2199-204.
- Kammerer, U., A. O. Eggert, et al. (2003). "Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy." Am J Pathol **162**(3): 887-96.
- Koo, A. S., C. L. Tso, et al. (1991). "Autologous tumor-specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma." J Immunother (1991) **10**(5): 347-54.
- Krahenbuhl, O. and J. Tschopp (1991). "Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation." Immunol Today **12**(11): 399-402; discussion 403.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 359-93.
- Lanier, L. L., A. M. Le, et al. (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." J Immunol **136**(12): 4480-6.
- Leisegang, M., A. Turqueti-Neves, et al. (2010). "T-cell receptor gene-modified T cells with shared renal cell carcinoma specificity for adoptive T-cell therapy." Clin Cancer Res **16**(8): 2333-43.
- Lieberman, J. (2003). "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." Nat Rev Immunol **3**(5): 361-70.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.
- Lopez Hanninen, E., H. Kirchner, et al. (1996). "Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients." J Urol **155**(1): 19-25.

- Mandelboim, O., N. Lieberman, et al. (2001). "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells." Nature **409**(6823): 1055-60.
- Marincola, F. M., E. Wang, et al. (2003). "Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy." Trends Immunol **24**(6): 335-42.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-5.
- Metkar, S. S., B. Wang, et al. (2002). "Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation." Immunity **16**(3): 417-28.
- Monu, N. and A. B. Frey (2007). "Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells." Cancer Res **67**(23): 11447-54.
- Moretta, A., R. Biassoni, et al. (2000). "Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells." Semin Immunol **12**(2): 129-38.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **19**: 197-223.
- Moretta, L., R. Biassoni, et al. (2002). "Human NK cells and their receptors." Microbes Infect **4**(15): 1539-44.
- Moretta, L., G. Ferlazzo, et al. (2006). "Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions." Immunol Rev **214**: 219-28.
- Nagaraj, S., M. Collazo, et al. (2009). "Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease." Cancer Res **69**(19): 7503-6.
- Nagaraj, S. and D. I. Gabrilovich (2008). "Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **68**(8): 2561-3.
- Nakano, O., M. Sato, et al. (2001). "Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity." Cancer Res **61**(13): 5132-6.
- O'Shea, J. J., A. Ma, et al. (2002). "Cytokines and autoimmunity." Nat Rev Immunol **2**(1): 37-45.

- Oberneder, R., H. Wagner, et al. (2003). "Nierenzellkarzinom. Manual Urogenitale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Thearapie und Nachsorge." Zuckschwedt Verlag, München.
- Orange, J. S. and Z. K. Ballas (2006). "Natural killer cells in human health and disease." Clin Immunol **118**(1): 1-10.
- Otsuji, M., Y. Kimura, et al. (1996). "Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13119-24.
- Parolini, S., C. Bottino, et al. (2000). "X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells." J Exp Med **192**(3): 337-46.
- Perussia, B. (1998). "Fc receptors on natural killer cells." Curr Top Microbiol Immunol **230**: 63-88.
- Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." Nat Rev Immunol **3**(10): 781-90.
- Raulet, D. H. (2004). "Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response." Nat Immunol **5**(10): 996-1002.
- Raulet, D. H. and R. E. Vance (2006). "Self-tolerance of natural killer cells." Nat Rev Immunol **6**(7): 520-31.
- Riesenberg, R., C. Weiler, et al. (2007). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(23): 6993-7002.
- Rini, B. I. (2007). "Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions." Clin Cancer Res **13**(4): 1098-106.
- Robertson, M. J. (2002). "Role of chemokines in the biology of natural killer cells." J Leukoc Biol **71**(2): 173-83.
- Rock, K. L., I. A. York, et al. (2002). "Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides." Adv Immunol **80**: 1-70.
- Rosenberg, S. A., P. Spiess, et al. (1986). "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes." Science **233**(4770): 1318-21.

- Sancho, D., M. Gomez, et al. (2005). "CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation." Trends Immunol **26**(3): 136-40.
- Schendel, D. J., B. Gansbacher, et al. (1993). "Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines." J Immunol **151**(8): 4209-20.
- Schendel, D. J., R. Oberneder, et al. (1997). "Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy." J Mol Med **75**(6): 400-13.
- Schleypen, J. S., N. Baur, et al. (2006). "Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(3 Pt 1): 718-25.
- Seki, N., A. D. Brooks, et al. (2002). "Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin." J Immunol **168**(7): 3484-92.
- Shi, L., C. M. Kam, et al. (1992). "Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions." J Exp Med **176**(6): 1521-9.
- Sivori, S., S. Parolini, et al. (2000). "Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines." J Neuroimmunol **107**(2): 220-5.
- Sivori, S., D. Pende, et al. (1999). "NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells." Eur J Immunol **29**(5): 1656-66.
- Skrablin, P. (2007). "Tumormilieu-induzierte Inaktivierung zytotoxischer Lymphozyten." Helmholtz Zentrum München: Dissertation
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (1999). "Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis." J Immunol **162**(11): 6658-62.
- Speiser, D. E., M. Colonna, et al. (2001). "The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector alpha beta T cells." J Immunol **167**(11): 6165-70.
- Stark, S. and C. Watzl (2006). "2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells." Int Immunol **18**(2): 241-7.

- Steiner, T., J. Rooigas, et al. (2006). "Clinical course of patients with metastatic papillary renal cell carcinoma." J Clin Oncol **24**(abstract 14591).
- Steinman, R. M. (2007). "Dendritic cells: understanding immunogenicity." Eur J Immunol **37 Suppl 1**: S53-60.
- Sun, J. C. and M. J. Bevan (2003). "Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help." Science **300**(5617): 339-42.
- Thurnher, M., C. Radmayr, et al. (1996). "Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells." Int J Cancer **68**(1): 1-7.
- Tomita, Y., T. Nishiyama, et al. (1991). "Characterization of tumor-infiltrating mononuclear cells in renal cell cancer: quantitative analysis by immunoperoxidase staining." Urol Int **47**(1): 1-6.
- Trapani, J. A. (2001). "Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases." Genome Biol **2**(12): reviews 3014.1-3014.7.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.
- Vacca, P., G. Pietra, et al. (2006). "Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function." Blood **108**(13): 4078-85.
- van den Broek, M. F., D. Kagi, et al. (1995). "Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo." Eur J Immunol **25**(12): 3514-6.
- Van den Hove, L. E., S. W. Van Gool, et al. (1997). "Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma." Clin Exp Immunol **109**(3): 501-9.
- Veillette, A. (2006). "Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors." Nat Rev Immunol **6**(1): 56-66.
- Vielhauer, V., V. Eis, et al. (2004). "Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice." Kidney Blood Press Res **27**(4): 226-38.
- Walzer, T., M. Dalod, et al. (2005). "Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses." Expert Opin Biol Ther **5 Suppl 1**: S49-59.
- Wong, M. K. (2008). "The current role of immunotherapy for renal cell carcinoma in the era of targeted therapeutics." Curr Oncol Rep **10**(3): 259-63.

- Yamaguchi, H. and W. A. Hendrickson (1996). "Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation." Nature **384**(6608): 484-9.
- Yoshida, S. O., A. Imam, et al. (1986). "Proximal renal tubular surface membrane antigens identified in primary and metastatic renal cell carcinomas." Arch Pathol Lab Med **110**(9): 825-32.
- Zha, Y., R. Marks, et al. (2006). "T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha." Nat Immunol **7**(11): 1166-73.

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt allen, die mir während meiner Doktorarbeit zur Seite standen und mich so unterstützt haben!

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. Elfriede Nößner. Sie ermöglichte mir die Anfertigung der Doktorarbeit an diesem interessanten und spannenden Projekt. Sie hatte stets ein offenes Ohr und zeigte großes Verständnis. In schwierigen Phasen während der Doktorarbeitszeit konnte sie mich immer motivieren. Durch ihr beeindruckendes fachliches Wissen und die wissenschaftlichen Diskussionen hat sie mich in meiner Arbeit stets voran gebracht. Große Unterstützung erhielt ich beim Zusammenschreiben meiner Arbeit. Hier nahm sie sich enorm viel Zeit – was nicht selbstverständlich war.

Ich danke Frau Prof. Weiß ganz herzlich für die Vertretung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der LMU München und für ihre wertvollen und nützlichen Hinweise.

Bei Fr. Prof. Schendel möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit am Institut für Molekulare Immunologie anfertigen durfte.

Ein großer Dank geht an Petra Skrablin, Judith Hosse und Ainhoa Figel, die mich eingearbeitet haben, mir das Facsen und das Mikroskopieren beibrachten und mir somit den Start ins Doktoranden-Dasein erleichtert haben. Gerade von Judiths Erfahrungen und enormen Wissen konnte ich immer profitieren.

Anna Brandl danke ich für die große Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft bei vielen Versuchen, Fragen und Problemen. Sie hatte immer ein offenes Ohr und wusste auch meist einen guten Rat. Danke auch für das schnelle und verlässliche Bestellen wenn wir mal wieder zu spät dran waren.

Ebenso danke ich Markus Schmid, für das Teilen seiner Tumorproben und die daraus entstandenen fachlichen Diskussionen.

Ein riesen Dankeschön geht an Josef Mysliwietz für Antikörper, Tipps und Anregungen, Hilfe bei Kompensations- und anderen Auswerteproblemen und einfach für die netten Gespräche.

Ich bin sehr dankbar, dass ich meine Doktorarbeit mit so wunderbaren Menschen verbringen durfte, die mich aufbauten wenn es mal nicht so gut lief (sei es auf Grund von Versuchen oder privaten Sorgen), die mit mir lachten und die besten Schokopausen machten, die mit mir über Färbekombinationen und Gatingstrategien diskutierten, meine Zellen splitteten wenn's mal wieder hektisch war, komplizierte Rechnungen austüfelten, meine Arbeit korrekturlasen und noch so unendlich viel mehr, dass ich das hier nicht ausführen kann.

Anna, Judith, Doro, Adri, Ulli, Maja und Luise vielen Dank. Ich bin sicher, einige von Euch werden mich als Freunde noch lange Zeit begleiten!

Natürlich danke ich auch allen anderen Leuten aus unserem Labor. Sie haben zu der guten Stimmung beitragen und waren immer sehr hilfsbereit. Bin, Ilias, Ramona, Michi, Melli. Danke! Ebenso danke ich vielen weiteren Diplomanden, Praktikanten, Bacheloranden und Masteranden, die im Laufe meiner Doktorarbeit unserer Labor durchlaufen haben.

Bei Sylvia Donhauser und Allen Nasaka möchte ich mich für ihre Hilfe bei sämtlichen administrativen Fragen bedanken.

Ein besonderer Dank geht an alle Kollegen im IMI durch die das Institut ein so gutes Arbeitsklima hat. Hilfsbereitschaft und Unterstützung wird hier ganz groß geschrieben.

Besonders möchte ich noch die Lunch-Clubber hervorheben. Danke, für die geselligen und kulinarischen Mittagessen, die Filmabende und After-Work Partys.

Meinen Eltern danke ich aus ganzem Herzen für die Ermöglichung des Studiums und die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen. Sie haben immer an mich geglaubt, waren geduldig und verständnisvoll, haben mich motiviert und ermutigt als die Zweifel mal groß waren. DANKE!

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wird erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Frau Dr. PD Elfriede Nößner am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrums München betreut und wird von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München vertreten.

München, den 02.09.2010

(Petra U. Prinz)

CURRICULUM VITAE

Name: Petra Ulrike Prinz
Geboren am: 19.03.1982
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung:

Grundschule (1988-1992): Grundschule am Ravensburger Ring, München

Gymnasium (1992-2001): Carl-Spitzweg Gymnasium, Germering
Naturwissenschaftlicher Zweig
(Englisch/Französisch)
Leistungskurse: Mathematik, Biologie

Studium (2001-2007): Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik
Nebenfächer: Zellbiologie und Immunologie

Auslandspraktikum (8 Wochen): Departement of Infection, Immunity and Inflammation,
University of Leicester, Leicester, England

Diplomarbeit (2006-2007): Arbeitsgruppe Molekulare Humangenetik von
Frau Prof. Elisabeth Weiß, Lehrstuhl für Anthropologie
und Humangenetik, Ludwig-Maximilians-Universität,
München
Thema: „Expressions- und funktionelle Untersuchungen
von T-Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit eines
Patienten mit Reaktiver Arthritis zur Charakterisierung von
pathogenen T-Zellklonen.“

Diplom (Januar 2007): Note: 1,0 („sehr gut“)

Promotion zum Dr. rer. nat.:

- 01.04.2007-23.08.2010: Erstellung der Promotion zum Dr. rer. nat. an der Fakultät für Biologie der LMU München, Durchführung in der AG Dr. PD Elfriede Nößner, Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München
Thema: „Tumorbedingte Störungen der funktionellen Kapazität tumorinfiltrierender natürlicher Killer- und T-Zellen: Nachweis der Funktionsdefizite und Evaluation von Gegenmaßnahmen“
- 2008-2010: Besuch des Graduiertenkollegs des SFB/TR 36

Kenntnisse:

Fremdsprachen: Englisch, Französisch
Gute EDV-Kenntnisse