

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Campus Großhadern
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt

**Die Charakterisierung Natürlicher Killerzellen bei Patienten mit Weichteilsarkomen und
ihre Beeinflussbarkeit durch *ex vivo*- Stimulation und Hyperthermie**

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

vorgelegt von
Désirée Waitszies geb. Pass
aus
München
2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Roland Dürr
Prof. Dr. Stefan Endres

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Veit Bücklein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>I.</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>V</u>
<u>II.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>VIII</u>
<u>1</u>	<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
1.1	WEICHTEILSARKOME.....	1
1.1.1	Grundlagen.....	1
1.1.2	Diagnostik.....	1
1.1.3	Konventionelle Therapiestrategien.....	2
1.1.4	Regionale Hyperthermie.....	3
1.1.4.1	Molekulare und zelluläre Reaktionen auf Hitzestress.....	3
1.1.4.2	Klinische Anwendung der regionalen Hyperthermie.....	3
1.2	NATÜRLICHE KILLERZELLEN.....	4
1.2.1	Grundlagen.....	4
1.2.2	NK-Zell-Subpopulationen.....	5
1.2.3	Aktivierung der NK-Zell-Funktion.....	5
1.2.3.1	Die Missing-Self-Theorie.....	6
1.2.3.2	Inhibierende und aktivierende NK-Rezeptoren.....	7
1.2.3.3	Die Effektorfunktionen.....	8
1.2.4	NK-Zellen bei Krebserkrankungen.....	8
1.2.4.1	Immunsurveillance.....	9
1.2.4.2	Immunevasion.....	9
1.2.5	Stimulation der NK-Zell-Funktion.....	10
1.2.5.1	Interleukin-2-Aktivierung.....	10
1.2.5.2	Stimulation durch Hyperthermie.....	11
<u>2</u>	<u>ZIELSETZUNGEN.....</u>	<u>13</u>
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>14</u>
3.1	MATERIAL.....	14
3.1.1	Geräte.....	14
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.3	Zellkulturmedien und Zusätze.....	15
3.1.4	Chemikalien.....	15
3.1.5	Lösungen und Puffer.....	16

3.1.6	Zelllinien	17
3.1.7	Antikörper	18
3.1.8	Kits.....	20
3.2	ZELLKULTUR.....	20
3.2.1	Kultivierung der K562-Zelllinie.....	20
3.2.2	Kultivierung der Sarkom-Zelllinien.....	20
3.2.3	Interleukin-2-basierte Langzeitkultivierung von CD3 ^{neg} -Zellen	21
3.2.4	Zellzählung	21
3.2.5	Kryokonservierung von Zellen.....	21
3.2.6	Auftauen von Zellen	22
3.2.7	Mykoplasmentest.....	22
3.2.8	Hyperthermie-Behandlung	22
3.3	NK-ZELL-GEWINNUNG.....	22
3.3.1	Rekrutierung von Patienten und gesunden Spendern	22
3.3.2	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts	23
3.3.3	Isolierung von NK-Zellen aus PBMCs	23
3.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	23
3.4.1	Ziele.....	23
3.4.2	Fluorochrom-Markierung der Oberflächenantigene	24
3.4.3	Intrazelluläre Fluorochrom-Markierung der Effektormoleküle	24
3.4.4	Messung und Auswertung.....	24
3.4.5	Statistische Auswertung.....	26
3.5	⁵¹CHROM-FREISETZUNGS-ASSAY	26
3.5.1	Ziele.....	26
3.5.2	Radioaktive Markierung der Zielzellen	26
3.5.3	Vorbereiten der Effektorzellen.....	27
3.5.4	Zytotoxizitätsassay.....	27
3.5.5	Messung der lytischen Aktivität	28
3.5.6	Statistische Auswertung.....	28
3.6	WESTERNBLOT.....	28
3.6.1	Ziele.....	28
3.6.2	Proteinisolation	28
3.6.3	Quantifizierung von Proteinen	29
3.6.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.6.5	Wet-Blotting	29
3.6.6	Proteindetektion	30
3.6.7	Statistische Auswertung.....	30

4	<u>ERGEBNISSE</u>	31
4.1	CHARAKTERISIERUNG VON NK-ZELLEN BEI STS-PATIENTEN IM VERGLEICH ZU GESUNDEN SPENDERN	31
4.1.1	Patientencharakteristika	31
4.1.2	Analyse der zytotoxischen Funktion	32
4.1.3	Analyse der Subpopulationen	33
4.1.4	Messung des Gehalts an Effektormolekülen	34
4.1.5	Expression von Aktivitätsmarkern	35
4.1.6	Expression von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren	36
4.1.6.1	Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren und das Adapterprotein CD3 ζ	36
4.1.6.2	ITAM-unabhängige aktivierende Rezeptoren	38
4.1.6.3	Inhibierende Rezeptoren	40
4.1.7	Immunphänotypisierung anhand weiterer Merkmale	41
4.1.7.1	Maturierungsmarker	41
4.1.7.2	Chemokinrezeptoren	42
4.1.8	Analyse der zytotoxischen Funktion gegen Sarkom-Zelllinien	43
4.2	EFFEKTE DER LANGZEITKULTIVIERUNG VON NK-ZELLEN BEI STS-PATIENTEN UND GESUNDEN SPENDERN MIT INTERLEUKIN-2	44
4.2.1	Expansion von NK-Zellen	44
4.2.2	Induktion der zytotoxischen NK-Zell-Funktion	47
4.2.3	Messung des Gehalts an Effektormolekülen nach Aktivierung	49
4.2.4	Veränderungen der Expression von Aktivitätsmarkern	50
4.2.5	Veränderungen der Expression aktivierender und inhibierender Rezeptoren	52
4.2.5.1	Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren und das Adapterprotein CD3 ζ	52
4.2.5.2	ITAM-unabhängige aktivierende Rezeptoren	54
4.2.5.3	Inhibierende Rezeptoren	56
4.2.6	Veränderung des Immunphänotyps anhand weiterer Merkmale	58
4.2.6.1	Maturierungsmarker	58
4.2.6.2	Chemokinrezeptoren	60
4.3	DIE WIRKSAMKEIT EINER HYPERTHERMIEBEHANDLUNG AUF SARKOM-ZELLINIEN	60
4.3.1	Veränderungen der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen	61
4.3.2	Induktion von Hitzeschockprotein 70	61
4.3.2.1	Intrazelluläre Synthese	62
4.3.2.2	Expression auf der Zellmembran	63
4.3.3	Die Expression von NK-Zell-Liganden auf Sarkom-Zelllinien	64
4.3.3.1	Liganden für aktivierende Rezeptoren	65
4.3.3.2	Liganden für inhibierende Rezeptoren	67

5	<u>DISKUSSION</u>	68
5.1	IMMUNEVASION BEI STS-PATIENTEN	68
5.1.1	NK-Zell-Dysfunktion unabhängig von NK-Zell-Maturierungsstatus	68
5.1.2	Normaler Gehalt an Effektormolekülen	69
5.1.3	Immunphänotyp von CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen – reduzierte Expression von NKG2D, NKp44, NKp30 und CD2.....	70
5.1.4	Rolle der Chemokinrezeptoren.....	74
5.1.5	Ligandenausstattung der Tumorzellen	74
5.1.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	75
5.2	ANSÄTZE FÜR IMMUNTHERAPEUTISCHE STRATEGIEN ZUR WIEDERHERSTELLUNG DER NK- ZELL-FUNKTION BEI STS-PATIENTEN	76
5.2.1	Direkte Stimulation durch IL-2.....	76
5.2.1.1	Aktivierung und Expansion der CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen	76
5.2.1.2	Relevante Veränderungen des Phänotyps - Hochregulation von NKG2D	79
5.2.1.3	Nebeneffekte – Effektormoleküle, Maturierungsmarker und Chemokinrezeptoren .81	
5.2.2	Indirekte Stimulation der NK-Zell-Funktion durch Hyperthermie der Tumorzellen.....	82
5.2.2.1	Resistenz der Sarkom-Zelllinien auch nach Hitzeschockbehandlung.....	82
5.2.2.2	Induktion der Hsp70-Expression - intrazellulär und/oder extrazellulär	83
5.2.2.3	Veränderungen der Antigenausstattung der Tumorzellen	84
5.2.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	84
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	86
7	<u>ANHANG</u>	101
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	101
7.2	TABELLENVERZEICHNIS	104
7.3	PATIENTEN- UND PROBANDENINFORMATION, EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG	106
7.4	DANKSAGUNG	111
7.5	PUBLIKATIONEN	112
7.6	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	113

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AA	Acrylamid, Polyacrylamid
AF488	Alexa Fluor 488
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Allophycocanin
APS	Ammoniumpersulfat
BAT3	<i>HLA-B-associated transcript 3</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
ddH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECD	Phycoerythrin-Texas Rot
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
EtOH	Ethanol absolut
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FasL	FasLigand
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FNCLCC	<i>Fédération Nationale des Centres de Lutte le Cancer</i>
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine activating motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor-tyrosine-phosphate-inhibitory-motif</i>
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
KrOrange	Krome Orange

L-Glut	L-Glutamin
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MICA	<i>MHC class I chain-related protein A</i>
MICB	<i>MHC class I chain-related protein B</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaPyr	Natriumpyruvat
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptor</i> , Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acids</i>
NKp44L	NKp44Ligand
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Pac Blue	Pacific Blue
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC7	Phycoerythrin Cyanin 7
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein Komplex
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
R0	Tumorresektion im Gesunden
R1	marginale Tumorresektion
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i>
RHT	regionale Hyperthermie
RPM	Rotationen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>sidescatter</i>
STS	<i>soft tissue sarcoma</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylenamid
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
ULBP	<i>UL16-binding proteins</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

II. Zusammenfassung

Weichteilsarkome (STS) sind seltene maligne Tumore. Trotz multimodaler Therapiekonzepte haben Hochrisiko-STS eine schlechte Prognose. Ca. 50% der Patienten sterben innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung. Die Anwendung der regionalen Hyperthermie in Kombination mit einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie verbessert die lokale Tumorkontrolle und das krankheitsfreie Überleben. Dennoch treten Rezidive und Fernmetastasen häufig auf. Aus diesem Grund sind neue therapeutische Ansätze dringend erforderlich.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen ohne vorangehende Immunisierungsschritte zu eliminieren. Aus Vorarbeiten ist bereits bekannt, dass die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen von STS-Patienten reduziert ist. Ursachen hierfür sind jedoch bislang nicht benannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NK-Zell-Dysfunktion aus einer Störung der NK-Zell-Aktivierung resultiert. Als Ursache konnte eine Reduktion der Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, CD2 und NKp44 auf NK-Zellen identifiziert werden. Weiterhin zeigten STS-Tumorzellen eine schwache Expression entsprechender Liganden sowie eine Überexpression der NK-inhibierenden Liganden HLA-A/B/C.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war, immuntherapeutische Strategien, die darauf abzielen, die bestehende NK-Zell-Dysfunktion aufzuheben, *in vitro* zu evaluieren. Hierfür wurde die Aktivierung und Expansion autologer und allogener NK-Zellen mittels eines IL-2-haltigen Langzeitkultursystems analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode zu einer relevanten Zunahme der zytotoxischen NK-Zell-Subpopulation und zu einer vollständigen Regeneration der NK-Zell-Aktivität bei STS-Patienten führt. Phänotypisch konnten neben der signifikanten Hochregulation von NKG2D auf NK-Zellen von STS-Patienten sowohl für autologe als auch für allogene NK-Zellen eine Reihe paralleler Veränderungen (z.B. Hochregulation von NKp44, CD69, HLA-DR, CD94 bzw. Herunterregulation von CD8, NKG2A) festgestellt werden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen des ersten Teils der Arbeit konnte NKG2D als zentraler Regulator und geeigneter Marker für das Monitoring der NK-Zell-Funktion bei STS-Patienten identifiziert werden.

Ferner wurde die Hyperthermie der Tumorzellen als weitere Methode zur Stimulation der NK-Aktivität untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hitzeschockbehandlung von Sarkom-Zelllinien zu keiner Augmentation der NK-Zell-Aktivität *in vitro* führt.

Zusammenfassend stellt die IL-2-basierte Langzeitkultivierung von NK-Zellen einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie von Patienten mit Hochrisiko-STS dar und sollte weiterhin verfolgt werden. Ob hierfür autologe oder allogene NK-Zellen besser geeignet sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu beantworten.

1 Einleitung

1.1 Weichteilsarkome

Weichteilsarkome sind seltene maligne Tumore. Trotz ihres gemeinsamen Ursprungs in Zellen des mesenchymalen Bindegewebes umfassen sie eine sehr heterogene Gruppe an Tumoren, die den behandelnden Arzt hinsichtlich Diagnostik und Therapie immer wieder vor große Herausforderungen stellt [4]. Im Folgenden werden Charakteristika, Diagnostik und Therapieoptionen vorgestellt.

1.1.1 Grundlagen

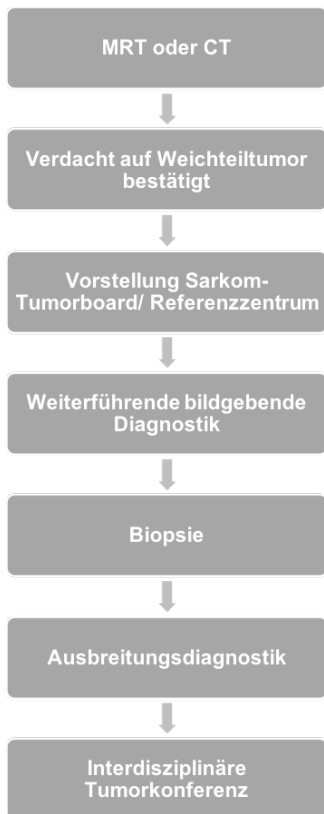
Weichteilsarkome (*soft tissue sarcoma*; STS) treten in Europa mit einer Inzidenz von 4-5 pro 100 000 Einwohner pro Jahr auf [5]. Damit machen sie weniger als 1% aller malignen Tumorerkrankungen im Erwachsenenalter aus [6].

Die meisten STS treten sporadisch auf. Nur selten können ursächliche Faktoren wie eine Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien [7], eine vorangegangene Strahlentherapie des betroffenen Gebietes [8] oder genetische Faktoren [9] identifiziert werden.

Da Weichteilsarkome unterschiedlichen extra-skelettalen Geweben (Muskel-, Fett- oder Stützgewebe) entstammen können, werden sie nach der WHO-Klassifikation für Weichteiltumore in über 70 histologische Subtypen eingeteilt [10]. Ein Tumor, der beispielsweise histologisch phänotypische Charakteristika von Fettgewebe aufweist, wird als Liposarkom bezeichnet. Zu den häufigsten Subentitäten bei Erwachsenen zählen gastrointestinale Stromatumore, Leiomyosarkome, Liposarkome und undifferenzierte pleomorphe Sarkome [11].

1.1.2 Diagnostik

In der Mehrzahl der Fälle (60%) treten STS an den Extremitäten auf. Man findet sie jedoch auch im Retroperitoneum (20%), am Körperstamm (10%) und im Kopf-Hals-Bereich (10%) [12]. Bei oberflächlich gelegenen Tumoren stellen sich die Patienten in der Regel mit einer an Größe zunehmenden, schmerzlosen Raumforderung vor. Tiefsitzende Tumore bleiben hingegen oft lange symptomlos und somit unentdeckt. Erst durch Größenprogredienz kommt es zur Kompression oder Verdrängung umliegender Strukturen und unspezifische Symptome wie Schmerzen, Parästhesien oder obstruktive Störungen im Gastrointestinaltrakt treten auf [4].



Die Diagnosestellung erfolgt gemäß dem in Abbildung 1-1 dargestellten Algorithmus. Aufgrund der Heterogenität und Rarität der STS sollte insbesondere die pathohistologische Aufarbeitung stets durch ein spezialisiertes Referenzzentrum durchgeführt werden, um eine exakte Diagnosestellung zu gewährleisten. Diese beinhaltet die Bestimmung der Subentität und das Tumor-Grading, das üblicherweise nach dem FNCLCC - System erfolgt (G1 niedrig-, G2 mittel-, G3 hochmaligne) [1, 13]. Auf die Untersuchungsergebnisse aufbauend werden STS gemäß der Stadieneinteilung des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) einem Tumorstadium zugeordnet. Diese berücksichtigt im Gegensatz zur „klassischen“ TNM-Klassifikation nicht nur die Tumorgöße, die Lage (tief vs. oberflächlich) und das Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen, sondern auch den prognostisch bedeutsamen Differenzierungsgrad [14]. Ferner hängt die Prognose von der Subentität des Tumors ab [4].

Abbildung 1-1 Algorithmus für die Diagnostik von Weichteiltumoren (modifiziert nach den DGHO-Leitlinien [1]).

1.1.3 Konventionelle Therapiestrategien

Die konventionelle Therapie der STS fußt auf den drei Säulen chirurgische Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie. Das konkrete Vorgehen ist individuell unter Berücksichtigung des Tumorstadiums, der Subentität und des Differenzierungsgrads zu planen und sollte stets durch ein spezialisiertes Referenzzentrum erfolgen [1].

Den höchsten Stellenwert hat die radikale Resektion mit ausreichend tumorfreien Rändern (R0-Resektion). Ist diese primär nicht erreichbar oder handelt es sich um Hochrisiko-STS ($\geq 5\text{cm}$, G2/G3), kommt häufig eine ergänzende neoadjuvante oder adjuvante Strahlentherapie zum Einsatz, um die Lokalrezidivrate von 90% zu senken [15]. Für Hochrisiko-STS reicht allerdings auch das oft nicht aus, eine lokale und systemische Tumorkontrolle zu erreichen [4]. Aus diesem Grund sollte für solche Patienten eine zusätzliche chemotherapeutische Behandlung erwogen werden. Darüber hinaus stellt die Chemotherapie die einzige verfügbare Therapieoption für Patienten mit bereits metastasierter oder inoperabler Erkrankung dar [15]. Die Auswahl des geeigneten Zytostatikums ist nicht einfach, da Weichteilsarkome im Allgemeinen eine nur eingeschränkte Chemotherapie-Sensitivität aufweisen [16]. So ist beispielsweise die Anthrazyklin-basierte Therapie mit Doxorubicin (\pm Ifosfamid) Standard in der Erstlinientherapie der STS [15], obwohl die Remissionsraten durchschnittlich nur ca. 15-

30% betragen [17, 18]. Hinzu kommt, dass sich die Subentitäten hinsichtlich ihres Ansprechverhaltens gegenüber Chemotherapeutika unterscheiden [19]. Erst bei Therapieversagen werden neben anderen Zytostatika auch neue zielgerichtete Therapien wie z. B. der Tyrosinkinase-Inhibitor Pazopanib empfohlen [15]. Die Wirksamkeit ist jedoch ebenfalls nur für bestimmte Subentitäten, wie z.B. das Synovialsarkom gegeben und führt dann allenfalls zu einer Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens um 2 Monate [20, 21]. Zusammenfassend ist die Therapie der STS aufgrund der Heterogenität der Erkrankung diffizil. Trotz genannter multimodaler Therapiekonzepte ist die Prognose von STS schlecht. Rezidive treten häufig auf und nur ca. 50% der STS-Patienten überleben die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung [5]. Deshalb ist es dringend erforderlich, alternative Therapiestrategien für Patienten mit STS zu etablieren.

1.1.4 Regionale Hyperthermie

Einen vielversprechenden Ansatz stellt die regionale Hyperthermie (RHT) als additives Verfahren zur Chemo- bzw. Strahlentherapie dar.

Allgemein wird Hyperthermie als Methode zur kontrollierten Erhöhung der Körpertemperatur definiert. Die regionale Hyperthermie ist ein etabliertes Verfahren, bei der mittels eines Ringapplikators durch lokale Einstrahlung elektromagnetischer Wellen größere Areale des Körpers erhitzt werden. Auf diese Weise können auch tief gelegene intraabdominelle Tumore erfasst werden [22].

1.1.4.1 Molekulare und zelluläre Reaktionen auf Hitzestress

Die Effekte der Hyperthermie sind in erster Linie von der Temperatur und der Expositionsdauer abhängig. Man unterscheidet zwischen einem subletalen (40°C - 43°C) und einem letalen (> 43°C) Hitzeschock. Der subletale Hitzeschock führt nicht unmittelbar zum Zelltod. Im Rahmen der physiologischen Stressantwort verfügen Zellen bei diesen Temperaturwerten über Kompensationsmechanismen, die ihnen eine Thermotoleranz verleihen (s. Kapitel 1.2.5.2.) [23]. Auf molekularer Ebene finden jedoch bereits Veränderungen statt, die die Zellen schwächen. So kommt es beispielsweise zur Beeinträchtigung von DNA-Reparaturmechanismen [24] und zu Störungen der Zellzyklus-Regulation [25]. Bei Temperaturen jenseits der 43°C sind die Kompensationsmechanismen der Zellen ausgeschöpft und die Hyperthermie wirkt durch Induktion von Apoptose beziehungsweise Nekrose direkt zytotoxisch [26].

1.1.4.2 Klinische Anwendung der regionalen Hyperthermie

Die beschriebenen Mechanismen sind auch von klinischer Relevanz. So werden bei der regionalen Hyperthermie Temperaturen von 40°C - 44°C angestrebt, die in der Regel über

einen Zeitraum von 90 Minuten (30 Minuten Aufwärmphase und 60 Minuten Therapie) appliziert werden. Dabei spielen die direkt zytotoxischen Effekte eine nur untergeordnete Rolle. Vielmehr macht man sich die bei subletalen Temperaturen auftretenden Effekte zunutze, um die Wirksamkeit einer Chemo- bzw. Strahlentherapie zu verstärken [27]. Die Überwärmung des Tumorgewebes führt insbesondere in ursprünglich hypoperfundierten Arealen zu einer gesteigerten Durchblutung, sowie zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Dadurch wird einerseits die stärkere Anflutung und Freisetzung von parallel verabreichten Zytostatika erreicht und andererseits die verbesserte Oxygenierung, die die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der Radiotherapie steigert [22, 28]. Desweiteren können die durch Zytostatika oder durch Strahlentherapie hervorgerufenen DNA-Schäden der Tumorzellen durch die hitzeinduzierte Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen nur noch unzureichend behoben werden, was die Wirksamkeit beider Therapien weiter verstärkt [22, 24].

So wurde die Anwendung der regionalen Hyperthermie als additives Verfahren in der Erstlinientherapie von Patienten mit Hochrisiko-STS im Jahr 2010 in die Leitlinien der *European Society for Medical Oncology* (ESMO) aufgenommen [29].

Darüber hinaus geht man davon aus, dass die Hyperthermie neben der Verstärkung der Wirksamkeit von Zytostatika auch immunstimulierende Effekte hat (s. Kapitel 1.2.5.2). Die Hyperthermie stellt deshalb möglicherweise eine interessante Modalität zur Integration in immuntherapeutische Konzepte dar.

1.2 Natürliche Killerzellen

Das Immunsystem ist ein körpereigenes hochkomplexes Abwehrsystem, dessen Aufgabe es ist, den Organismus zu überwachen und schädigende Faktoren wie neoplastisch transformierte Zellen zu erkennen und zu beseitigen. Hierfür verfügt es über eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen, die entweder dem adaptiven oder dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden. Wichtige Vertreter des angeborenen Immunsystems sind die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die im Folgenden vorgestellt werden.

1.2.1 Grundlagen

NK-Zellen werden anhand ihres Immunphänotyps identifiziert. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten zeichnen sich NK-Zellen durch die Abwesenheit von CD3 und die Expression von CD56 [30] und/oder CD16, einem Fc-Rezeptor für IgG, [31] auf ihrer Zelloberfläche aus [2, 32]. Wie alle immunkompetenten Zellen gehen sie aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor [33] und machen ca. 10-15% der Lymphozyten im peripheren Blut aus [34]. NK-Zellen sind – im Gegensatz zu Zellen des adaptiven Immunsystems wie T-Lymphozyten – in der Lage, virusinfizierte und neoplastisch transformierte Zellen ohne

vorhergehende Immunisierung zu erkennen und damit unabhängig vom adaptiven Immunsystem zu eliminieren [35].

1.2.2 NK-Zell-Subpopulationen

Innerhalb der NK-Zellen lassen sich mehrere Subpopulationen unterscheiden, die sich phänotypisch und funktionell voneinander unterscheiden. Nach Poli et. al wird zur Unterscheidung die Expressionsdichte von CD56 und CD16 herangezogen, sodass fünf unterschiedliche Subpopulationen identifiziert werden können: 1) $CD56^{bright}CD16^{neg}$ 2) $CD56^{bright}CD16^{dim}$ 3) $CD56^{dim}CD16^{neg}$ 4) $CD56^{dim}CD16^{bright}$ 5) $CD56^{neg}CD16^{bright}$ [2].

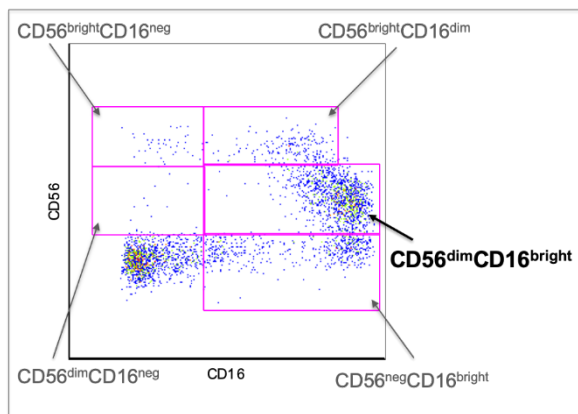


Abbildung 1-2 NK-Subpopulationen im peripheren Blut anhand der Expressionsdichte von CD56 und CD16 auf $CD3^{neg}$ -Zellen (modifiziert nach Poli et al. [2]).

Nach heutigem Kenntnisstand repräsentieren die Subpopulationen unterschiedliche Stadien eines Reifungsprozesses, wobei hierfür vor allem die Expression von CD56 ausschlaggebend ist. So reifen $CD56^{bright}$ -NK-Zellen zu $CD56^{dim}$ -NK-Zellen aus [36, 37].

$CD56^{bright}CD16^{dim/neg}$ -NK-Zellen finden sich hauptsächlich in den sekundär lymphatischen Organen [38] und erfüllen durch die Produktion von Zytokinen und durch Interaktion mit anderen immunkompetenten Zellen in erster Linie immunmodulatorische Aufgaben [39].

Bei $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -NK-Zellen steht die zytotoxische Aktivität im Vordergrund. Somit enthalten insbesondere $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -NK-Zellen in ihrem Zellinneren eine Vielzahl von Granzymen und Perforinen, die für die Zerstörung der Zielzellen notwendig sind [40, 41] (s. Kapitel 1.2.3.3). Als echte „Killerzellen“ machen sie mit 90% die größte Subpopulation der NK-Zellen im peripheren Blut aus [35, 42]. Kommt es zur Aktivierung, verlassen sie die Blutbahn und infiltrieren infiziertes oder neoplastisch transformiertes Gewebe. Aufgrund dieser Eigenschaften ist vor allem die $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -Subpopulation in die Kontrolle von Virusinfektionen und Krebserkrankungen involviert [32] und steht im Rahmen dieser Arbeit im Fokus. Die Funktion von $CD56^{dim}CD16^{neg}$ -Zellen ist unbekannt [2].

1.2.3 Aktivierung der NK-Zell-Funktion

Die Fähigkeit der NK-Zellen, infizierte oder maligne Zellen unabhängig von anderen immunkompetenten Zellen des adaptiven Systems zu erkennen und zu zerstören, bedarf eines hochkomplexen Regulationssystems. Werden „kranke“ Zellen erkannt, bedienen sich NK-Zellen unterschiedlicher Mechanismen, die zur Elimination der Zielzelle führen.

1.2.3.1 Die Missing-Self-Theorie

Ein zentraler Aspekt ist die Hypothese des „fehlenden Selbst“ (*missing-self-hypothesis*), die im Jahr 1984 von Karre et al. aufgestellt wurde. Sie sollte erklären, wie NK-Zellen entartete Zellen von gesunden, körpereigenen Zellen unterscheiden können: Grundlage war die Annahme, dass gesunde Zellen auf ihrer Oberfläche humanes Leukozytenantigen (HLA, *major histocompatibility complex I*, MHC-Klasse-I) oder HLA-E exprimieren. Treffen NK-Zellen auf gesunde Zellen, werden diese Moleküle von den NK-Zellen erkannt und die Zellen als „normal“ oder „gesund“ identifiziert [43]. Im Gegensatz dazu kommt es bei maligne entarteten Zellen häufig zu einem vollständigen Verlust oder zumindest zu einer reduzierten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen [44]. Karre folgerte also, dass allein das Nicht-Erkennen der MHC-Klasse-I-Komplexe zur Aktivierung der NK-Zelle und folglich zur Lyse der Zielzelle führt [45]. Heute weiß man, dass die Regulation der NK-Zell-Aktivierung hochkomplex ist und auf einem ständigen Wechselspiel zwischen inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen beruht. Das Kernstück bilden weiterhin die MHC-Klasse-I Moleküle, die als Liganden auf „normalen“ Zellen für inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen fungieren. Zur Aktivierung der NK-Zelle reicht der Verlust beziehungsweise die Reduktion der MHC-Klasse-I Moleküle allein nicht aus. Es werden zusätzliche Liganden auf den Zielzellen benötigt, die an aktivierende Rezeptoren der NK-Zellen binden. Erst wenn die Summe der Signale der aktivierenden Rezeptoren die der inhibierenden Rezeptoren übersteigt, kommt es zur Aktivierung der NK-Zelle und die Zielzelle wird zerstört (Vgl. Abb. 1-3) [31, 46].

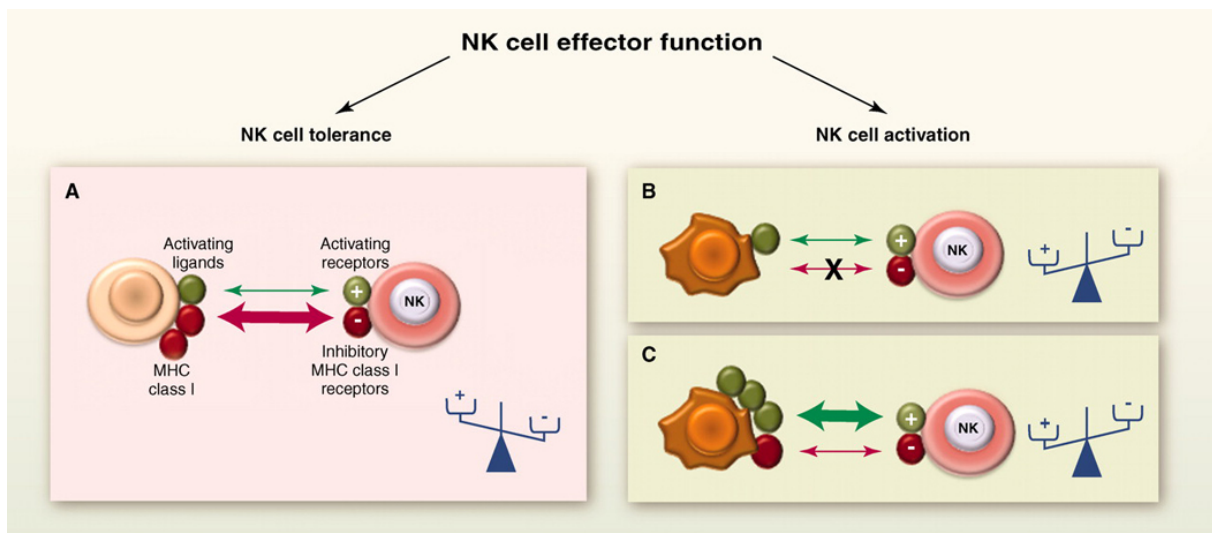


Abbildung 1-3 Dynamische Regulation der NK-Zell-Aktivierung. Exprimieren Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle, ist die NK-Zell-Aktivierung abhängig von der Summe der Signale der interagierenden aktivierenden (C) oder inhibierenden Rezeptoren (A). Fehlt die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Zielzellen, wird für die NK-Zell-Aktivierung zusätzlich die Expression aktivierender Liganden benötigt (B). [47]

1.2.3.2 Inhibierende und aktivierende NK-Rezeptoren

Für die beschriebene Feinregulation der NK-Zell-Aktivierung verfügen NK-Zellen über ein umfangreiches Repertoire an inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren. Nachdem ein Schwerpunkt dieser Arbeit die Analyse der Expression dieser Rezeptoren auf NK-Zellen ist, werden sie im Folgenden näher vorgestellt.

Zu den wichtigsten Vertretern der inhibitorischen Rezeptoren gehören die sogenannten *killer immunoglobulin-like receptors* (KIRs), die klassische MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen und das CD94/NKG2A-Heterodimer, das HLA-E auf den Zielzellen erkennt [48]. Beide übermitteln Signale über intrazellulär gelegene Sequenzen, den sogenannten *immunoreceptor-tyrosine-phosphate-inhibitory-motifs* (ITIMs) [49, 50].

Aktivierende Rezeptoren übermitteln ihre Signale über verschiedene Signalkaskaden. *Immunoreceptor tyrosine activating motif*- (ITAM-)assoziierte Rezeptoren senden Signale über ITAM-haltige Adapterproteine wie das CD3 ζ -Homodimer, DAP12 oder Fc ϵ RI γ [51]. ITAM-unabhängige Rezeptoren setzen Signalkaskaden beispielsweise über Adapterproteine wie DAP10 in Gang [52]. ITAM-assoziierte Rezeptoren zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität direkt beziehungsweise spontan einleiten zu können, während ITAM-unabhängige Rezeptoren mit Ausnahme von NKG2D eher als koaktivierende Rezeptoren fungieren. Sie sind also allein nicht in der Lage, Effektorfunktionen zu initiieren. Vielmehr ist die parallele Bindung mehrerer koaktivierender Rezeptoren notwendig, deren Signale sich gegenseitig verstärken. So kann beispielsweise durch paarweise Kombination der koaktivierenden Rezeptoren erreicht werden, dass die Summe der aktivierenden Signale die der inhibierenden überwiegt und es zur Aktivierung der NK-Zellen kommt [31, 53].

Die wichtigsten ITAM-assoziierten Rezeptoren sind neben wenigen aktivierenden KIRs und CD16 die Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*Natural Cytotoxicity Receptors*, NCRs) NKp30, NKp44 und NKp46. NKp30 und NKp46 werden auch von ruhenden NK-Zellen exprimiert. NKp44 lässt sich nur auf aktivierten NK-Zellen nachweisen [54]. Als Liganden der NCRs, aus deren Bindung eine NK-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen resultiert, sind bislang B7-H6, *HLA-B-associated transcript 3* (BAT3) und NKp44L bekannt [55].

Die wichtigsten ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren sind NKG2D, DNAM-1, 2B4 und CD2 [52]. NKG2D ist ein Typ II Transmembran-verankertes Glykoprotein, das sowohl auf der Zelloberfläche von NK-Zellen als auch auf einer Subpopulation der T-Zellen exprimiert wird [56]. Bei den Liganden für NKG2D handelt es sich um Proteine, die oft stressinduziert exprimiert werden und nicht selten den MHC-Klasse-I-Molekülen zwar sehr ähnlich sind, jedoch nicht mit ihnen verwandt sind. Beispiele hierfür sind *MHC class I chain-related protein A/B* (MICA und MICB) [57] oder Proteine aus der *UL16-binding proteins* (ULBP)-Familie [58]. Die Funktion von 2B4 ist vom Differenzierungsgrad der NK-Zellen abhängig. In frühen Entwicklungsstadien werden dem Rezeptor inhibitorische Funktionen zugeschrieben, bei

reifen NK-Zellen zählt er zu den aktivierenden Rezeptoren [59]. 2B4 bindet an CD48, ein Molekül, das vor allem von hämatopoetischen Zellen exprimiert wird [60]. DNAM-1 interagiert mit zwei Rezeptoren aus der Nectin-Familie: Dem Poliovirus-Rezeptor (CD155) und Nectin-2 (CD112). Beide Marker werden oft von Tumorzellen überexprimiert. Eine Bindung dieser Liganden auf Tumorzellen kann also die zytotoxische NK-Zell-Funktion mittriggern [61, 62]. Außerdem nimmt man an, dass die Interaktion zwischen DNAM-1 und CD155 nicht nur zu einer NK-Zell-Aktivierung führen kann, sondern auch in die Migration der NK-Zellen in infiziertes oder transformiertes Gewebe involviert ist [63]. Ein weiterer wichtiger koaktivierender Rezeptor ist CD2, ein Adhäsionsmolekül, das insbesondere für die NK-Zell-Aktivierung durch NKp46 eine Rolle spielt [53].

1.2.3.3 Die Effektorfunktionen

Werden NK-Zellen aktiviert, machen sie sich unterschiedliche Mechanismen zunutze, mithilfe derer sie die Zielzellen zerstören. Allen gemeinsam ist die Einleitung des programmierten Zelltods. Dies geschieht durch die Expression von Liganden, wie z. B. *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und *Fas ligand* (FasL), aus deren Bindung die Einleitung apoptotischer

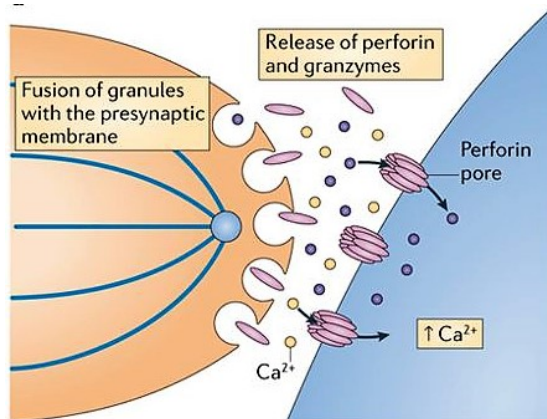


Abbildung 1-4 Die Ausschüttung von Effektormolekülen (modifiziert nach Voskoboinik et al. [3]).

Signale resultiert. Der Hauptmechanismus, der zur Elimination der Zielzellen führt, ist aber die Ausschüttung von Effektormolekülen. Dies sind Moleküle, die von zytotoxischen NK-Zellen intrazellulär in Vesikeln gespeichert werden. Hierzu zählen Perforin, ein Molekül, das die Integrität der Zielzellmembran stört und Granzyme, eine Gruppe von Serinproteasen [64]. Durch die Aktivierung der NK-Zellen kommt es zu einer Calciumionen-abhängigen Degranulation der Vesikel in den interzellulären Spalt zwischen

Effektorzelle und Zielzelle. Sodann bildet Perforin große Porenkomplexe in der Zielzellmembran, durch die die Granzyme in das Zytoplasma der Zielzelle diffundieren können [3, 65]. Dort werden durch die proteolytische Aktivität der Granzyme Signalkaskaden in Gang gesetzt, die zur Fragmentierung der Zielzell-DNA führen. Die Apoptose wird eingeleitet und die Zielzelle wird zerstört [66].

1.2.4 NK-Zellen bei Krebserkrankungen

NK-Zellen sind aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ein wesentlicher Bestandteil der sogenannten „Immunsurveillance“. Einige Tumore sind jedoch im Rahmen der

„Immunevasion“ in der Lage, der Immunabwehr zu entkommen. Beide Konzepte werden im Folgenden dargestellt.

1.2.4.1 Immunsurveillance

Schon seit den 1980iger Jahren nimmt man an, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Kontrolle maligne entarteter Zellen spielen. Erste Hinweise lieferten die Arbeiten von Roder et al. und Sullivan et al., als sie bei Patienten mit eingeschränkter NK-Zell-Funktion im Rahmen von genetischen Erkrankungen, wie dem Chédiak-Higashi-Syndrom oder X-chromosomalen lymphoproliferativen Syndrom, eine erhöhte Inzidenz von malignen Erkrankungen feststellten [67-69].

In den darauffolgenden Jahren zeigten Gorelik et al. und Barlozzari et al., dass die gezielte Depletion von NK-Zellen in immunkompetenten Mäusen nicht nur zu unkontrolliertem Tumorwachstum führt, sondern auch die rasche Entwicklung einer Metastasierung zur Folge hat. Umgekehrt konnte durch die Gabe aufgereinigter NK-Zellen eine Erholung der NK-Zell-Funktion erzielt werden [70, 71].

Es folgten diverse weitere Studien, die die Annahme aus den 1980iger Jahren bestätigen. So konnte für Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren eine positive Korrelation zwischen einer hochgradigen Infiltration von Tumorgewebe durch NK-Zellen mit einer besseren Prognose festgestellt werden [72-75]. Auch die im Jahr 2000 von Imai et al. veröffentlichte große prospektive Längsschnittstudie zeigte, dass die reduzierte lytische Aktivität von NK-Zellen im peripheren Blut mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung unterschiedlicher Tumore assoziiert ist [76].

Aus all diesen Erkenntnissen wird ersichtlich, dass NK-Zellen eine bedeutende Rolle in der „Immunsurveillance“ spielen. Dabei sind NK-Zellen nicht nur in die Verhinderung beziehungsweise Kontrolle von Primärtumoren involviert, sondern sind - zumindest im Tiermodell - auch in der Lage, den Organismus vor einer Metastasierung zu bewahren [34].

1.2.4.2 Immunevasion

Wie im letzten Kapitel beschrieben, sollte die Immunsurveillance das Auftreten von Tumoren unterbinden. Trotzdem erkranken auch immunkompetente Individuen an Malignomen. Das bedeutet, dass Tumore durch unterschiedliche Strategien für NK-Zellen unsichtbar bzw. resistent werden.

Die Resistenzentwicklung basiert auf Veränderungen der Antigen-Ausstattung der Tumorzellen, die die Herunterregulation von Liganden für aktivierende Rezeptoren, wie z. B. MICA als Ligand für NKG2D [77] und/oder die Hochregulation von Liganden für inhibierende Rezeptoren auf NK-Zellen betreffen können. Tumore, die mit einer p53-Mutation assoziiert sind, besitzen beispielsweise die Fähigkeit, MHC-Klasse-I-Moleküle hochzuregulieren und

sich somit als „gesunde“ Zellen zu tarnen [78]. Ferner können Tumorzellen Fas-Liganden exprimieren, die bei Kontakt die Apoptose der NK-Zellen einleiten [79, 80]. Eine weitere Erklärung kann das mangelnde Vorhandensein von Liganden für auf NK-Zellen exprimierte Chemokinrezeptoren sein, die für die Rekrutierung und Migration zum Tumor essentiell sind [81].

Darüber hinaus kommt es im Rahmen der Tumorprogression häufig zu funktionellen Defiziten der NK-Zellen im peripheren Blut, so auch bei Weichteilsarkomen [82, 83]. Ursächlich können Veränderungen des Rezeptorprofils und des Gehalts an Effektormolekülen von NK-Zellen sein [84-86], die vermutlich durch das vorherrschende Mikromilieu des Tumors herbeigeführt werden. Die dort herrschende Hypoxie [87] und die Sekretion immunsuppressiver Zytokine, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [88], *transforming growth factor- β* (TGF- β) [89] und Prostaglandin E2 (PGE2) [90] können eine erniedrigte Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren, z.B. der NCRs [87, 91] oder von NKG2D [92], bewirken.

Ein weiterer Evasionsmechanismus der Tumorzellen basiert auf den sogenannten Immun-Checkpoints. Um überschießende Immunantworten beziehungsweise Autoimmunreaktionen zu verhindern, verfügen Immunzellen über Rezeptoren, die die Dauer und Stärke der Immunantworten limitieren. Durch Hochregulation dieser Rezeptoren auf den Immunzellen und der Liganden auf den Tumorzellen können die Aktivierung und die Effektorfunktionen der Immunzellen gehemmt werden. Ein Beispiel stellt der *programmed death-1* (PD-1) / *programmed death-ligand 1* (PD-L1)-Signalweg dar. Dieser Mechanismus ist vor allem für Immunantworten, die durch T-Lymphozyten vermittelt werden, bekannt [93, 94]. Aber auch für NK-Zellen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Expression von PD-1 und funktionellen Defiziten bei Tumorerkrankungen hergestellt werden [95-97].

All die genannten Evasionsstrategien führen bei Tumorpatienten zu einem Status der NK-Zellen, der als „NK-Zell-Exhaustion“ bezeichnet wird [83].

1.2.5 Stimulation der NK-Zell-Funktion

Neben der Bindung aktivierender Liganden existieren weitere Stimuli, die zu einer Aktivierung der NK-Zellen führen können. Im Rahmen von Immuntherapien macht man sich diese Stimuli zunutze, um die Evasionsmechanismen der maligne entarteten Zellen auszuschalten und so das Immunsystem bei der Eliminierung dieser Zellen zu unterstützen. Im Folgenden werden zwei Möglichkeiten für die Stimulation der NK-Zell-Funktion aufgezeigt.

1.2.5.1 Interleukin-2-Aktivierung

Eine Möglichkeit der Aktivierung der NK-Zell-Funktion ist die Inkubation von NK-Zellen mit Interleukin-2 (IL-2). IL-2 ist ein Peptidhormon aus der Gruppe der Zytokine, welche bei Initiierung einer Immunantwort von T-Helferzellen und Dendritischen Zellen sezerniert

werden, um daraufhin die Aktivierung weiterer Immunzellen zu triggern und somit die Immunantwort zu regulieren. IL-2 regt NK-Zellen zur Proliferation und Differenzierung an. Durch die damit einhergehenden Veränderungen der Rezeptorausstattung der NK-Zellen wie beispielsweise eine Zunahme der Expression aktivierender Rezeptoren wird die Aktivierung der NK-Zell-Funktion erleichtert und eine Zunahme der Zytotoxizität gegen Zielzellen bewirkt [98, 99].

Aus diesem Grund war die Anwendung IL-2-manipulierter NK-Zellen als Immuntherapeutikum bereits Gegenstand diverser Untersuchungen. Diese beinhalteten zunächst die systemische Applikation von IL-2 zur endogenen Aktivierung der NK-Zellen. Diese Methode ging jedoch mit einer hohen Rate an Nebenwirkungen einher und lieferte keine überzeugenden Ergebnisse, da die systemische Gabe von IL-2 auch zu einer Expansion regulatorischer T-Zellen führt, die wiederum einen immunsuppressiven Effekt auf NK-Zellen haben [100, 101]. Aus diesem Grund stehen Studien zum adoptiven Transfer von *ex vivo* manipulierten autologen oder allogenen NK-Zellpräparaten seither im Fokus [102-107]. Da *ex vivo* expandierte und aktivierte NK-Zellen, die *in vitro* zwar hervorragende Ergebnisse hinsichtlich ihrer Zytotoxizität erzielten, *in vivo* nur enttäuschende Resultate im Sinne niedriger nachweisbarer Remissionsraten unterschiedlicher solider Tumore lieferten [102, 108, 109], ist ein Verständnis der zugrundeliegenden immunologischen Prozesse von großer Bedeutung. Insbesondere für Weichteilsarkome liegen hierzu bislang kaum Daten vor [110]. Dennoch gibt es Hinweise, dass auch bei STS-Patienten eine IL-2-basierte Immuntherapie einen vielversprechenden Ansatz darstellen könnte [82, 111-114]. Ob für derartige Therapien autologe oder allogene NK-Zellen bei STS besser geeignet sind, gilt es noch herauszufinden.

1.2.5.2 Stimulation durch Hyperthermie

Eine weitere Möglichkeit der Augmentation der NK-Zell-Funktion ist die Sensibilisierung der Zielzellen durch eine Hyperthermie-Behandlung. Dies soll vor allem auf der Hochregulation des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70) beruhen. Hsp70 ist ein Protein, das intrazellulär als molekulares Chaperone an der korrekten Faltung, Aktivierung und dem Transport neusynthetisierter Proteine beteiligt ist [115]. Im Rahmen der physiologischen Stressantwort auf unterschiedliche Stimuli wird die intrazelluläre Synthese von Hsp70 induziert, um die unter Stressbedingungen häufig auftretende Missfaltung bzw. Denaturierung von Proteinen zu verhindern und so einem Zelluntergang entgegenzuwirken. Dies verleiht den Zellen bis zum Überschreiten einer Schwellentemperatur eine gewisse Thermotoleranz [22].

Im Gegensatz zu gesunden Zellen ist Hsp70 bei malignen Zellen nicht nur intrazellulär lokalisiert, sondern wird zusätzlich auf der Oberfläche der Zellmembranen exprimiert [116]. Auch dort kommt es durch Hitze zu einer verstärkten Expression des Proteins. Dies wurde für unterschiedliche Malignome beschrieben, insbesondere für Osteo- und Ewing-Sarkom-

Zelllinien [117, 118]. Dieses Phänomen ist von Bedeutung, weil die Expression von Hsp70 auf der Zellmembran als aktivierendes Signal für NK-Zellen fungieren soll. So konnte *in vitro* nach Hyperthermie-Behandlung eine erhöhte zytotoxische Funktion der NK-Zellen gegenüber unterschiedlichen Tumorzellen nachgewiesen und mit der verstärkten Hsp70-Expression auf der Zelloberfläche korreliert werden [119-122]. Ein weiterer Effekt der Hyperthermie-Behandlung, der zumindest *in vitro* zu einer Zunahme der NK-Zell-Funktion führen kann, ist die hitzeinduzierte Hochregulation von NK-aktivierenden-Liganden wie MICA, MICB oder den ULBPs auf der Oberfläche der Tumorzellen [123, 124]. Nachweise für eine Wirksamkeit der hier beschriebenen Mechanismen bei Tumorpatienten sind allerdings bislang nicht erbracht [125]. Desweiteren ist unklar, ob diese Veränderungen auch für Sarkom-Zelllinien nachweisbar sind und weitere NK-Liganden involviert sind.

2 Zielsetzungen

Bereits in Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass NK-Zellen von STS-Patienten eine signifikante Reduktion der lytischen Aktivität aufweisen [114].

Ziel des ersten Teils vorliegender Arbeit ist die Identifizierung von Ursachen, die diesen funktionellen NK-Zell-Defekt erklären. Hierfür ist eine Charakterisierung involvierter Rezeptor-Liganden-Systeme essentiell. Aus diesem Grund erfolgten einerseits durchflusszytometrische Untersuchungen hinsichtlich des NK-Immunphänotyps von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern und andererseits hinsichtlich der Expression von NK-Liganden auf Tumorzelllinien.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit ist die Entwicklung immuntherapeutischer Strategien für die Wiederherstellung der NK-Zell-Funktion. Hierfür wurden einerseits die NK-Zellen mithilfe eines IL-2-basierten Langzeitkultursystems manipuliert und anschließend erneut hinsichtlich des Immunphänotyps und der lytischen Aktivität untersucht. Als Referenzgruppe dienten erneut NK-Zellen gesunder Spender. Andererseits wurden die Sarkom-Zelllinien einer Hyperthermiebehandlung unterzogen und im Anschluss die Wirksamkeit der Hyperthermie hinsichtlich der NK-Zell-Aktivität und der Expression von NK-Liganden auf Sarkom-Zelllinien untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Branson Sonifier 250	Branson, Dietzenbach
Durchflusszytometer, Navios Ex Flow	Beckman Coulter, Marseille, France
Durchflusszytometer, LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Elektronisches Thermometer	Greisinger Electronics, Regenstauf
Gefrierschrank (-20°C)	Siemens, München
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator (1x 37°C, 1x 41,8°C)	Bindler, Tuttlingen
Inkubator (43°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank (2°C - -8°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Leicar Microsystems, Wetzlar
Mini Trans-Blot® Cell	BioRad, München
Nano Drop 2000c Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nassblot-Apparatur 422 Electro Eluter	BioRad, München
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC, Oberstenfeld
Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhelfer Accu Jet® Pro	Brand, Wertheim
Plattenphotometer Spectrostar Nano	BMG Labtech, Offenburg
Rollenmischgerät	Hecht Sondheim
Spannungsquelle Powerpac 3000	BioRad, München
Sterilbank Herasafe KSP18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Topcount (γ-Counter)	PerkinElmer, Waltham, USA
Ultrazentrifuge Sigma 2K15	SIGMA, Osterode am Harz
Vortex Mischer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zellzählgerät	Life Technologies, New York, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting-/Chromatographie-Papier Whatman	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Lumaplate	Perkinelmar, Waltham, Usa
MACS® Separation Columns	Miltenyi Biotec, Auburn, Usa

Nitrozellulosemembran	Merck Millipore, Darmstadt
Objektträger (76 X 26 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Parafilm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pasteurpipetten	Vwr, Darmstadt
Pipettenspitzen (0,5-20, 2-200, 50-1000 µl)	Gilson, Middleton, Usa
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15,50 ml)	Bd, Franklin Lakes, Usa
Polystyrene-Round-Bottom-Tube (5 ml)	Bd, Franklin Lakes, Usa
Pre-Separation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotec, Auburn, Usa
Röntgenfilme Amersham Hyperfilm™ MP	Ge Healthcare, Buckinghamshire, Uk
Self-Adhering PE Foil	Macherey-Nagel, Düren
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Bd, Franklin Lakes, Usa
Zellkulturflaschen (T75, T25)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (96 well)	Bd, Franklin Lakes, Usa

3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech, Aidenbach
Hepes	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin (L-Glut)	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM (Minimum Essential Medium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat (NaPyr)	PAA, Pasching, Österreich
NEAA (Non-Essential Amino Acids)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640	Sigma, Aldrich, Steinheim
StemPro™ Accutase™	Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco, Karlsruhe

3.1.4 Chemikalien

⁵¹ Chrom	Hartmann Analytic, Taufkirchen
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biocoll-Separationslösung	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol absolut (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FcR-block	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Glycin	Merck, Darmstadt
Halt™ Protease & Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol absolut	Merck, Darmstadt
Milchpulver	BioRad, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards	BioRad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti® load 1	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (Polyacrylamid 30%)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylenamid (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Life Technologies, New York, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Westernblot Detektionsreagenz (Amersham ECL)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Westernblot Detektionsreagenz (Super Signal® West Dura)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellysepuffer	Cell Signaling Technologies, Frankfurt

3.1.5 Lösungen und Puffer

APS-Lösung 10%ig	1 g APS in 10 ml H ₂ O
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3
FACS-Fix	PBS + 0,5% PFA
FACS-Puffer/ MACS-Puffer	PBS + 5% FCS
Geltransfer-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol
R10	1640 RPMI + 10% FCS + 5% L-Glut + 1% Pen/Strep

	+ 5% Hepes
SDS-Lösung 10%ig	1 g SDS in 10 ml H ₂ O
SDS-PAGE Sammelgel	2,7 ml ddH ₂ O 0,67 ml AA 0,5 ml Tris-HCl (pH 6,8) 40 µl SDS (10%) 40 µl APS (10%) 4 µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (10%)	4,0 ml ddH ₂ O 3,3 ml AA 2,5 ml Tris-HCl (pH 8,8) 100 µl SDS (10%) 100 µl APS (10%) 4 µl TEMED
TBS (tris buffered saline)	0,2 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,4
TBS-T	TBS + 0,05% Tween 20

3.1.6 Zelllinien

Bezeichnung - Entität	Kulturmedium	Firma
K562 humane Erythroleukämie	RPMI 1640 + 10% FCS	DSMZ, Braunschweig
RD-ES humanes Ewingsarkom	MEM + 10% FCS + 1% NaPyr	American Type Culture Collection, Manassas, USA
SK-UT-1 humanes uterines Leiomyosarkom	+ 1% NEAA + 1% L-Glut	
SW-872 humanes dedifferenziertes Liposarkom	DMEM + 5% FCS	Cell Line Service, Eppelheim
SW-982 humanes Synovialsarkom		

3.1.7 Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Markierung	Vertreiber
CD8	SFCI21Thy 2D3	IgG1	APC-Alexa Flour* 750	Beckman Coulter, Marseille, France
CD117 (c-kit)	104D2D1	IgG1	APC	Beckman Coulter, Marseille, France
CD155/PVR	#300907	IgG1	APC	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD16	3G8	IgG1	FITC	Beckman Coulter, Marseille, France
CD16	3G8	IgG1	PC7	Beckman Coulter, Marseille, France
CD2	39C1.5	IgG1	APC-Alexa Flour* 750	Beckman Coulter, Marseille, France
CD226 (DNAM-1)	11A8	IgG1	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD244 (2B4)	C1.7	IgG1	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD247 (TCR ζ , CD3 ζ)	6B10.2	IgG1	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD27	1A4CD27	IgG1	PE	Beckman Coulter, Marseille, France
CD279 (PD-1)	EH12.2H7	IgG1	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD3	UCHT1	IgG1	ECD	Beckman Coulter, Marseille, France
CD314 (NKG2D)	ON72	IgG1	PE	Beckman Coulter, Marseille, France
CD335 (NKp46)	9E2	IgG1	Pac Blue	BioLegend, San Diego, USA
CD336 (NKp44)	P44-8	IgG1	APC	BioLegend, San Diego, USA
CD337 (NKp30)	Z25	IgG1	PE	Beckman Coulter, Marseille, France
CD45	J33	IgG1	KrOrange	Beckman Coulter, Marseille, France
CD48	BJ40	IgG1, κ	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD56	N901	IgG1	Pac Blue	BioLegend, San Diego, USA

Material und Methoden

CD56	N901	IgG1	PC7	Beckman Coulter, Marseille, France
CD57	NC1	IgG1	FITC	Beckman Coulter, Marseille, France
CD69	TP.155.3	IgG1	APC	Beckman Coulter, Marseille, France
CD94	HP-3B1	IgG1	APC	Beckman Coulter, Marseille, France
CX ₃ CR1	#528728	IgG1	PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
CXCR6	#56811	IgG1	APC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Granzyme A	CB9	IgG1	PE	BioLegend, San Diego, USA
HLA-A/B/C	W6/32	IgG2A, κ	FITC	BioLegend, San Diego, USA
HLA-DR	Immu-357	IgG1	Pac Blue	Beckman Coulter, Marseille, France
HLA-E	3D12	IgG1, κ	PE	BioLegend, San Diego, USA
MICA	#159227	IgG2B	PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
MICB	#236511	IgG2B	APC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Nectin-2/CD112	#610603	IgG1	AF488	R&D Systems, Minneapolis, USA
NKG2A/CD159a	#131411	IgG1	PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
Perforin	dG9	IgG1	APC	BioLegend, San Diego, USA
Tim-3	#344823	IgG1	PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
ULBP-1	#170818	IgG12A	AF488	R&D Systems, Minneapolis, USA
ULBP-3	#166510	IgG2A	PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
Granzyme B	GB11	IgG1	FITC	BioLegend, San Diego, USA
Rabbit-anti-β-Actin	13E5	Anti-rabbit- IgG	Peroxidase- konjugiert	Cell Signaling Technology, Frankfurt

Rat-anti-Hsp70	6B3	Anti-rat-IgG	Peroxidase- konjugiert	Cell Signaling Technology, Frankfurt
cmHsp70.1		IgG1	FITC	Multimmune GmbH, München
ULBP-2/5/6	#165903	IgG2A	PerCP	R&D Systems, Minneapolis, USA

3.1.8 Kits

MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Basel, Schweiz
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MACS “NK Cell Isolation”-Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FIX&PERM Cell Permeabilization Kit	Caltag Medsystems, Buckingham, Vereinigtes Königreich

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung der K562-Zelllinie

Die K562-Zelllinie wurde in Suspensionskultur gehalten. Für optimale Kulturbedingungen wurden die Zellen in einer 75cm² Kulturflasche bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Das Nährmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt, um eine hohe Stoffwechselaktivität und Wachstumsrate zu gewährleisten. Hierfür wurde die Zellsuspension nach Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität der Zellen in ein 50ml Falcon aufgenommen und zentrifugiert (550 RCF für 5 Minuten bei 20°C). Der zellfreie Überstand wurde verworfen und die Zellen auf eine Konzentration von 4 x 10⁵ Zellen/ml in frischem Kulturmedium eingestellt. Für die weitere Kultivierung wurden 20ml der Zellsuspension in einer Kulturflasche ausgesät. Um für Keimfreiheit zu sorgen, wurden die Kulturflaschen zweimal pro Monat gewechselt. Die Viabilität betrug stets über 90%.

3.2.2 Kultivierung der Sarkom-Zelllinien

Es wurden vier verschiedene Sarkom-Zelllinien in Kultur gehalten:

1. SW-872 - Liposarkom-Zelllinie
2. SW-982 - Synovialsarkom-Zelllinie
3. RD-ES - Ewingsarkom-Zelllinie
4. SKUT-1 - Leiomyosarkom-Zelllinie

Bei den Sarkom-Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen. Das Nährmedium wurde bei einer Konfluenz von 80-100%, das heißt zweimal pro Woche gewechselt. Hierfür wurden der Überstand verworfen und die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen von der Oberfläche zu lösen, wurden sie für drei Minuten mit Trypsin-EDTA (0,05%) bei 37°C inkubiert.

Die Trypsinierungsreaktion wurde anschließend mit FCS-haltigem Nährmedium gestoppt und die Zellzahl wurde ermittelt. Anschließend wurde die Suspension in ein 50ml Falcon überführt und zentrifugiert (300 RCF für 5 Minuten bei 20°C). Der zellfreie Überstand wurde verworfen und die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in frischem Kulturmedium eingestellt. Zur weiteren Kultivierung wurden 10ml der Zellsuspension in einer 75cm² Kulturflasche ausgesät. Um für Keimfreiheit zu sorgen, wurden die Kulturflaschen zweimal pro Monat gewechselt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre.

Für die Ernte der Zellen für die Einzelversuche wurde statt Trypsin-EDTA Accutase verwendet, da so eine Schädigung der Oberflächenmoleküle verhindert wird.

3.2.3 Interleukin-2-basierte Langzeitkultivierung von CD3^{neg}-Zellen

Nach der Entnahme wurden je 200ml venöses Vollblut zur Zellwerk GmbH nach Oberkrämer verschickt. Dort wurden die peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut isoliert und CD3^{pos}-T-Zellen depletiert. Anschließend wurden die CD3^{neg}-Zellen, also B-Lymphozyten und NK-Zellen, in einem IL-2- und Serum-haltigen Medium über mehrere Wochen kultiviert (Vgl. [126]). Da IL-2 keinen Einfluss auf die Proliferation von B-Lymphozyten hat, konnte so eine Expansion und Aktivierung erreicht werden, die vor allem NK-Zellen betraf. Nach Beendigung der Langzeitkultivierung wurden die expandierten Zellen zurückgeschickt und stets am Tag des Erhalts für die geplanten Untersuchungen verwendet.

3.2.4 Zellzählung

Für das Zählen der Zellen wurden 10µl der Zellsuspension auf eine 96-well-Platte überführt und mit 10µl Trypanblau gemischt. Anschließend wurden 10µl des Gemischs in eine Zählkammer eingebracht und die Zellzahl entweder automatisch durch den Cell Counter oder manuell unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Hierbei wurden alle ungefärbten, also nur die viablen Zellen in allen vier Quadranten mäander- und L-förmig ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{ausgezählte Zellzahl}}{\text{Anzahl der ausgezählten Eckquadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

3.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese nach Bestimmung der Zellzahl zentrifugiert (550 RCF für 5 Minuten bei 20°C) und das Zellpellet in einer Konzentration von $1,25-2,5 \times 10^7$ Zellen pro ml in FCS aufgenommen. Anschließend wurden je 800µl der Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und je 800µl Einfriermedium (FCS und 20% DMSO) langsam

zugegeben. Es folgte eine 36-48-stündige Lagerung bei -80°C , bevor die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-180°C) überführt wurden.

3.2.6 Auftauen von Zellen

Zunächst wurden 50ml vorgewärmtes Kulturmedium in ein 50ml Falcon vorgelegt. Zum Antauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad geschwenkt. Sobald ca. 2/3 der Zellsuspension aufgetaut waren, wurde solange im Wechsel zwischen dem Kryoröhrchen und dem Falcon hin- und herpipettiert, bis die Zellsuspension vollständig aufgetaut war und in das Falcon überführt werden konnte. Um das für stoffwechselaktive Zellen toxische DMSO gänzlich zu entfernen, wurde die gewonnene Zellsuspension zentrifugiert (550 RCF für 5 Minuten bei 20°C) und das Zellpellet in frisches Kulturmedium aufgenommen.

3.2.7 Mykoplasmentest

Um Keimfreiheit sicherzustellen, wurden bei allen Zelllinien monatliche Mykoplasmentests mithilfe des *MycoAlertTM mycoplasma detection kits* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.8 Hyperthermie-Behandlung

Zur Vorbereitung der Hyperthermie-Behandlung wurden Subkulturen (pro Bedingung eine Subkultur) mit jeweils 3×10^5 Zellen bzw. 5×10^5 Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte der Hitzeschock bei $41,8^{\circ}\text{C}$ und 43°C unter strenger Temperaturkontrolle, 5% CO_2 und wassergesättigter Atmosphäre für 90 Minuten (30 Minuten Aufwärmphase, 60 Minuten als „therapeutische Stunde“, analog der in der Klinik durchgeführten Hyperthermie-Behandlung). Nach Ablauf der verschiedenen Regenerationszeiten (4, 16, 24, 48 Stunden) wurden die Zellen geerntet, gezählt und entweder unmittelbar weiterverwendet oder als Zellpellets in 1,5ml Eppendorftubes bei -20°C gelagert.

3.3 NK-Zell-Gewinnung

3.3.1 Rekrutierung von Patienten und gesunden Spendern

Für nachfolgende Analysen erfolgten bei STS-Patienten und gesunden Spendern venöse Blutentnahmen (ca. 40ml). Die Blutproben wurden in EDTA- oder Lithium-Heparin-Röhrchen antikoaguliert und unmittelbar für anstehende Analysen verwendet.

Das Patientenkollektiv bestand ausschließlich aus Erstlinien-Patienten, die am Klinikum Großhadern der Universität München in Behandlung waren. Erstlinienpatienten sind Patienten mit Diagnose eines Weichteilsarkoms, bei denen die Indikation zur neoadjuvanten (z.B. bei Hochrisiko-Sarkom oder lokaler Inoperabilität) oder adjuvanten Chemotherapie (z.B. nach R1-

Resektion) besteht, die aber bisher noch keine chemotherapeutische Behandlung erhalten haben. Die gesunden Spender wurden aus Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Immuntherapie“ am HelmholtzZentrum München sowie aus dem Freundes- und Familienkreis rekrutiert.

3.3.2 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

Nach der venösen Blutentnahme wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), also Lymphozyten und Monozyten, isoliert. Die Isolation erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde das heparinisierte Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Es wurden je 12ml Biocoll-Separationslösung in 50ml Falcons vorgelegt und mit maximal 25ml PBS-Blut vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde das Gemisch 30 Minuten mit sich langsam erhöhender Geschwindigkeit bis 2000rpm und ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren, das hier eingesetzt wurde, um Lymphozyten und Monozyten von den restlichen Zellen im Blut zu trennen. Während Erythrozyten, Granulozyten sowie tote Zellen während der Zentrifugation absinken, konzentrieren sich Lymphozyten und Monozyten in der Interphase zwischen Plasma-PBS-Gemisch und Separationsmedium.

Die mit PBMCs angereicherte Interphase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in einem frischen Falcon mit kaltem Kulturmedium verdünnt. Zum Waschen der Zellen erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 1800 RPM und 20°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in kaltem Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die PBMCs entweder unmittelbar für durchflusszytometrische Messungen verwendet oder es wurden NK-Zellen isoliert.

3.3.3 Isolierung von NK-Zellen aus PBMCs

Die Isolation von NK-Zellen aus PBMCs erfolgte mithilfe des *MACS NK cell isolation kits, human* nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Isolation beruht auf einer negativen Selektion durch Depletion aller unerwünschten Zellen. Diese wurden mit spezifischen Biotin-Antikörpern und magnetisch wirksamen Mikrokügelchen markiert und anschließend durch Anlegen eines magnetischen Feldes über eine Säule von den NK-Zellen getrennt. Die aufgereinigten Zellen wurden unmittelbar für anstehende Experimente verwendet.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Ziele

Ziel der Durchflusszytometrie ist die Charakterisierung und Quantifizierung von Zellpopulationen durch Emission optischer Signale. In der vorliegenden Arbeit diente die Durchflusszytometrie der Identifizierung und Immunphänotypisierung von CD56^{dim}CD16^{bright}-

NK-Zellen unter den PBMCs von STS-Patienten und gesunden Spendern vor und nach IL-2-basierter Langzeitkultur. Auch der Anteil der Subpopulationen an der Gesamtzahl der NK-Zellen wurde stets analysiert. Desweiteren wurden die vier genannten Sarkom-Zelllinien hinsichtlich relevanter Liganden für die NK-Zell-Aktivierung immunphänotypisiert und die Effekte einer Hyperthermie-Behandlung auf die Expression der Liganden nach 4 und 24 Stunden Regenerationszeit untersucht.

3.4.2 Fluorochrom-Markierung der Oberflächenantigene

Zur Markierung der Oberflächenantigene wurden die Zellpellets in kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren der Zellen zu verhindern, wurden 10µl Fc-Block hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 4°C. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen erneut in kaltem FACS-Puffer resuspendiert und so auf die FACS-Röhrchen verteilt, dass pro Röhrchen je 5×10^5 Zellen in 100µl FACS-Puffer vorlagen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Antikörper in geeigneter Konzentration, die im Vorfeld durch Titration der Antikörper ermittelt wurde. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C und unter Lichtausschluss wurden die Zellen zweimal mit 1ml kaltem FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in je 200µl FACS-Fix resuspendiert, um die Antigenausstattung der Zellen zu erhalten. Alle durchgeführten Schritte erfolgten unter ständiger Kühlung mit Eis. Die Messung wurde entweder im Anschluss an die Färbung, spätestens jedoch am nächsten Tag durchgeführt.

Zur Untersuchung von NK-Zellen wurden die oben genannten Schritte durch Mitarbeiter des Labors für Leukämiediagnostik des Klinikums Großhadern durchgeführt.

3.4.3 Intrazelluläre Fluorochrom-Markierung der Effektormoleküle

Für die Markierung der Effektormoleküle mussten die Zellen fixiert und anschließend permeabilisiert werden, um einen Zugang zu den zytoplasmatischen Molekülen zu ermöglichen. Dies wurde stets nach Markierung der Oberflächenmoleküle durchgeführt und erfolgte mit Hilfe des *FIX&PERM Cell Permeabilization Kits* nach Angaben des Herstellers. Nach Zugabe der Antikörper erfolgten die gleichen Arbeitsschritte wie nach Zugabe der Antikörper zur Oberflächenmarkierung (s. Kapitel 3.4.2).

3.4.4 Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte am Navios EX Flow- bzw. LSRII-Durchflusszytometer. Für die Auswertung wurde das Programm FlowJo (Version 9.9) verwendet. Zur Analyse der NK-Zellen musste zunächst die $CD56^{\text{dim}}CD16^{\text{bright}}$ -NK-Zellpopulation unter den PBMCs identifiziert werden. Hierzu wurden folgende Schritte (Gating) durchgeführt (s. Abb. 3-1):

1. Auswahl der Lymphozyten-Population anhand der Expression von CD45 und anhand der Granularität der Zellen (SSC).
2. Auswahl der CD3^{neg}-Zellen (NK-Zellen und B-Lymphozyten) anhand der Expression von CD3 und CD56.
3. Bestimmung der NK-Zell-Populationen und Auswahl der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Population anhand der Expressionsdichte von CD16 und CD56.

Zum Setzen der Gates wurden stets positive und negative Events anhand des Isotyps identifiziert. So konnte auch der prozentuale Anteil der Lymphozyten an PBMCs, der Anteil der CD3^{neg}-Zellen an den Lymphozyten, sowie der Anteil der CD56^{dim}CD16^{bright}-Subpopulation an der Gesamtheit der NK-Zell-Population bestimmt werden.

Zur Immunphänotypisierung der identifizierten Subpopulation wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) jedes Markers und des zugehörigen Isotyps bestimmt und im Histogramm gegen den prozentualen Anteil an Ereignissen dargestellt. Zur Ermittlung der spezifischen Fluoreszenzintensität (MFI-Ratio) und damit der „echten“ Expressionsdichte wurde die MFI des jeweiligen Markers durch die MFI des zugehörigen Isotyps dividiert. Dabei wurde definiert, dass erst ab einer MFI-Ratio von 1,5 überhaupt von Expression gesprochen werden kann [127].

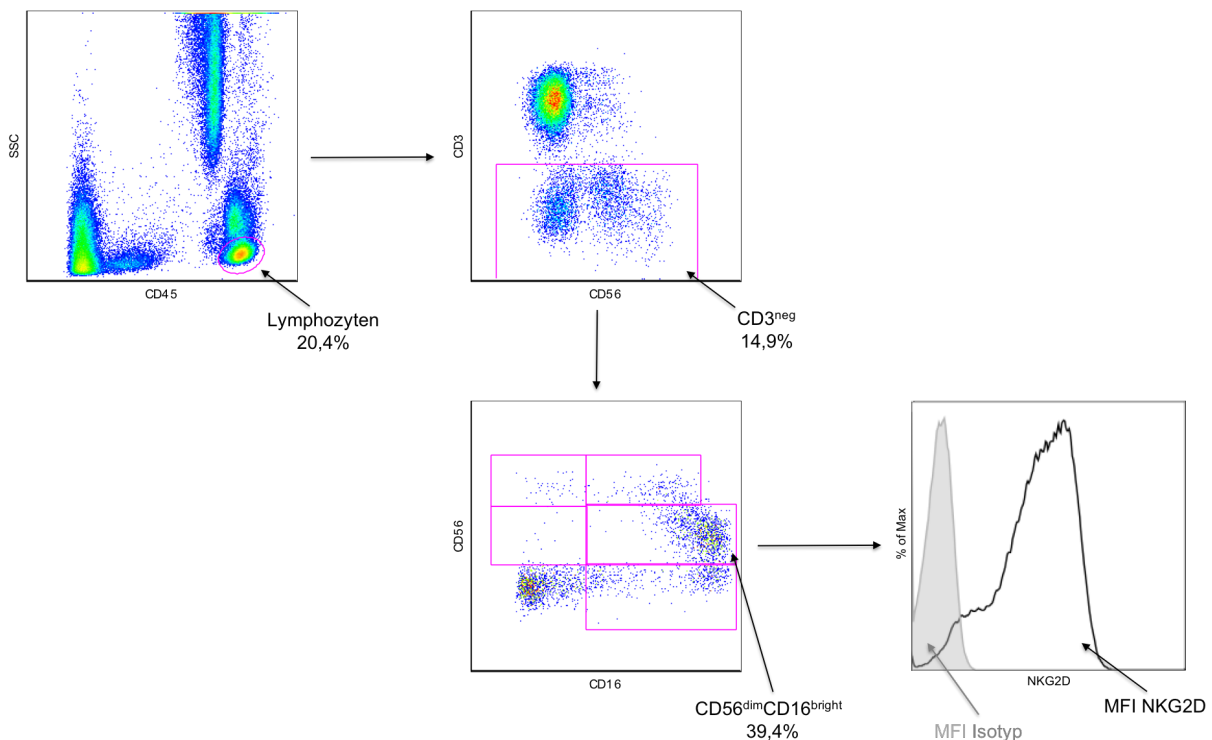


Abbildung 3-1 Gatingstrategie zur Immunphänotypisierung der CD56^{dim}CD16^{bright}-Subpopulation von NK-Zellen. Beispielhafte Darstellung eines Histogramms von NKG2D.

Zur Immunphänotypisierung der Sarkomzellen wurde die gemessene Population ausgewählt, die MFI-Werte der NK-Liganden für die unterschiedlichen Bedingungen ermittelt und miteinander verglichen. Auf diese Weise konnte eine Veränderung des Immunphänotyps durch Hyperthermie festgestellt werden.

3.4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism (Version 7.0c) durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Stichproben (Spender vs. Patient) wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für den Vergleich mehrerer Stichproben (Spender - IL-2 vs. Spender + IL-2; Patient - IL-2 vs. Patient + IL-2; Spender + IL-2 vs. Patient + IL-2) wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post hoc Test durchgeführt. Ab einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde ein signifikanter Unterschied angenommen. Ab Unterschreiten eines p-Werts $\leq 0,01$ wurde der Unterschied als sehr signifikant bezeichnet, ab $p \leq 0,001$ als hoch signifikant.

3.5 ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay

3.5.1 Ziele

Der ⁵¹Chrom-Freisetzungssassay ist eine Methode zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Effektorzellen gegenüber Zielzellen. Da man in dieser Arbeit die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern messen wollte, wurden stets aus PBMCs isolierte NK-Zellen als Effektorzellen verwendet. Als Targetzellen kamen unterschiedliche Zelllinien zum Einsatz.

Um die grundsätzliche Aktivität von NK-Zellen zu bestimmen, dienten K562-Zellen als Targetzellen. Die K562-Zelllinie stellt durch die mangelnde Expression von MHC-Antigenen der Klasse I und die Präsentation von Hsp70 auf ihrer Oberfläche die optimale Zielzelllinie für NK-Zellen dar [119]. Darüber hinaus wollte man die lytische Aktivität der NK-Zellen gegenüber unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien ermitteln und einen möglichen Effekt der Hyperthermie-Behandlung der Sarkomzellen auf die Zytotoxizität der NK-Zellen untersuchen. So wurde der ⁵¹Chrom-Freisetzungssassay mit folgenden Sarkom-Zelllinien durchgeführt: SKUT-1, RD-ES, SW982 und SW872. K562-Zellen wurden als Positivkontrolle stets mitgeführt.

3.5.2 Radioaktive Markierung der Zielzellen

Im ersten Schritt wurden die Zielzellen mit dem radioaktiven Isotop ⁵¹Chrom (einem γ -Strahler) markiert. Hierfür wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen aus der Zellkultur entnommen, mit Medium gewaschen und in einem 15ml Falcon in 100 μ l FCS resuspendiert. Im Radioaktivlabor wurden dann 100 μ CiNa⁵¹CrO₄ hinzugegeben und die Suspension für 90 Minuten (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Die Inkubation im Brutschrank bietet optimale Bedingungen für die Zellen, ⁵¹Chrom aufzunehmen und zu speichern. ⁵¹Chrom hat eine Halbwertszeit von ungefähr vier Wochen, das heißt, je länger die Chromatlösung besteht, desto mehr Aktivität geht verloren und desto mehr kaltes ⁵¹Chrom befindet sich in der Lösung. Aus diesem Grund ist es erforderlich die Chrommenge für den jeweiligen Versuchstag in Bezug auf das Justierungsdatum zu ermitteln. Zur Berechnung wurde folgende Formel benutzt:

$$A(t) = A(t_0) \times e^{-\lambda t} ; \quad \text{dabei gilt:} \quad \lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

$A(t)$ = Aktivität zum Zeitpunkt t

$A(t_0)$ = Aktivität zum Zeitpunkt 0 (bekannt)

λ = Zerfallskonstante

$T_{1/2}$ = Halbwertszeit

3.5.3 Vorbereiten der Effektorzellen

In der Zwischenzeit wurden die Effektorzellen, also die NK-Zellen, mit Kulturmedium gewaschen, gezählt und je nach gewünschter höchster Effektor-zu-Target-Zell-Ratio (E:T-Ratio) auf eine Konzentration von $1,6 \times 10^6$ (E:T 40:1) bzw. 4×10^5 Zellen (E:T 10:1) pro ml Medium eingestellt. Die höchste E:T-Ratio richtete sich dabei nach der Zahl der zur Verfügung stehenden Zellen, wobei stets hohe Ratios angestrebt wurden. Anschließend wurden je 100 μ l der Effektorzellsuspension auf eine vorbereitete 96-U-well-Platte in Triplikaten aufgebracht und durch Zugabe von R10 wurde eine Verdünnungsreihe erzeugt. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen der Effektorzellen konnten später - nach Zugabe der Targetzellen - unterschiedliche E:T-Ratios (40:1, 20:1, 10:1, 5:1 oder 10:1, 5:1, 2,5:1, 1,25:1) erzielt werden.

3.5.4 Zytotoxizitätsassay

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Targetzellen zweimal mit je 5ml R10 gewaschen, um das überschüssige $^{51}\text{Chrom}$ aus der Suspension zu eliminieren. Die Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von 4×10^4 Zellen/ml Medium eingestellt. Im Anschluss wurden je 50 μ l der Zellsuspension auf die bereits vorgelegten Effektorzellen auf die 96-U-well-Platte pipettiert. Zur Ermittlung der Maximallyse der Targetzellen wurden 50 μ l der K562-Zellsuspension in zwei Triplikaten direkt auf die später zur Messung verwendete Lumaplatte übertragen. Durch Eintrocknen auf der Lumaplatte werden alle im Well enthaltenen K562-Zellen zerstört. Dies entspricht der maximal möglichen Zelllyse.

Die 96-well-Platte wurde abgedeckt und bei 37°C und 5% CO_2 für vier Stunden inkubiert. In dieser Zeit kommt es durch Zerstörung der Zielzellen durch die NK-Zellen zur Freisetzung des vorher aufgenommenen $^{51}\text{Chroms}$ ins Medium, sodass die Strahlungsmenge im Überstand zur Ermittlung der lytischen Aktivität herangezogen werden kann. Hierfür wurden im Anschluss an die Inkubation je 50 μ l des Überstands vorsichtig abgenommen und auf die Luma-Platte überführt. Zudem wurde der Überstand aus zwei Triplikaten von Wells abgenommen, die keine Effektorzellen, sondern nur radioaktiv markierte Targetzellen enthielten, und auf die Luma-Platte aufgebracht. Dies diente der Messung der Spontanlyse der Targetzellen, also der minimal auftretenden Lyse. Zur Trocknung der Luma-Platte wurde diese über Nacht unter dem Abzug gelagert.

3.5.5 Messung der lytischen Aktivität

Am nächsten Tag erfolgte nach Abkleben der Platte mit einer Folie die Messung der Aktivität mit dem TopCount. Die vorhandene Strahlungsmenge ist direkt proportional zur Menge der zerstörten Targetzellen und dient somit als Surrogat für die Aktivität der Effektorzellen. Für die gemessenen Werte der Triplikate wurde jeweils der Mittelwert errechnet, wobei einzelne Ausreißer ausgeschlossen wurden. Außerdem wurden für die Auswertung nur Versuche verwendet, bei denen die Spontanlyse (Minimum) weniger als 20% der Maximallyse ausmachte. Zur Berechnung der lytischen Aktivität, die stets in % der Maximallyse angegeben wird, wurde folgende Formel benutzt:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{gemittelte Aktivität pro Triplikat} - \text{Spontanlyse}}{(\text{Maximallyse} \div 2) - \text{Spontanlyse}} \times 100$$

3.5.6 Statistische Auswertung

Auch für die statistische Analyse der erhobenen Daten zur NK-Zell-Funktion wurde das Programm GraphPad Prism (Version 7.0c) verwendet und Mann-Whitney-U-Tests bzw. Kruskal-Wallis-Tests mit Dunn's post hoc Tests durchgeführt. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede diente auch hier ein p-Wert $\leq 0,05$.

3.6 Westernblot

3.6.1 Ziele

Der Westernblot ist eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen. Ziel des Westernblots in dieser Arbeit war, die durch Hyperthermie induzierte intrazelluläre Synthese von Hsp70 in den 4 genannten Sarkom-Zelllinien nachzuweisen. Nachdem die Synthese von Hsp70 bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich viel Zeit in Anspruch nimmt, wurde der Proteingehalt jeweils nach 4, 16, 24 und 48 Stunden Recoveryzeit nach Hitzeschock gemessen.

3.6.2 Proteinisolation

Nach Hitzeschockbehandlung und Ablauf der verschiedenen Regenerationszeiten wurden die Zellen geerntet und bei -20°C gelagert. Für die Proteinisolation wurden die Zellpellets bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Puffer für die Proteinisolation wurde aus 1ml Lysepuffer, 10 μl EDTA und 10 μl Protease/Phosphatase hergestellt. Die aufgetauten Sarkomzellen wurden in 100 μl Puffer pro 1×10^6 Zellen resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Proteinanreicherung und Herstellung von zellfreien Lysaten wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (Sonicate: 3 Sekunden mit 50% Leistung, Output 5) aufgebrochen. Um der Wärmeentwicklung durch den Ultraschall entgegenzuwirken, wurden die Proben für 10 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte eine 10-minütige Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge

SIGMA 2K15) bei 13 000g und 4°C. Unlösliche Membran- und Zellwandbestandteile sinken hierdurch ab und werden so von den Proteinextrakten im Überstand getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt im nächsten Schritt bestimmt.

3.6.3 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde nach der BCA-Methode mithilfe des *PierceTM BCA Protein Assay Kits* gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Die BCA-Methode beruht auf der Ausbildung farbiger Komplexe aus Bicinchoninsäure, Kupferionen und Proteinen, deren Absorption gemessen und mit dem Proteingehalt gleichgesetzt wird. Die Messung erfolgte bei 562nm im Plattenphotometer SPECTROStar Nano.

3.6.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ziel der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli ist es, die einzelnen Proteine abhängig von ihrer relativen Molekülmasse aufzutrennen. Hierfür wurden die Proteine zunächst durch Zugabe von vierfach konzentriertem SDS-Ladepuffer (Roti® Load 1) und 10-minütigem Kochen im Heizblock bei 95°C denaturiert. SDS dient dabei nicht nur der Denaturierung der Proteine, sondern verleiht ihnen durch Komplexbildung eine konstant negative Ladung. Auf diese Weise kann die Auftrennung der Proteine nur anhand der relativen Molekülmasse und unabhängig von deren Ladung erfolgen. Im nächsten Schritt wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen. Anschließend wurden die Proben mit gleichbleibendem Proteingehalt sowie 5µl Kaleidoscope Marker als Proteinstandard in die SDS-Geltaschen eingefüllt. Die Kammer wurde mit Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Der Lauf erfolgte zunächst bei 75V für 15 Minuten (Proben im Sammelgel) und anschließend bei 120V für 1 Stunde 45 Minuten (Proben im Trenngel).

3.6.5 Wet-Blotting

Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine mittels einer Nassblot-Apparatur auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierzu wurde ein elektrisches Feld erzeugt, in dem die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wanderten. Hierbei wurden sie auf die Membran transferiert.

Dafür wurden die Bestandteile der Blotkassette mit Geltransferpuffer kurz äquilibriert und die Blotkassette zusammengebaut. Das Blotten erfolgte in einer mit Geltransferpuffer gefüllten Kammer durch Anlegen einer Spannung von 80V für 90 Minuten unter ständiger Kühlung durch Kühlakkus.

3.6.6 Proteindetektion

Nach dem Blotten wurde die Membran in ein 50ml Falcon überführt. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern, wurden die noch freien Bindungsstellen blockiert. Dafür wurde die Membran 45 Minuten mit TBS-T und 5% Milchpulver unter ständigem Rollen inkubiert und danach 1x 10 Minuten und 3x 5 Minuten mit Puffer gewaschen. Für die Proteindetektion wurden in der Regel ein Primär- und ein Sekundär- Antikörper verwendet. Der Primärantikörper diente der Erkennung und spezifischen Bindung an das zu detektierende Protein, hier also Hsp70, der Sekundärantikörper, der an den primären Antikörper bindet, diente zur Signalverstärkung und letztendlich zur Visualisierung der Proteine.

Als primäre Antikörper wurden Anti-Hsp70 und Anti- β -Actin (als Kontrolle) eingesetzt. Der Hsp70-Antikörper wurde 1:1000, der β -Actin-Antikörper 1:10000 mit TBS-T und 5% BSA verdünnt. Die Membran wurde mit 5ml der Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C unter ständigem Rollen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1: 3000 mit TBS-T und 5% Milchpulver verdünnt und die Membran mit 5ml der Sekundärantikörperlösung 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen inkubiert. Auch hier diente die Milch der Blockade weiterer freier, unspezifischer Bindungsstellen, sodass ein verstärktes Hintergrundsignal verhindert wurde. Ein erneutes Waschen der Membran schloss sich an. Zur Visualisierung der einzelnen Banden des Hsp70 wurde der Blot mit 500 μ l Western-Blot Detection Reagent 1 und 500 μ l Western-Blot Detection Reagent 2 pro 1ml Entwicklungslösung in einer Entwicklungskassette benetzt. Der Film wurde im Optimax X-Ray Film Processor (PROTEC) entwickelt. Die Belichtungszeiten betragen 40 Sekunden bis 2 Minuten.

3.6.7 Statistische Auswertung

Für die Darstellung der Westernblot-Ergebnisse wurde eine semiquantitative densitometrische Auswertung mittels ImageJ durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend mithilfe von GraphPad Prism (Version 7.0c) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von NK-Zellen bei STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern

NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen ohne vorhergehende Immunisierung zu eliminieren. Für viele maligne Erkrankungen wurde eine Reduktion dieser Fähigkeit beschrieben, so auch für Weichteilsarkome [82]. Während bei anderen malignen Erkrankungen bereits Mechanismen, die dieses Defizit bedingen, identifiziert wurden, liegen für Weichteilsarkome noch keine entsprechenden Ergebnisse vor. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit NK-Zellen von STS-Patienten charakterisiert. Als Referenzgruppe dienten NK-Zellen gesunder Spender.

4.1.1 Patientencharakteristika

Folgende STS-Patienten wurden für alle Analysen, die Bestandteil dieser Arbeit sind, ausgewählt.

Patient	Alter	Geschlecht	Histologie	Tumor-lokalisierung	Vor-bestrahlung	Vor-operation
1	34	m	Spindelzelliges Rhabdomyosarkom	Unterschenkel	nein	nein
2	41	m	Klarzellsarkom	Rumpf	nein	ja
3	67	m	Liposarkom	Rumpf	nein	ja
4	43	m	MPNST	Rumpf	nein	ja
5	48	m	Monophasisches Synovialsarkom	Knie	nein	ja
6	64	w	Leiomyosarkom	Uterus	nein	ja
7	56	w	Leiomyosarkom	Uterus	nein	ja
8	63	w	Liposarkom	Rumpf	nein	nein
9	52	m	Leiomyosarkom	retroperitoneal	nein	nein
10	59	m	Leiomyosarkom	Unterschenkel	nein	ja
11	52	w	MPNST	Abdomen	nein	nein
12	26	m	Pleomorphes undifferenziertes Sarkom	Becken	nein	nein
13	27	w	Myxoides Liposarkom	Abdomen	nein	ja
14	44	w	Endometriales Stromasarkom	Uterus	nein	ja

Tabelle 4-1 Patientencharakteristika

4.1.2 Analyse der zytotoxischen Funktion

Im ersten Schritt erfolgte eine Analyse der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen von STS-Patienten. Hierfür wurden ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assays durchgeführt. Die hierbei gemessene spezifische Lyse der K562-Zellen entspricht der Spontanaktivität von NK-Zellen ohne Stimulation bei einer E:T-Ratio von 10:1.

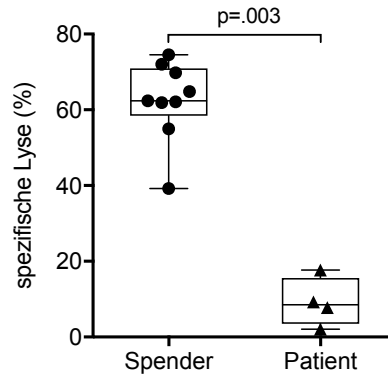


Abbildung 4-1 NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zur Zytotoxizität bei gesunden Spendern bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).

% spez. Lyse	Spender n=9	Patient n=4
Minimum	39,20	2,07
Median	62,40	8,55
Maximum	74,50	17,70

Tabelle 4-2 NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zur Zytotoxizität bei gesunden Spendern bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).

Während gesunde Spender bei einer E:T-Ratio von 10:1 im Median eine lytische Spontanaktivität von 62,4% gegen K562 aufwiesen, konnte bei Patienten nur eine mediane Spontanaktivität von 8,55% gemessen werden. Der Unterschied war statistisch sehr signifikant.

4.1.3 Analyse der Subpopulationen

Da für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen die $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -Subpopulation ausschlaggebend ist [42] (s. Kapitel 1.2.2), wurden Untersuchungen zur Größe dieser Subpopulation durchgeführt. Alle weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls an dieser Subpopulation durchgeführt.

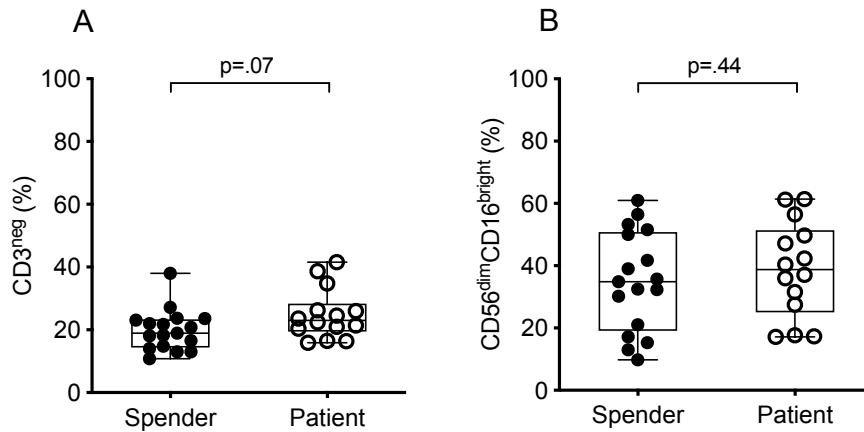


Abbildung 4-2 Vergleich des Anteils an $CD3^{neg}$ -Zellen an Lymphozyten (A) und $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -Zellen an $CD3^{neg}$ -Zellen (B) bei STS-Patienten und gesunden Spendern.

	<u>% $CD3^{neg}$ an Lymphozyten</u>		<u>% $CD56^{dim}CD16^{bright}$ an $CD3^{neg}$</u>	
	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=17	Patient n=14
Minimum	10,80	15,90	9,78	17,20
Median	18,90	23,00	34,90	38,75
Maximum	38,00	41,60	61,00	61,40

Tabelle 4-3 Vergleich des Anteils an $CD3^{neg}$ -Zellen an Lymphozyten und $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -Zellen an $CD3^{neg}$ -Zellen bei STS-Patienten und gesunden Spendern.

Weder die Messung des Anteils der $CD3^{neg}$ -Zellen an den Lymphozyten noch des Anteils der zytotoxischen $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -Subpopulation an den $CD3^{neg}$ -Zellen erbrachte signifikante Unterschiede beim Vergleich von STS-Patienten und gesunden Spendern.

4.1.4 Messung des Gehalts an Effektormolekülen

Zur Entfaltung der zytotoxischen Funktion benötigen NK-Zellen u.a. die in Kapitel 1.2.3.3 beschriebenen Effektormoleküle [64]. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt der Gehalt an Perforin, Granzym A und Granzym B für die CD56^{dim}CD16^{bright}-Subpopulation durch intrazelluläre Färbung dieser Moleküle durchflusszytometrisch ermittelt.

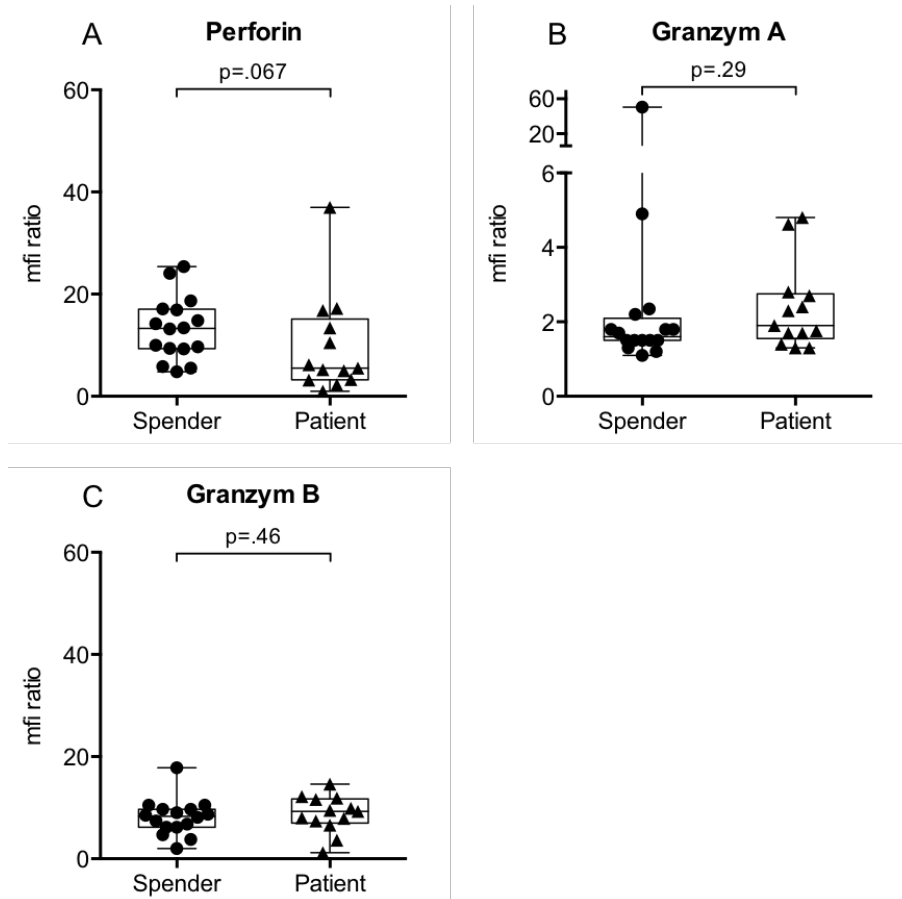


Abbildung 4-3 Gehalt an den Effektormolekülen Perforin (A), Granzym A (B) und Granzym B (C) in CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

	<u>Perforin</u>		<u>Granzym A</u>		<u>Granzym B</u>	
MFI-Ratio	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=13	Spender n=16	Patient n=13
Minimum	4,80	1,00	1,10	1,30	2,00	1,20
Median	13,30	5,50	1,60	1,90	8,30	9,30
Maximum	25,40	37,01	50,60	4,80	17,80	14,60

Tabelle 4-4 Gehalt an den Effektormolekülen Perforin, Granzym A und Granzym B in CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

Signifikante Unterschiede zwischen STS-Patienten und gesunden Spendern konnten nicht festgestellt werden. Gesunde CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen enthielten jedoch tendenziell mehr Perforin. Der Gehalt an Granzym A und Granzym B war in beiden Gruppen ähnlich.

4.1.5 Expression von Aktivitätsmarkern

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, deren Dichte mit dem Grad der Aktivierung und der potentiellen Zytotoxizität einhergehen. CD69 ist ein früher Aktivitätsmarker, der innerhalb sehr kurzer Zeit nach Aktivierung auf NK-Zellen hochreguliert wird. Er besitzt die Fähigkeit, die zytotoxische Funktion der NK-Zellen ohne Aktivierung weiterer aktivierender Rezeptoren einzuleiten und die Zytokinproduktion anzuregen [128, 129]. HLA-DR ist eher als später Aktivierungsmarker anzusehen. HLA-DR-positive NK-Zellen weisen ebenso wie CD69-positive Zellen eine starke lytische Aktivität auf [130]. Um Unterschiede im Aktivierungszustand der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen zwischen der Spender- und Patientengruppe festzustellen, wurde die Expression beider Aktivitätsmarker durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei ist zu erwähnen, dass es sich um „resting“ NK-Zellen handelte, also NK-Zellen, die vorher keiner IL-2-basierten Stimulation ausgesetzt waren.

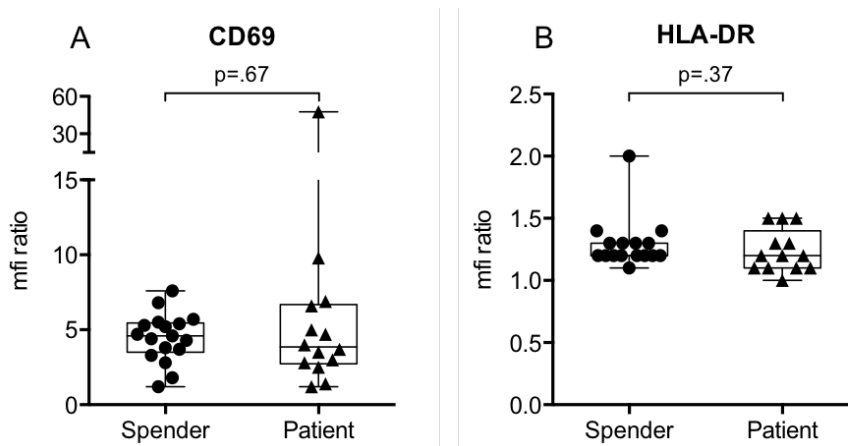


Abbildung 4-4 Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 (A) und HLA-DR (B) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

	<u>CD69</u>		<u>HLA-DR</u>	
MFI-Ratio	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=13
Minimum	1,20	1,20	1,10	1,00
Median	4,60	3,85	1,20	1,20
Maximum	7,60	47,60	2,00	1,50

Tabelle 4-5 Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 und HLA-DR auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

CD69 wurde von STS-Patienten in ähnlicher Intensität wie von gesunden Spendern exprimiert. Beide Gruppen wiesen insgesamt nur niedrige Werte für die Expressionsintensität von CD69 auf.

Im Durchschnitt wurde HLA-DR bei einer medianen MFI-Ratio von kleiner als 1,5 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen nicht exprimiert.

4.1.6 Expression von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren

Die NK-Zell-Aktivierung beruht außerdem auf einem ständigen Wechselspiel zwischen aktivierenden Rezeptoren, die die zytotoxische Aktivität initiieren, und inhibierenden Rezeptoren, die die zytotoxische Aktivität hemmen [31, 131] (s. Kapitel 1.2.3). So wurde als weitere mögliche Ursache für die reduzierte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen von STS-Patienten Veränderungen ihrer Rezeptorausstattung, wie z.B. eine reduzierte Expression von aktivierenden oder eine erhöhte Expression von inhibierenden Rezeptoren, in Betracht gezogen und durchflusszytometrisch ermittelt.

4.1.6.1 Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren und das Adapterprotein CD3 ζ

Die NCRs besitzen die Fähigkeit, weitgehend unabhängig von anderen aktivierenden Rezeptoren hochwirksame zytotoxische Effekte gegenüber Tumorzellen zu induzieren. Die Signale werden dabei unter anderem durch das Adapterprotein CD3 ζ vermittelt [51].

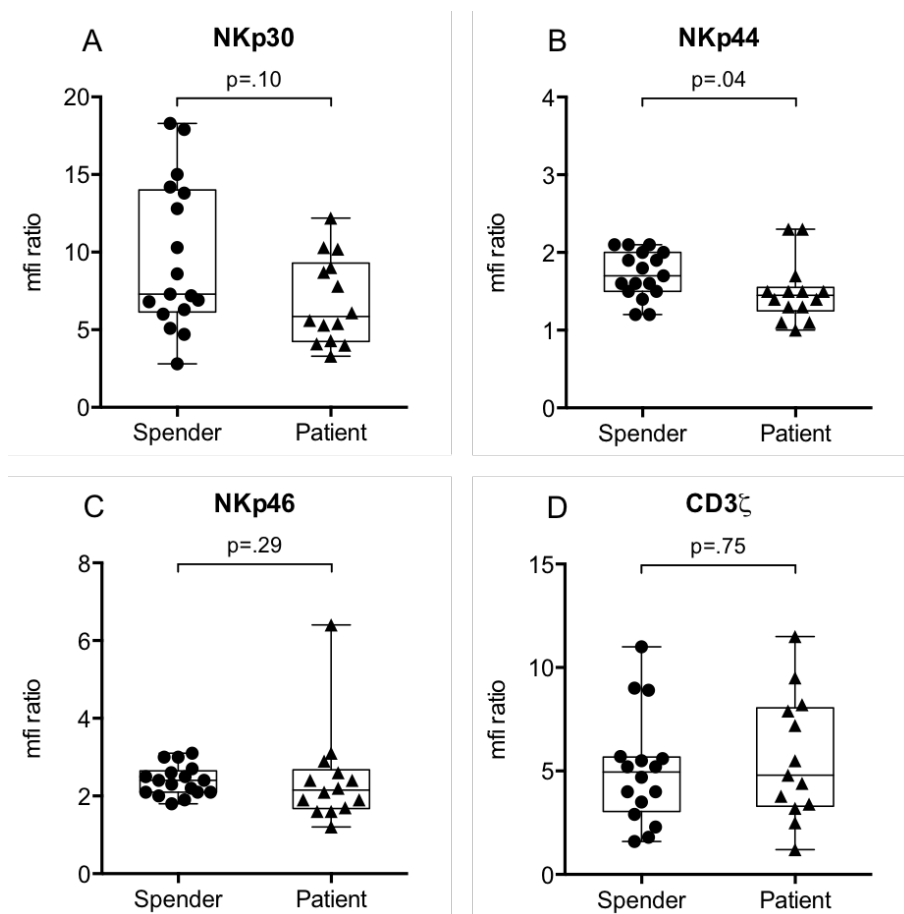


Abbildung 4-5 Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 (A), NKp44 (B), NKp46 (C) und des Signal-Adapterproteins CD3 ζ (D) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

MFI-Ratio	NKp30		NKp44		NKp46		CD3 ζ	
	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=13
Minimum	2,80	3,30	1,20	1,00	1,80	1,20	1,60	1,20
Median	7,30	5,85	1,70	1,45	2,40	2,15	4,95	4,80
Maximum	18,30	12,20	2,10	2,30	3,10	6,40	11,00	11,50

Tabelle 4-6 Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und des Signal-Adapterproteins CD3 ζ auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

Sowohl CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen gesunder Spender als auch NK-Zellen von Patienten exprimierten NKp30 und NKp46 konstitutiv auf ihrer Oberfläche. Für NKp30 zeigten beide Gruppen sehr variable MFI-Ratio-Werte. Trotz tendenziell reduzierter Expression von NKp30 auf Patienten-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die Expressionsintensitäten von NKp46 zeigten ähnliche Werte.

Im Gegensatz dazu wurde NKp44 bei beiden Gruppen nur auf einem Teil der CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen exprimiert. Im Durchschnitt war die Expressionsintensität von NKp44 auf den Patienten-Zellen signifikant niedriger als auf Zellen gesunder Spender.

CD3 ζ wurde von allen Probanden in etwa gleicher Intensität exprimiert.

4.1.6.2 ITAM-unabhängige aktivierende Rezeptoren

Weitere Rezeptoren, die zur Erkennung und effektiven Eliminierung von Tumorzellen beitragen, sind NKG2D und die koaktivierenden Rezeptoren 2B4, DNAM-1 und CD2 (s. Kapitel 1.2.3.2). Desweiteren wurde die Expression von CD8 auf NK-Zellen untersucht. CD8 ist eigentlich ein Marker für zytotoxische T-Lymphozyten, wird aber dennoch auf ca. 30% der NK-Zellen exprimiert und geht mit einer stärkeren zytolytischen Fähigkeit der Zellen einher [132]. Deshalb wurden auch diese Rezeptoren hinsichtlich der Expressionsintensität auf $CD56^{\text{dim}}CD16^{\text{bright}}$ -Zellen untersucht:

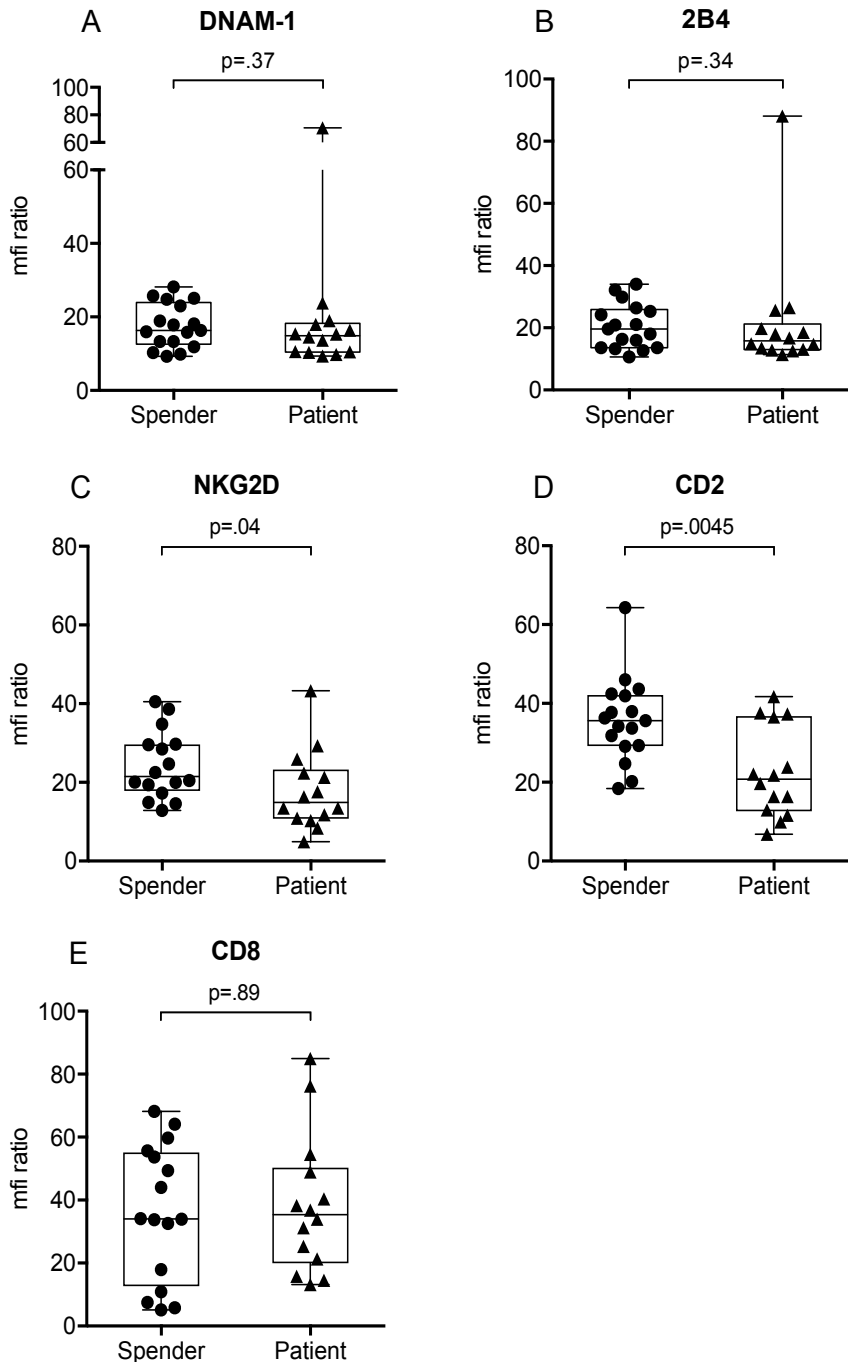


Abbildung 4-6 Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM- 1 (A), 2B4 (B), NKG2D (C), CD2 (D) und CD8 (E) auf $CD56^{\text{dim}}CD16^{\text{bright}}$ -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

Ergebnisse

MFI-Ratio	<u>DNAM-1</u>		<u>2B4</u>		<u>NKG2D</u>	
	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=17	Patient n=14
Minimum	9,30	9,40	10,60	11,40	12,90	4,90
Median	16,30	14,90	19,60	15,80	21,50	14,90
Maximum	28,20	70,60	34,00	88,10	40,50	43,30

MFI-Ratio	<u>CD2</u>		<u>CD8</u>	
	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=14
Minimum	18,40	6,80	5,10	13,20
Median	35,60	20,75	34,00	35,35
Maximum	64,30	41,70	68,20	84,97

Tabelle 4-7 Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM- 1, 2B4, NKG2D, CD2 und CD8 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

Alle ITAM-unabhängigen Rezeptoren wurden sowohl auf Patienten-Zellen als auch auf Zellen gesunder Spender exprimiert. Die Werte der Expressionsintensitäten von DNAM-1 und 2B4 waren bei beiden Gruppen vergleichbar. Für NKG2D konnte eine reduzierte Expression des Rezeptors auf Patienten-Zellen festgestellt werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Auch die Expression von CD2 war auf Patientenzellen sehr signifikant niedriger als auf Zellen gesunder Spender. CD8 wurde auf CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen aller gesunden Spender und Patienten exprimiert. Die Expressionsdichte nahm zwar sehr variable Werte an, war insgesamt jedoch ähnlich stark ausgeprägt.

4.1.6.3 Inhibierende Rezeptoren

Als nächstes wurde die Expression des inhibitorischen CD94/NKG2A-Rezeptors und PD-1 ermittelt. Hierfür wurde die Expression von CD94 und NKG2A je einzeln gemessen.

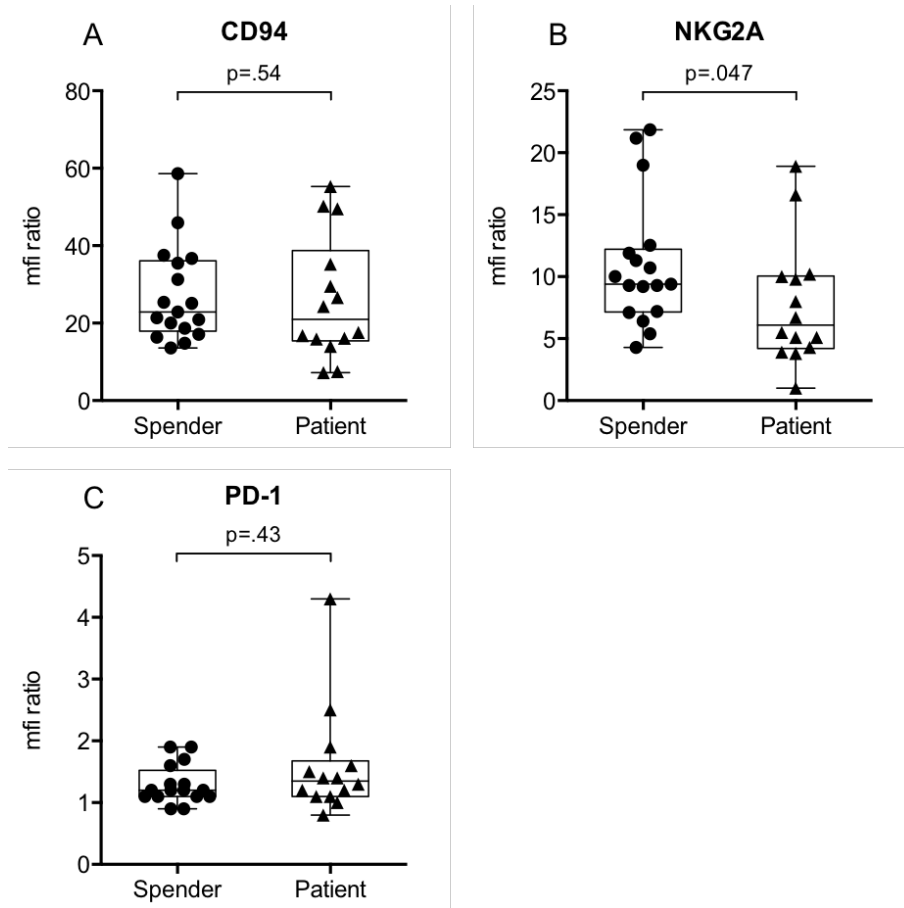


Abbildung 4-7 Expressionsdichte der inhibitorischen Rezeptoren CD94 (A), NKG2A (B) und PD-1 (C) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

MFI-Ratio	CD94		NKG2A		PD-1	
	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=13	Spender n=16	Patient n=13
Minimum	13,60	7,20	4,30	1,00	1,00	0,80
Median	22,90	20,95	9,40	6,10	1,20	1,35
Maximum	58,63	55,30	21,86	18,90	1,90	4,30

Tabelle 4-8 Expressionsdichte inhibitorischer Rezeptoren CD94, NKG2A und PD-1 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

Die Expression von CD94 und NKG2A konnte auf CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen beider Gruppen nachgewiesen werden. Während die Expressionsintensität des CD94-Rezeptors bei den Gruppen vergleichbare Werte aufwies, ergab sich eine signifikant schwächere Expression von NKG2A auf Patienten-Zellen.

PD-1 wurde nur von 5 gesunden Spendern und 4 Patienten auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen minimal exprimiert. Signifikante Unterschiede konnten hierbei nicht festgestellt werden.

4.1.7 Immunphänotypisierung anhand weiterer Merkmale

Ein weiterer Schwerpunkt der Analyse war die Herausarbeitung weiterer Unterschiede bezüglich des Immunphänotyps der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -Population, die für die Funktion der Subpopulation relevant sein könnten. Hierfür wurden die Expression von Maturierungsmarkern und von Chemokinrezeptoren durchflusszytometrisch untersucht.

4.1.7.1 Maturierungsmarker

CD57, Tim-3, CD117 und CD27 dienen als Maß für den Reifegrad von NK-Zellen. Es wird angenommen, dass insbesondere NK-Zellen, die CD57 und Tim-3 auf ihrer Oberfläche tragen, den höchsten Reifegrad erreicht haben und somit ausdifferenziert sind. Ein höherer Reifegrad der Zellen wird dabei mit einem stärkeren zytotoxischen Potential korreliert [133, 134]. CD117 und CD27 hingegen markieren eher unreife NK-Zellen [135, 136].

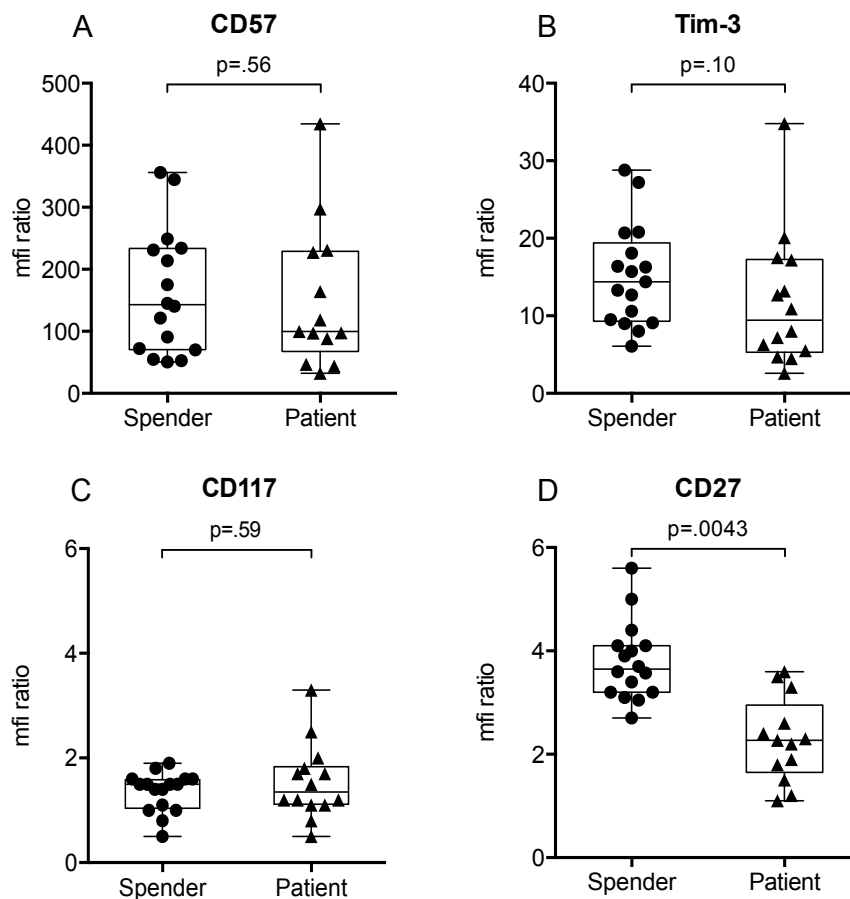


Abbildung 4-8 Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57 (A), Tim-3 (B), CD117 (C) und CD27 (D) auf $CD56^{dim}CD16^{bright}$ -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

MFI-Ratio	CD57		Tim-3		CD117		CD27	
	Spender n=16	Patient n=13	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=13
Minimum	50,80	32,40	6,10	2,60	0,50	0,50	2,27	1,10
Median	142,90	99,70	14,40	9,45	1,50	1,35	3,59	2,30
Maximum	356,20	434,70	28,80	34,80	1,90	3,30	5,00	5,40

Tabelle 4-9 Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57, Tim-3, CD117 und CD27 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

Sowohl CD57 als auch Tim-3 wurde auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen gesunder Spender und auf Patienten-Zellen deutlich exprimiert. Ein Vergleich zwischen den beiden Gruppen ergab für beide Marker keinen signifikanten Unterschied.

CD117 wurde nur teilweise auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen exprimiert. Die MFI-Ratio-Werte der Patienten-Zellen zeigten dabei sehr variable Werte, waren aber insgesamt vergleichbar mit den MFI-Ratio-Werten gesunder Spender.

Bei der Analyse der Expressionsdichte von CD27 zeigte sich eine reduzierte Expressionsintensität des Markers auf Patienten-Zellen. Der Unterschied war sehr signifikant.

4.1.7.2 Chemokinrezeptoren

Chemokine gehören zu den Zytokinen und bilden eine Gruppe aus über 50 verschiedenen Signalproteinen, die an der Rekrutierung und Migration von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zum Tumor beteiligt sind. Dies geschieht über die Bindung an sogenannte Chemokinrezeptoren, wie z. B. CXCR6 und CX₃CR1 [137, 138].

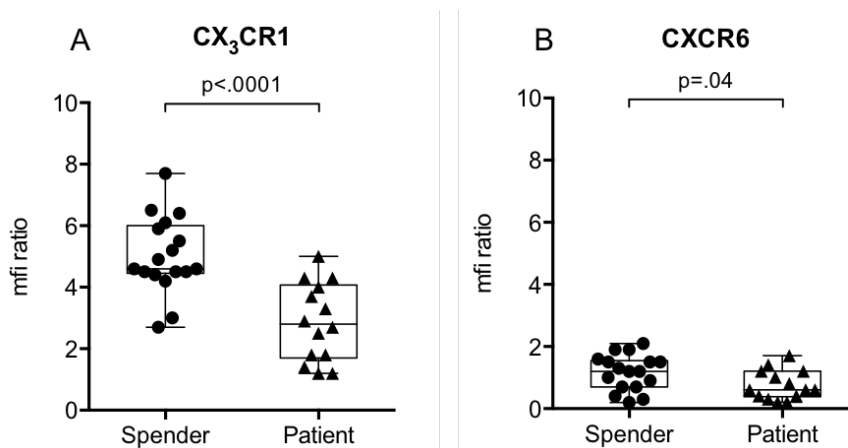


Abbildung 4-9 Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX₃CR1 (A) und CXCR6 (B) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

MFI-Ratio	CX ₃ CR1		CXCR6	
	Spender n=17	Patient n=14	Spender n=16	Patient n=13
Minimum	2,70	1,20	0,20	0,20
Median	4,60	2,80	1,20	0,60
Maximum	7,70	5,00	2,10	1,70

Tabelle 4-10 Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX₃CR1 und CXCR6 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

CX₃CR1 wurde zwar insgesamt bei beiden Gruppen nur in geringer Dichte exprimiert, trotzdem konnte für Patienten-Zellen eine hoch signifikant niedrigere Expression von CX₃CR1 nachgewiesen werden. 3 Patienten zeigten keine Expression des Markers.

Auch für CXCR6 konnte eine signifikant niedrigere Expressionsdichte auf Patienten-Zellen festgestellt werden. Dennoch wird der Marker laut Definition (MFI-Ratio $\geq 1,5$) nur von 7 gesunden Spendern und von 1 Patient überhaupt exprimiert.

4.1.8 Analyse der zytotoxischen Funktion gegen Sarkom-Zelllinien

Zur Messung der zytotoxischen NK-Zell-Funktion wurden im Rahmen dieser Arbeit bisher nur K562-Zellen verwendet, um ein verlässliches Korrelat für die Zytotoxizität der NK-Zellen zu erhalten (s. Kapitel 3.5.1). In weiterführenden Experimenten wurde die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen gegenüber krankheitsspezifischeren Zielzellen, also Sarkom-Zelllinien, untersucht.

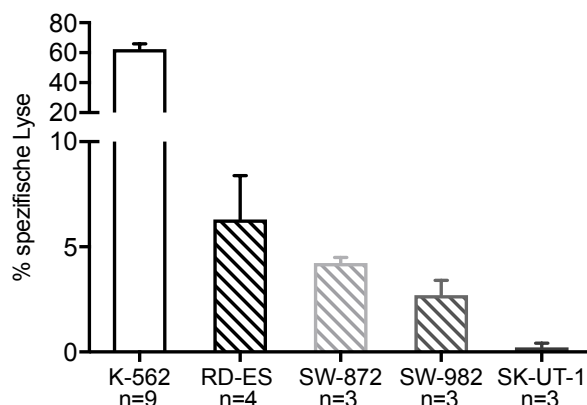


Abbildung 4-10 Zytotoxizität von NK-Zellen gesunder Spender gegenüber unterschiedlicher Sarkom-Zelllinien im Vergleich zu K562 bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).

NK-Zellen gesunder Spender zeigten gegenüber „klassischen“ Targetzellen, den K562-Zellen, eine hohe lytische Aktivität (s. Kapitel 4.1.2). Im Gegensatz dazu war die NK-Zell-Aktivität gegenüber allen 4 untersuchten Sarkom-Zelllinien erheblich eingeschränkt. Während die NK-Zellen gesunder Spender gegenüber SK-UT-1 überhaupt keine lytische Aktivität aufwiesen, zeigte sich für SW-982, SW-872 und RD-ES eine spezifische Lyse von weniger als 10%.

4.2 Effekte der Langzeitkultivierung von NK-Zellen bei STS-Patienten und gesunden Spendern mit Interleukin-2

Im nächsten Schritt wurden in Kooperation mit der Zellwerk GmbH Expansions- und Stimulationsversuche für die NK-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Immunzellen in einem abgeschlossenen IL-2-haltigen Zellkultursystem über mehrere Wochen kultiviert. Im Anschluss wurde der Anteil an CD3^{neg}-Zellen und der Anteil der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Subpopulation bestimmt und die zytolytische Funktion erneut gemessen. Außerdem wurden Veränderungen hinsichtlich des Gehalts an Effektormolekülen und des Immunphänotyps der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen nach Langzeitkultur analysiert. Ziel dabei war einerseits die Feststellung von Unterschieden im Verhalten der Immunzellen auf Expansion und Stimulation bei Patienten und gesunden Spendern und andererseits die Identifizierung von Rezeptoren, die für die Wiederherstellung der NK-Zell-Funktion relevant sind.

4.2.1 Expansion von NK-Zellen

Die Inkubation der Patienten-NK-Zellen in IL-2-haltigem Medium erbrachte – teils sogar für zwei unabhängig angesetzte Expansionen des gleichen Patienten – unterschiedliche Ergebnisse für den NK-Zell-Gehalt des Zellprodukts. In den meisten Fällen kam es zu einer isolierten Proliferation der CD3^{neg}-Zellpopulation und konsekutiver Proliferation der CD56^{dim}CD16^{bright}-Subpopulation und damit zum gewünschten Effekt (erfolgreiche Expansion). Allerdings zeigte sich bei einem geringen Teil der Expansionen sowohl eine Zunahme der CD3^{neg}-Zellpopulation als auch der CD3^{pos}-Zellpopulation (T-Lymphozyten). Innerhalb der CD3^{neg}-Zellen proliferierte dann vor allem die CD56^{dim}CD16^{neg}-Subpopulation (nicht erfolgreiche Expansion). Beispiele hierfür sind in Abbildung 4-11 dargestellt.

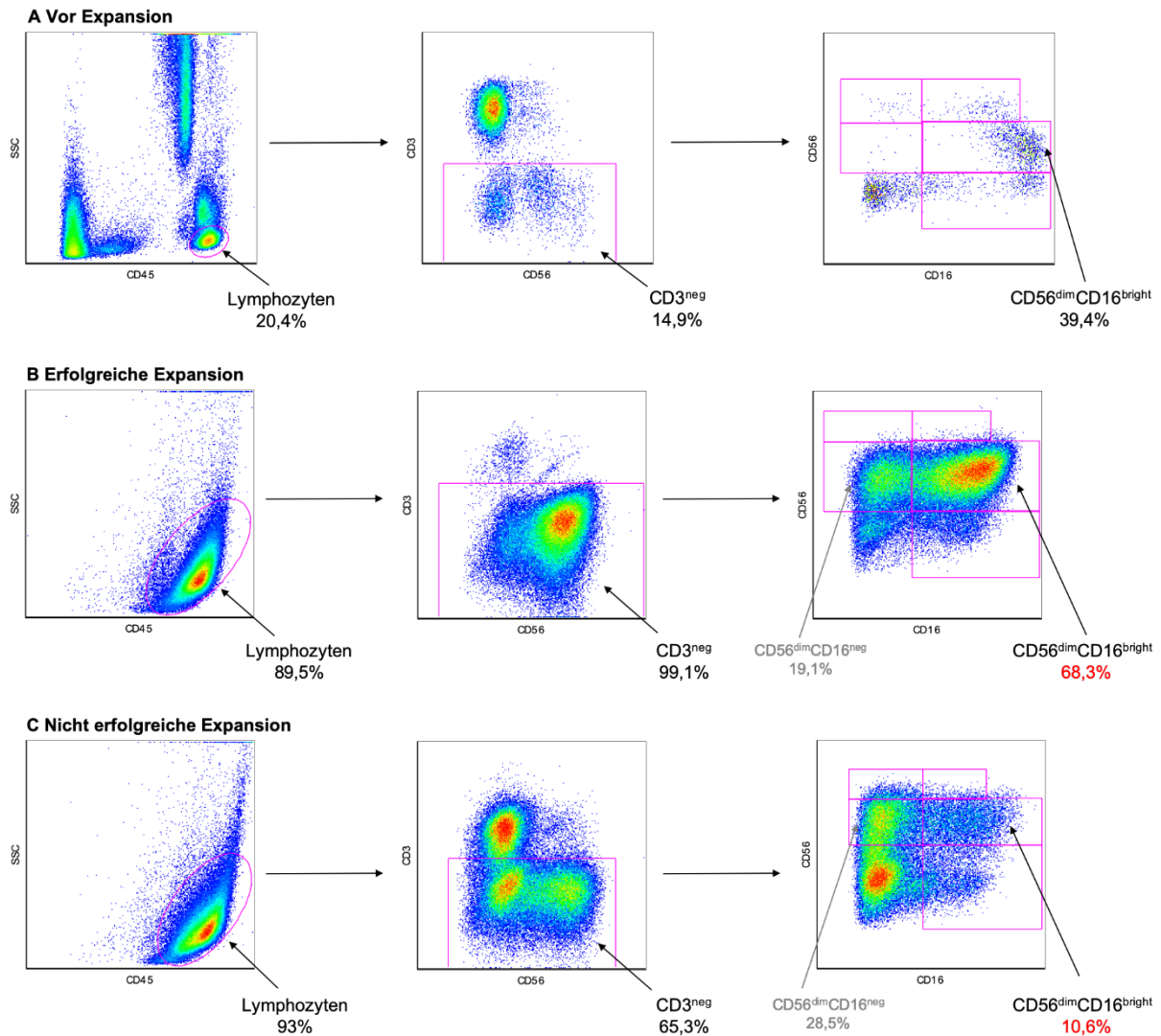


Abbildung 4-11 Effekte der *ex vivo*-Expansion in IL-2-haltigem Medium in Bezug auf Lymphozyten, CD3^{neg}-Zellen und CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen. Vor Expansion (A), Erfolgreiche Expansion (B), Nicht erfolgreiche Expansion (C).

Für die weiteren Analysen der expandierten Zellen in dieser Arbeit wurde stets Probenmaterial ausgewählt, das mit einer isolierten Expansion der CD3^{neg}-Zellpopulation und der CD56^{dim}CD16^{bright} assoziiert war (s. Kapitel 4.2.2).

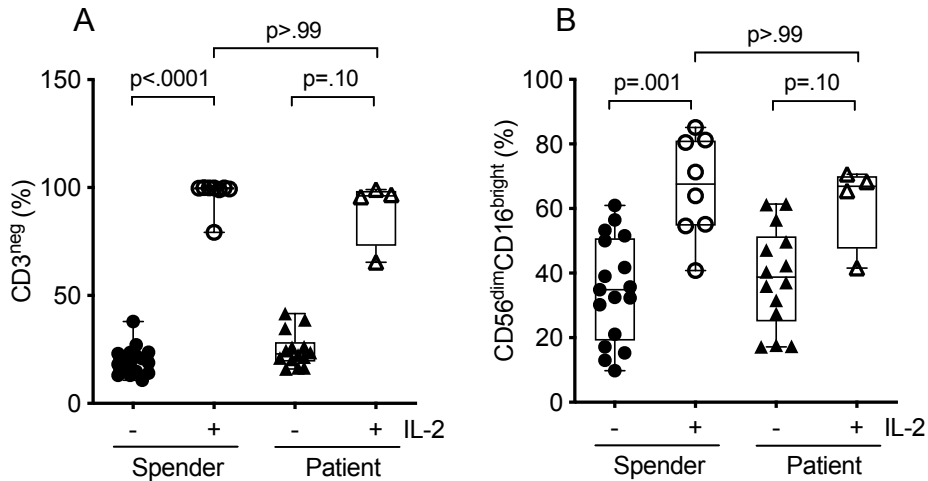


Abbildung 4-12 Vergleich des Anteils an CD3^{neg}-Zellen an Lymphozyten (A) und CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen an CD3^{neg}-Zellen (B) vor und nach IL-2-haltiger Langzeitkultivierung bei STS-Patienten und gesunden Spendern.

- / + IL-2	%CD3 ^{neg} an PBMCs				%CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} an CD3 ^{neg}			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=17	n=8	n=14	n=4	n=17	n=8	n=14	n=4
Minimum	10,80	79,30	15,90	65,40	9,78	40,80	17,20	41,60
Median	18,90	99,80	23,00	96,20	34,90	67,60	38,75	66,90
Maximum	38,00	100	41,60	99,10	61,40	85,10	61,40	70,60

Tabelle 4-11 Vergleich des Anteils an CD3^{neg}-Zellen an Lymphozyten und CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen an CD3^{neg}-Zellen vor und nach IL-2-haltiger Langzeitkultivierung bei STS-Patienten und gesunden Spendern.

Durch die IL-2-basierte Langzeitkultur kam es bei gesunden Spendern zu einer hochsignifikanten Zunahme der CD3^{neg}-Zellpopulation auf bis zu 100% im Zellprodukt. Der Anteil an CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen nach Expansion war hoch signifikant höher als vor der Inkubation mit IL-2. Für Patientenzellen zeigte sich ebenfalls eine deutliche Zunahme sowohl der CD3^{neg}-Zellpopulation im Zellprodukt, als auch eine Zunahme des Anteils an CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen an CD3^{neg}-Zellen. Statistische Signifikanz konnte jedoch nicht erreicht werden. Dennoch ergab ein Vergleich zwischen Patienten und gesunden Spendern hinsichtlich der CD3^{neg}-Populationen und der CD56^{dim}CD16^{bright}-Populationen nach Expansion vergleichbare Werte.

4.2.2 Induktion der zytotoxischen NK-Zell-Funktion

Zur Beurteilung des Erfolgs der Aktivierung im Rahmen der Langzeitkultur erfolgten erneut Messungen zur Zytotoxizität. Im Anschluss wurden die Ergebnisse mit den Ergebnissen der Messungen, die vor Aktivierung der Zellen erfolgt waren, verglichen.

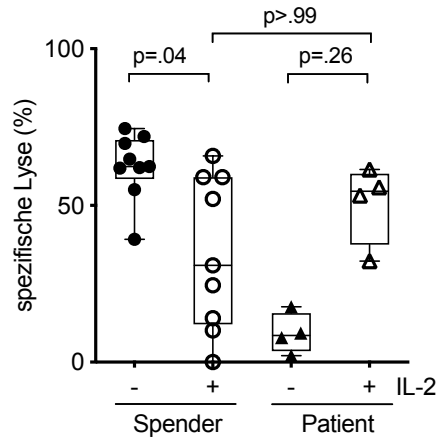


Abbildung 4-13 NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2 bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).

% spez. Lyse - / + IL-2	Spender		Patient	
	- n=9	+ n=9	- n=4	+ n=4
Minimum	39,20	0,00	2,07	32,24
Median	62,40	30,90	8,55	54,50
Maximum	74,50	65,80	17,70	61,51

Tabelle 4-12 NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2 (in % spezifische Lyse).

Für Patienten zeigte sich eine deutlich höhere NK-Zell-Aktivität nach Stimulation der NK-Zellen durch IL-2. Statistisch signifikant unterschiedlich waren die Ergebnisse nicht. Bei gesunden Spendern konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Hier war die lytische Aktivität nach IL-2-Aktivierung signifikant niedriger als davor. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass bei der Messung der NK-Zell-Aktivität der Spenderzellen vor und nach Aktivierung unterschiedliche präanalytische Bedingungen vorlagen (kryokonserviert vs. nicht-kryokonserviert). Die Werte von Patienten und gesunden Spendern nach Stimulation unterschieden sich nicht signifikant. Für Patientenzellen war dieser Effekt auch nur für Proben nachweisbar, die im Rahmen der Expansion eine Zunahme der CD56^{dim}CD16^{bright}-Subpopulation zeigten. Im Gegensatz dazu, konnte für Patientenzellen, aus deren Expansion eine Zunahme der CD56^{dim}CD16^{neg}-Subpopulation resultierte (s. Kapitel 4.2.1), entweder keine oder eine nur geringfügige Steigerung der zytotoxischen Aktivität beobachtet werden (Vgl. Abb. 4-14).

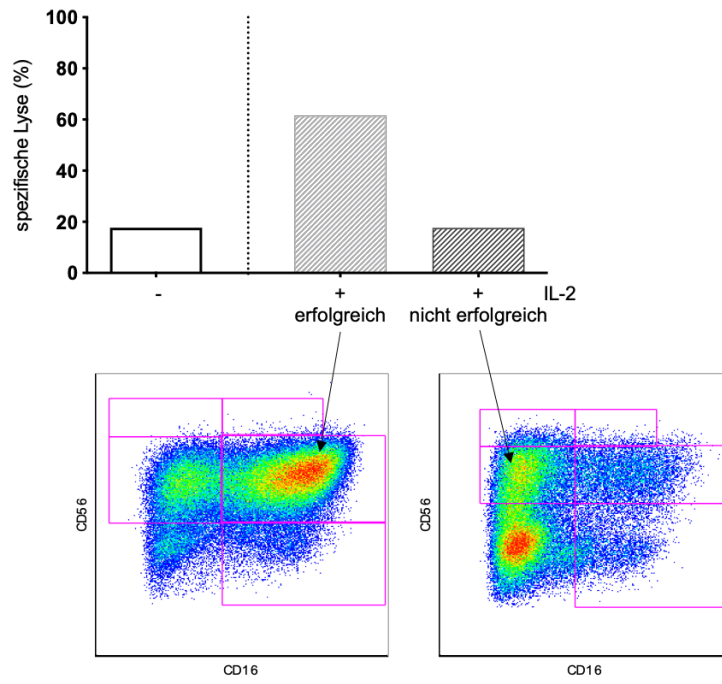


Abbildung 4-14
Subpopulation.

NK-Zell-Zytotoxizität von STS-Patienten in Abhängigkeit von der expandierten

4.2.3 Messung des Gehalts an Effektormolekülen nach Aktivierung

Zur Klärung der Frage, ob die Aktivierung der Immunzellen zu einem höheren Gehalt an Effektormolekülen und damit zur Augmentation der Zytotoxizität führt, wurden Perforin, Granzym A und B erneut intrazellulär gemessen und die Ergebnisse mit den Daten vor der Aktivierung verglichen.

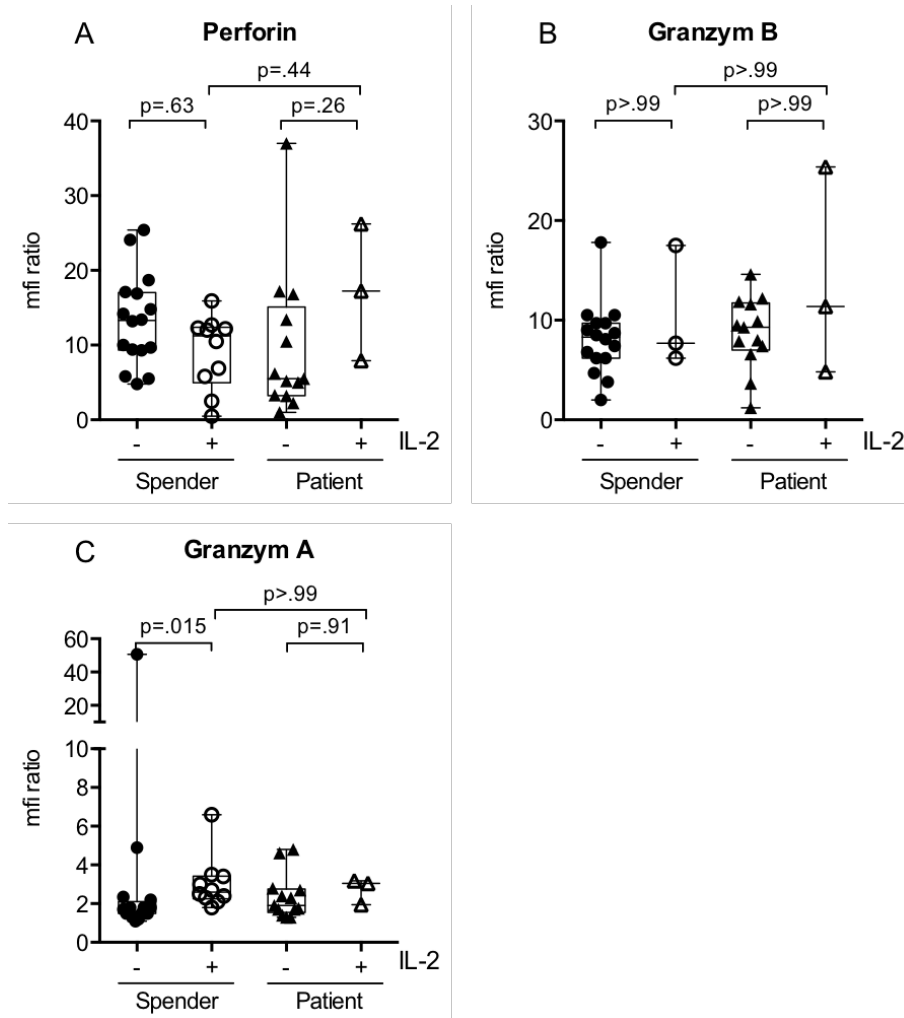


Abbildung 4-15 Gehalt an den Effektormolekülen Perforin (A), Granzym B (B) und Granzym A (C) in CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>Perforin</u>				<u>Granzym B</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=16	n=10	n=13	n=3	n=16	n=3	n=13	n=3
Minimum	4,80	0,50	1,00	7,92	2,00	6,20	1,20	4,81
Median	13,30	11,25	5,50	17,25	8,30	7,70	9,30	11,37
Maximum	25,40	15,90	37,01	26,22	17,80	17,50	14,60	25,38

Granzym A				
MFI-Ratio - / + IL-2	Spender		Patient	
	-	+	-	+
	n=16	n=10	n=13	n=3
Minimum	1,10	1,80	1,30	1,95
Median	1,60	2,60	1,90	3,05
Maximum	50,60	6,60	4,80	3,18

Tabelle 4-13 Gehalt an den Effektormolekülen Perforin, Granzym B und Granzym A in CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

Der Gehalt an Perforin und Granzym B änderte sich nicht durch die Stimulation der NK-Zellen. NK-Zellen gesunder Spender enthielten jedoch nach Aktivierung signifikant mehr Granzym A als zuvor.

4.2.4 Veränderungen der Expression von Aktivitätsmarkern

IL-2 führt bei gesunden Spendern zur Induktion der Expression von CD69 und HLA-DR. Eine Zunahme der Expression dieser Marker zeigt also eine Reaktion der Zellen auf einen IL-2-Stimulus und damit einen aktivierten Zustand der Zellen an [130, 139]. Aus diesem Grund wurde die Expression der beiden Marker erneut gemessen und mit den Ergebnissen von vor der Langzeitkultur verglichen.

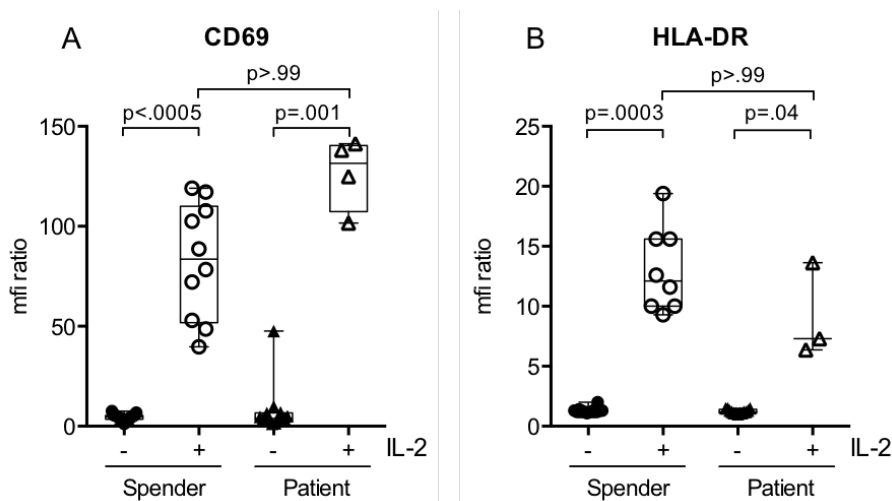


Abbildung 4-16 Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 (A) und HLA-DR (B) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>CD69</u>				<u>HLA-DR</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=17	n=10	n=14	n=4	n=16	n=8	n=13	n=3
Minimum	1,20	39,70	1,20	101,60	1,10	9,30	1,00	6,37
Median	4,60	83,55	3,85	131,50	1,20	12,10	1,20	7,29
Maximum	7,60	119,10	47,60	141,20	2,00	19,40	1,50	13,64

Tabelle 4-14 Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 und HLA-DR auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

Beide Marker zeigten bei gesunden Spendern und Patienten signifikante Veränderungen der Expression nach Aktivierung der Zellen. Wurde HLA-DR zunächst nicht exprimiert, konnte eine deutliche Expression nach Aktivierung beobachtet werden. Bei Patienten war der Unterschied signifikant, bei gesunden Spendern hoch signifikant. Für CD69 ergab sich eine hoch signifikante Zunahme der Expressionsintensität bei beiden Gruppen. Ein Vergleich der Werte von Patienten und gesunden Spendern nach Aktivierung ergab bei keinem der Marker einen signifikanten Unterschied.

4.2.5 Veränderungen der Expression aktivierender und inhibierender Rezeptoren

Zur Identifizierung von Rezeptoren, die für die Aktivierung der NK-Zellen und damit der Effektorfunktionen relevant sind, wurden die durchflusszytometrischen Messungen, die vor Beginn der Langzeitkultur gemessen worden waren, mit den Ergebnissen nach Beendigung der Kultur verglichen.

4.2.5.1 Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren und das Adapterprotein CD3 ζ

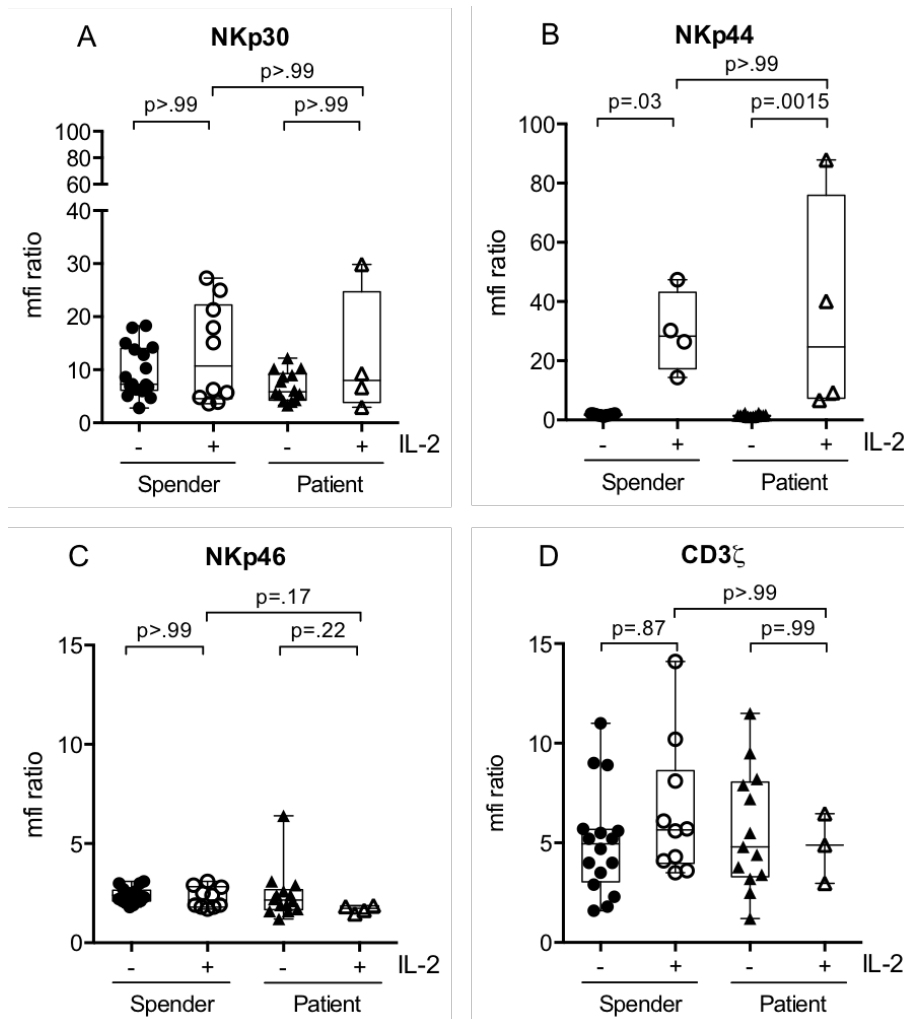


Abbildung 4-17 Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 (A), NKp44 (B), NKp46 (C) und des Signal-Adapterproteins CD3 ζ (D) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>NKp30</u>				<u>NKp44</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=17	n=10	n=14	n=4	n=17	n=4	n=14	n=4
Minimum	2,80	3,60	3,30	2,92	1,20	14,30	1,00	6,66
Median	7,30	10,70	5,85	7,98	1,70	28,30	1,45	24,65
Maximum	18,30	27,30	12,20	29,87	2,10	47,40	2,30	87,79

MFI-Ratio - / + IL-2	NKp46				CD3ζ			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=17	n=10	n=14	n=4	n=16	n=10	n=13	n=3
Minimum	1,80	1,70	1,20	1,45	1,60	3,50	1,20	2,97
Median	2,40	2,15	2,15	1,73	4,95	5,65	4,80	4,89
Maximum	3,10	3,10	6,40	1,88	11,00	14,10	11,50	6,47

Tabelle 4-15 Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und des Signal-Adapterproteins CD3ζ auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

Die Expressionsdichte von NKp30 und NKp46 zeigten keine Veränderungen durch die Aktivierung der Zellen.

Die Expression von NKp44 war durch die Stimulation mit IL-2 deutlich induzierbar. Stimulierte Immunzellen zeigten eine signifikant höhere Expressionsintensität des Markers als unstimulierte Zellen. Bei Patienten-Zellen war der Unterschied sogar sehr signifikant. Ein Vergleich der Werte von Patienten und gesunden Spendern nach Aktivierung ergab keinen Unterschied.

Für CD3ζ konnte keine signifikante Veränderung durch die Aktivierung nachgewiesen werden.

4.2.5.2 ITAM-unabhängige aktivierende Rezeptoren

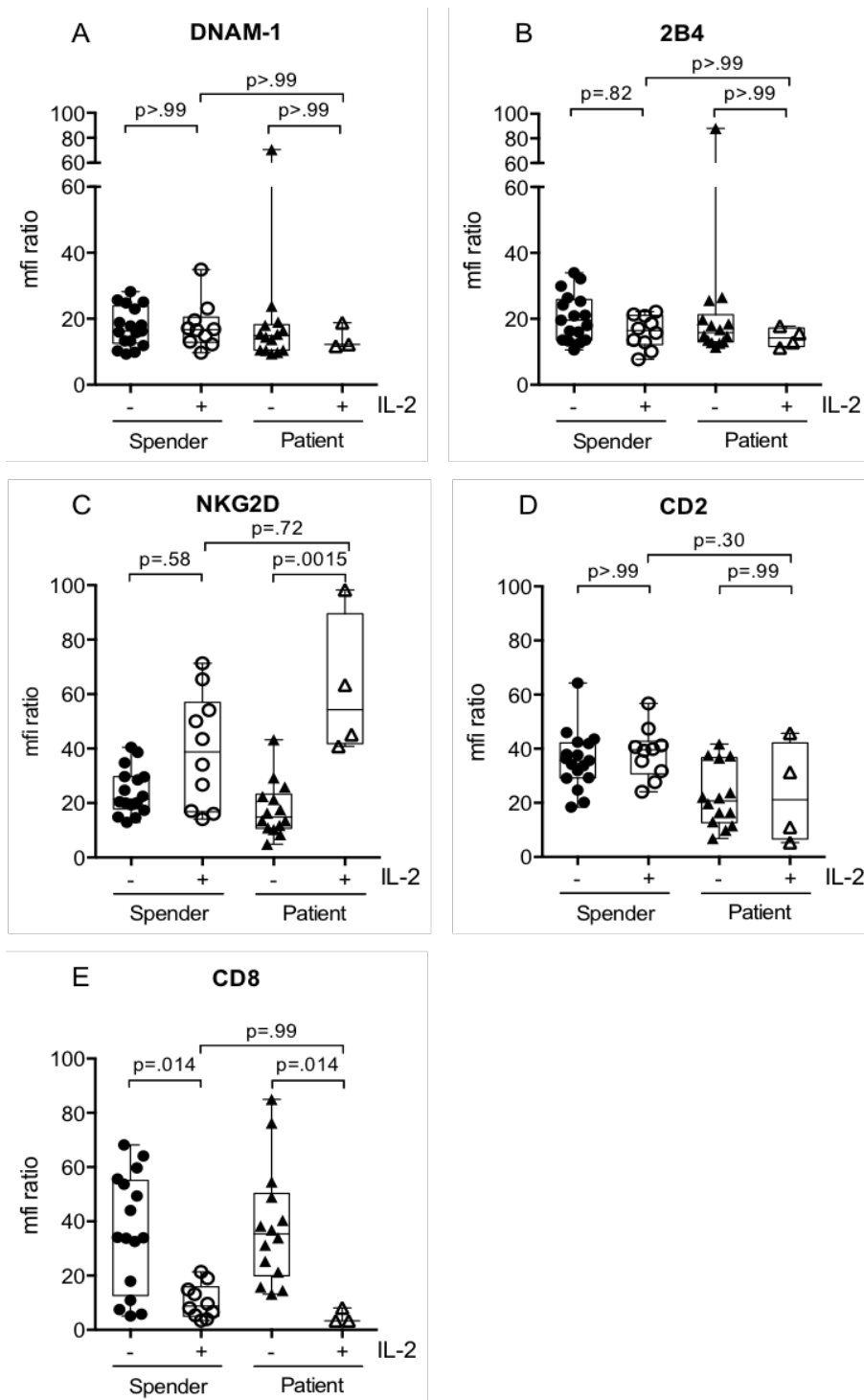


Abbildung 4-18 Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM-1 (A), 2B4 (B), NKG2D (C), CD2 (D) und CD8 (E) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>DNAM</u>				<u>2B4</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=17	n=10	n=14	n=3	n=17	n=10	n=14	n=4
Minimum	9,30	9,70	9,40	11,72	10,60	7,70	11,40	11,18
Median	16,30	16,73	14,90	12,22	19,60	16,43	15,80	14,19
Maximum	28,20	34,90	70,60	18,79	34,00	22,20	88,10	17,79

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>NKG2D</u>				<u>CD2</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=16	n=10	n=14	n=4	n=17	n=10	n=14	n=4
Minimum	12,90	14,10	4,90	40,77	18,40	24,10	6,80	5,27
Median	21,50	38,80	14,90	54,24	35,60	39,60	20,75	21,14
Maximum	40,50	71,30	43,30	98,24	64,30	56,70	41,70	45,73

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>CD8</u>			
	Spender		Patient	
	-	+	-	+
	n=16	n=10	n=14	n=3
Minimum	5,10	3,40	13,20	3,35
Median	34,00	8,81	35,35	3,39
Maximum	68,20	21,36	84,97	8,09

Tabelle 4-16 Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM- 1, 2B4, NKG2D, CD2 und CD8 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

Für NKG2D zeigte sich sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Spendern eine Induktion der Expression des Rezeptors durch die Stimulation. Der Unterschied war jedoch nur bei Patienten statistisch sehr signifikant. So ist auch beim Vergleich der Werte von stimulierten Zellen gesunder Spender und von Patienten-Zellen eine stärkere Induzierbarkeit auf Patienten-Zellen erkennbar. Signifikant ist dieser Unterschied jedoch nicht.

DNAM-1 und 2B4 wurden von allen Gruppen ähnlich stark exprimiert.

Auch die Expression von CD2 blieb bei gesunden Spendern und Patienten nach Stimulation der NK-Zellen konstant. Auch nach Aktivierung exprimierten NK-Zellen gesunder Spender CD2 stärker auf ihrer Oberfläche als Patientenzellen. Dieser Unterschied war trotz des deutlichen Unterschieds nicht signifikant. Bei der Analyse der Expression von CD8 zeigte sich bei gesunden Spendern und Patienten eine signifikante Herunterregulation des Markers durch die Aktivierung der Immunzellen. Die Werte der Expressionsintensitäten von Patienten nach Aktivierung waren den Werten von gesunden Spendern nach Aktivierung ähnlich.

4.2.5.3 Inhibierende Rezeptoren

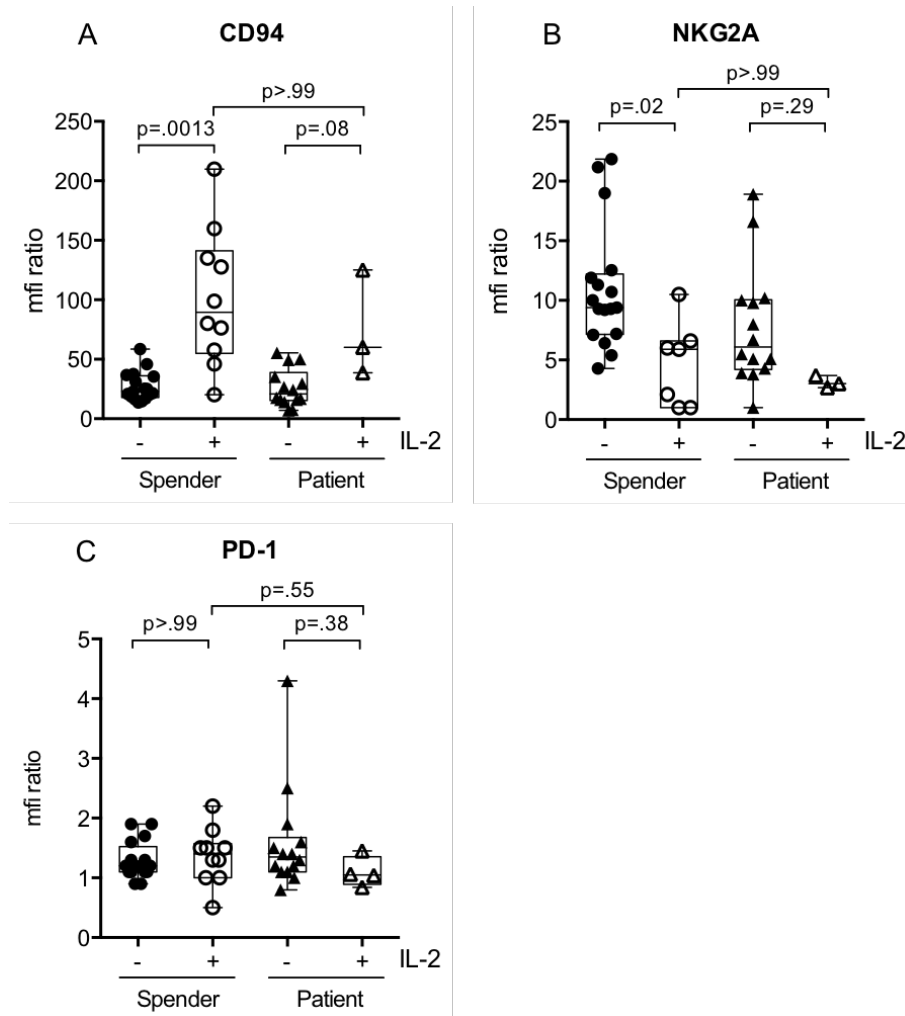


Abbildung 4-19 Expressionsdichte der inhibierenden Rezeptoren CD94 (A), NKG2A (B) und PD-1 (C) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

MFI-Ratio - / + IL-2	CD94				NKG2A			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=17	n=10	n=14	n=3	n=17	n=7	n=14	n=3
Minimum	13,60	20,30	7,20	38,56	4,30	1,00	1,00	2,68
Median	22,90	89,48	20,95	59,98	9,40	5,90	6,10	3,01
Maximum	58,63	209,90	55,30	125,10	21,86	10,50	18,90	3,70

MFI-Ratio - / + IL-2	PD-1			
	Spender		Patient	
	-	+	-	+
	n=16	n=10	n=14	n=4
Minimum	1,00	0,50	0,80	0,84
Median	1,20	1,40	1,35	1,05
Maximum	1,90	2,20	4,30	1,45

Tabelle 4-17 Expressionsdichte der inhibierenden Rezeptoren CD94, NKG2A und PD-1 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

Die Expressionsdichte von NKG2A zeigte nach Aktivierung der Immunzellen niedrigere MFI-Ratio-Werte als zuvor. Signifikant war dieses Ergebnis jedoch nur für CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen gesunder Spender. Durch die Stimulation wurde somit eine Herunterregulation des inhibierenden Rezeptors erreicht, sodass zwischen gesunden Spendern und Patienten keine Differenz mehr bestand.

Im Gegensatz dazu wurde für CD94 eine Hochregulation der Expression nach Stimulation festgestellt. Der Unterschied war jedoch erneut nur für die Zellen gesunder Spender sehr signifikant. Die Expressionsintensitäten von CD94 nach Aktivierung waren bei beiden Gruppen vergleichbar, wobei die Werte sehr variabel waren. Die MFI-Ratio-Werte für PD-1 blieben weitgehend konstant.

4.2.6 Veränderung des Immunphänotyps anhand weiterer Merkmale

Nach Expansion und Aktivierung der NK-Zellen war auch interessant, welche weiteren Effekte die Inkubation mit IL-2 auf den Immunphänotyp der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Population von STS-Patienten und NK-Zellen gesunder Spender hatten.

4.2.6.1 Maturierungsmarker

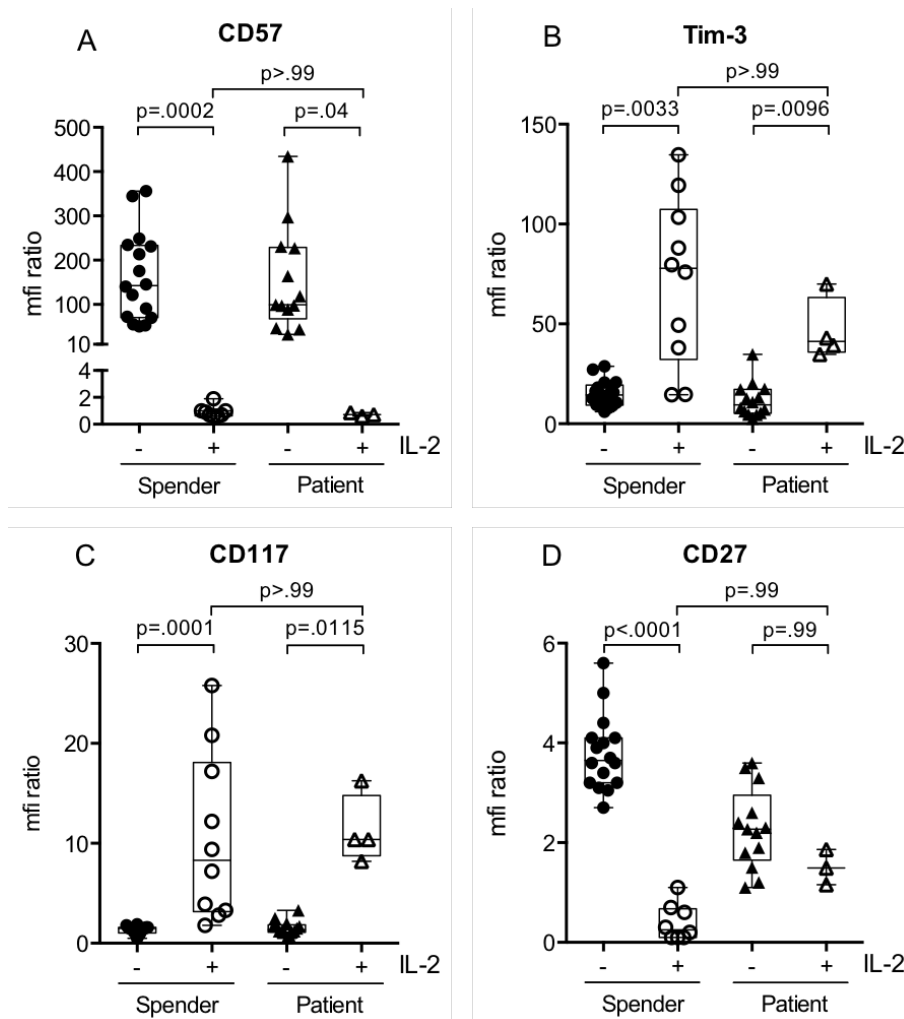


Abbildung 4-20 Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57 (A), Tim-3 (B), c-kit (C) und CD27 (D) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>CD57</u>				<u>Tim-3</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=16	n=8	n=13	n=3	n=17	n=10	n=14	n=4
Minimum	50,80	0,60	32,40	0,62	6,10	14,58	2,60	34,80
Median	142,90	0,80	99,70	0,71	14,40	77,80	9,45	41,19
Maximum	356,20	1,90	434,70	0,88	28,80	134,70	34,80	69,92

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>CD117</u>				<u>CD27</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=16	n=10	n=14	n=4	n=16	n=8	n=13	n=3
Minimum	0,50	1,80	0,50	8,21	2,27	0,10	1,10	1,16
Median	1,50	8,30	1,35	10,39	3,59	0,25	2,30	1,49
Maximum	1,90	25,80	3,30	16,26	5,00	1,10	5,40	1,87

Tabelle 4-18 Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57, Tim-3, c-kit und CD27 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

Während unstimulierte NK-Zellen eine sehr starke und variable Expression von CD57 aufwiesen, konnte für stimulierte NK-Zellen keine Expression von CD57 auf ihrer Oberfläche nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war für Zellen gesunder Spender hochsignifikant, für Patienten-Zellen signifikant. Die Aktivierung der Immunzellen geht also mit dem Verlust der CD57-Expression einher.

Im Gegensatz dazu zeigte sich für Tim-3 und CD117 eine Zunahme der Expressionsintensitäten durch die Stimulation der NK-Zellen. Dieser Effekt war für Patienten und gesunde Spender nachweisbar. Für Tim-3 ergab sich für beide Gruppen eine sehr signifikante Zunahme der Expressionsdichte. Für CD117 war der Unterschied bei gesunden Spendern sogar hochsignifikant und bei Patienten signifikant. Außerdem muss erwähnt werden, dass die Werte gesunder Spender nach Aktivierung bei beiden Markern eine sehr hohe Variabilität aufwiesen. Beim Vergleich der stimulierten Zellen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Für die Expression von CD27 konnte eine hochsignifikante Reduktion der Expressionsdichte nach Stimulation bei gesunden Spendern festgestellt werden. Auch bei Patientenzellen ist eine Tendenz zur Herunterregulation erkennbar. Ein signifikanter Unterschied bestand hier jedoch nicht. Dennoch scheinen Patienten-Zellen CD27 nach Stimulation tendenziell stärker zu exprimieren als Zellen gesunder Spender. Dies war ebenfalls nicht signifikant.

4.2.6.2 Chemokinrezeptoren

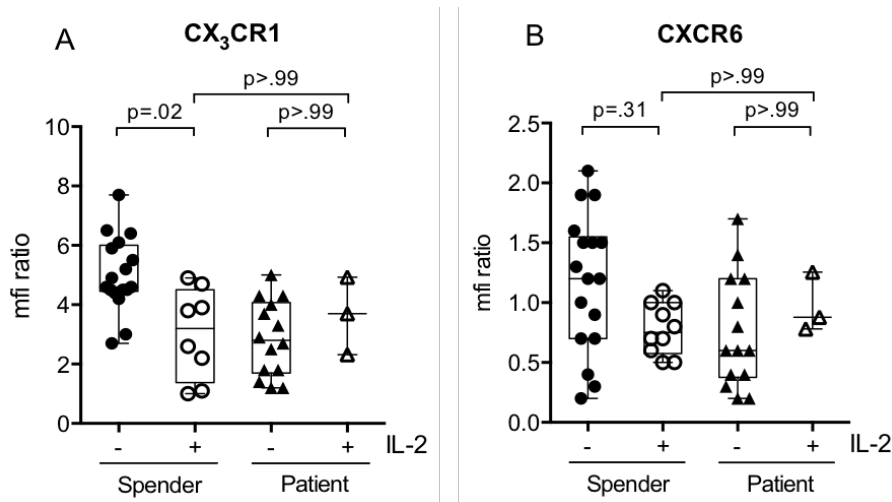


Abbildung 4-21 Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX₃CR1 (A) und CXCR6 (B) auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

MFI-Ratio - / + IL-2	<u>CX₃CR1</u>				<u>CXCR6</u>			
	Spender		Patient		Spender		Patient	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	n=17	n=8	n=14	n=3	n=17	n=10	n=14	n=3
Minimum	2,70	1,00	1,20	2,32	0,20	0,50	0,20	0,78
Median	4,60	3,20	2,80	3,70	1,20	0,75	0,60	0,88
Maximum	7,70	4,90	5,00	4,93	2,10	1,10	1,70	1,26

Tabelle 4-19 Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX₃CR1 und CXCR6 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.

CX₃CR1 wurde auf stimulierten CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen gesunder Spender signifikant niedriger exprimiert als auf unstimulierten Zellen. Auf Patienten-Zellen konnte dies Änderung nicht detektiert werden. So zeigt sich nach IL-2-Manipulation kein Unterschied zwischen gesunden Spendern und Patienten.

Für die Expressionsdichte von CXCR6 konnten keine signifikanten Veränderungen durch die Stimulation beobachtet werden. Nach Stimulation wurde der Marker jedoch von beiden Gruppen nicht mehr exprimiert.

4.3 Die Wirksamkeit einer Hyperthermiebehandlung auf Sarkom-Zelllinien

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Anwendung von Hyperthermie als weitere Strategie zur Verstärkung der lytischen Aktivität von NK-Zellen eignet (s. Kapitel 1.2.5.2). Hierzu wurden die oben genannten Zelllinien einem Hitzeschock von 41,8°C und 43°C für 90 Minuten unterzogen. Nach Erholungszeiten von 4 und 24 Stunden wurden die Effekte der Hyperthermiebehandlung auf die Zytotoxizität von NK-Zellen untersucht.

4.3.1 Veränderungen der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen

Zur Beurteilung des Hyperthermie-Effekts auf die lytische Aktivität von NK-Zellen wurden Zytotoxizitäts-Assays der Sarkom-Zelllinien nach Hitzebehandlung und Ablauf der Regenerationszeiten durchgeführt. Die lytische Aktivität wurde dann mit den Ergebnissen der Lyse der Sarkomzellen, die nicht hyperthermiert wurden, verglichen. Auch hier wurde aufgrund niedriger Versuchszahlen auf eine statistische Auswertung verzichtet.

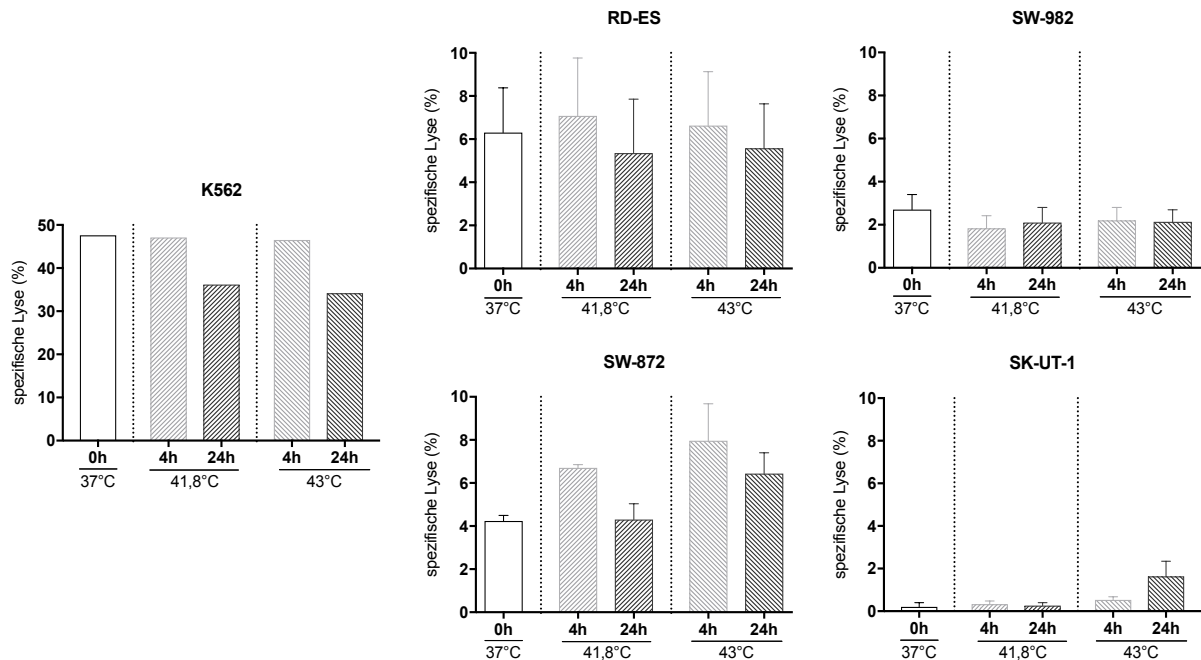


Abbildung 4-22 NK-Zell-Aktivität gesunder Spender gegenüber K562 (n=1) und Sarkom-Zelllinien (n=3) vor und nach regionaler Hyperthermie mit 41,8°C und 43°C sowie 4- bzw. 24-stündiger Regenerationszeit bei einer E:T-Ratio von 10:1.

Für keine der Zelllinien, das heißt weder für die K562-Zelllinie noch für die Sarkom-Zelllinien konnte eine relevante Zunahme der lytischen Aktivität der NK-Zellen nach Hyperthermie der Zielzellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war nicht erwartet.

4.3.2 Induktion von Hitzeschockprotein 70

Da keine Stimulation der Zytotoxizität der NK-Zellen durch die Hyperthermie-Behandlung der Sarkomzellen nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Hyperthermie überhaupt einen Effekt auf die Tumor-Zelllinien zeigt. So wurde untersucht, ob eine Induktion der intrazellulären Synthese von Hsp70 bzw. der Expression des Moleküls auf der Zellmembran der Tumorzellen durch die Hyperthermie herbeigeführt werden konnte.

4.3.2.1 Intrazelluläre Synthese

Zum Nachweis der Induktion der intrazellulären Synthese von Hsp70 durch Hyperthermie erfolgten Westernblots der Tumor-Zelllinien nach 90-minütigem Hitzeschock und unterschiedlichen Erholungszeiten (4, 16, 24 und 48 Stunden). Der Gehalt von Hsp70 nach Hyperthermie wurde dann mit dem Gehalt bei 37°C verglichen.

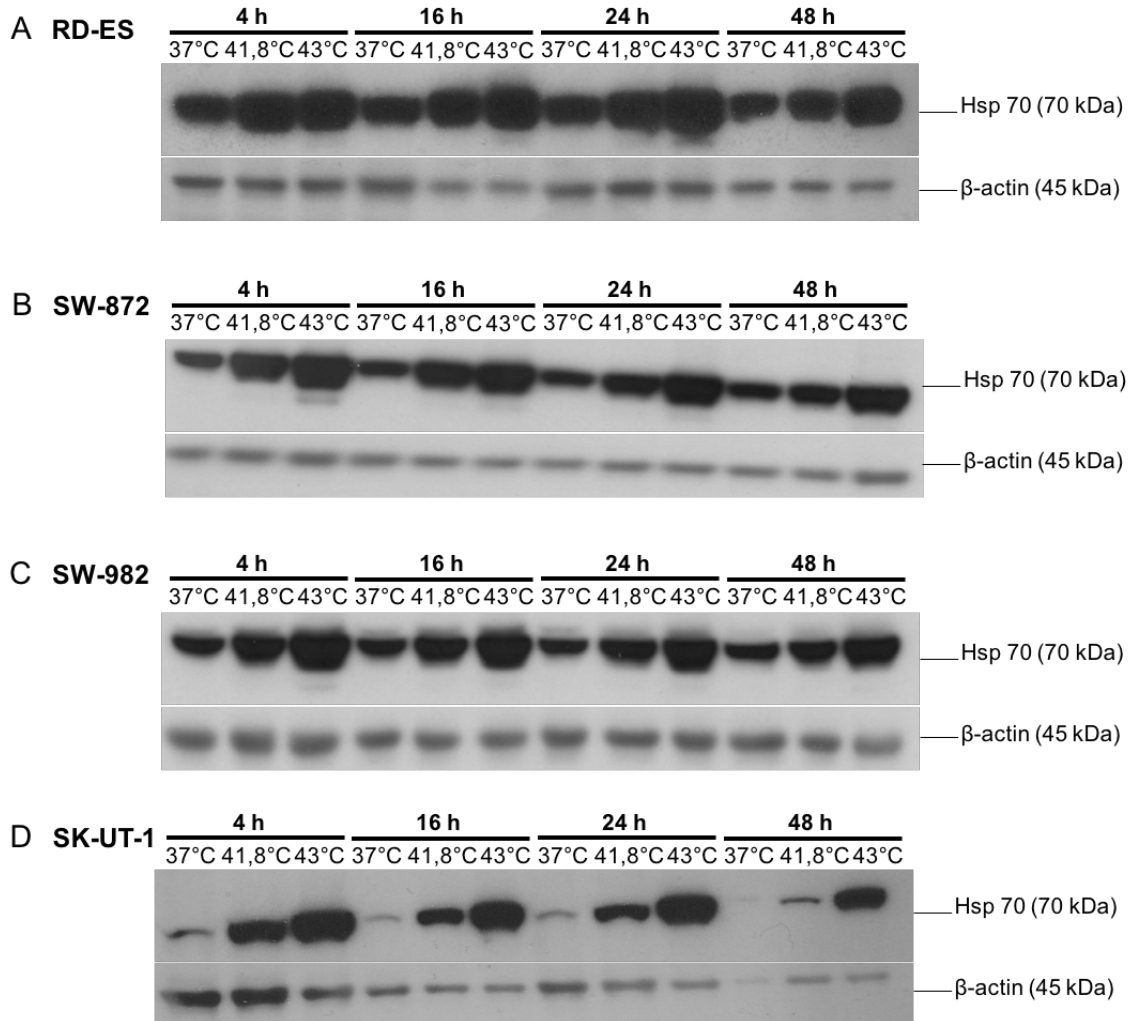


Abbildung 4-23 Induktion des intrazellulären Gehalts von Hsp70 in unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien durch die Hyperthermiebehandlung bei 41,8°C und 43°C nach 4, 16, 24, und 48 Stunden Regenerationszeit. Repräsentative Abbildung aus je 2 unabhängigen Experimenten.

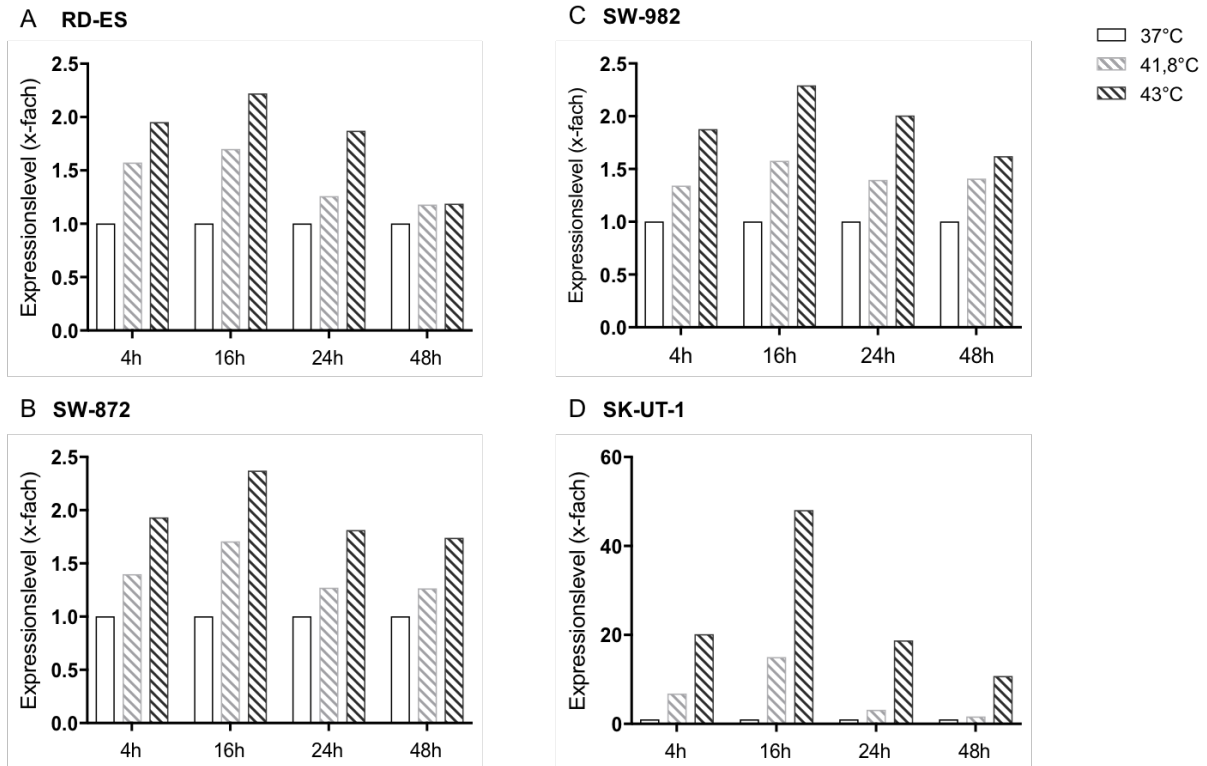


Abbildung 4-24 Induktion des intrazellulären Gehalts von Hsp70 in unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien durch die Hyperthermiebehandlung bei 41,8°C und 43°C nach 4, 16, 24, und 48 Stunden Regenerationszeit nach semiquantitativer densitometrischer Auswertung der Westernblotergebnisse. Repräsentative Diagramme aus je zwei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse zeigten für alle untersuchten Sarkom-Zelllinien eine deutliche Zunahme des intrazellulären Gehalts an Hsp70. Der Effekt war hierbei unabhängig von der Regenerationszeit bei 43°C ausgeprägter als bei 41,8°C. Die stärkste Induktion von Hsp70 konnte für alle Zelllinien nach 16 Stunden Regenerationszeit nachgewiesen werden.

4.3.2.2 Expression auf der Zellmembran

Anschließend wurde untersucht, ob die für die NK-Zell-Aktivierung wichtige Hochregulation des Proteins auf der Oberfläche der Sarkom-Zelllinien durch die Hyperthermie erreicht werden konnte [122, 140]. Hierzu erfolgten nach 90-minütiger Hyperthermiebehandlung und Ablauf von 4 bzw. 24 Stunden Regenerationszeit durchflusszytometrische Messungen zur Expression von Hsp70 auf den verschiedenen Sarkom-Zelllinien. Die Ergebnisse der Hsp70-Expression nach Hitzebehandlung wurden dann mit den Ergebnissen vor der Hitzebehandlung verglichen. Als Positivkontrolle wurde stets die Hsp70-Expression auf K562-Zellen mitgemessen. Dargestellt sind lediglich die Ergebnisse nach Hyperthermie und 4 Stunden Regenerationszeit. Die Messungen nach 24 Stunden erbrachten hierzu keine Unterschiede.

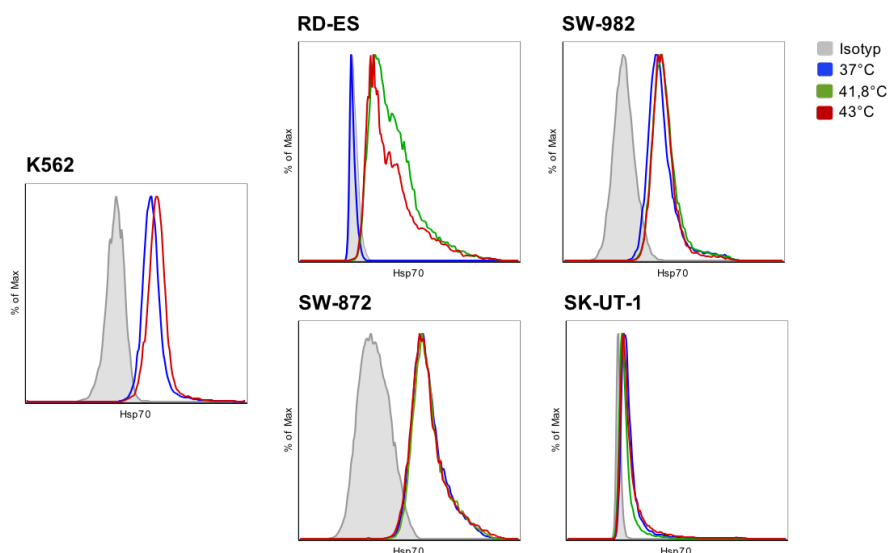


Abbildung 4-25 Expression von Hsp70 auf der Zellmembran von den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-1 und von der Positivkontrolle K562 vor und nach Hyperthermie mit 41,8°C und 43°C und nach Ablauf von 4 Stunden Regenerationszeit. Repräsentative Abbildung aus je 3 unabhängigen Experimenten.

Für K562-Zellen konnte eine Expression von Hsp70 auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Eine relevante Hochregulation des Antigens konnte durch die Hyperthermie jedoch nicht erreicht werden. Das gleiche Ergebnis brachten die Messungen für die Tumorzelllinien SW-872, SW-982 und SK-UT-1. Im Gegensatz dazu exprimierte die RD-ES-Zelllinie Hsp70 vor der Hyperthermiebehandlung nicht auf ihrer Oberfläche. Es konnte jedoch eine Zunahme der Hsp70-Expression nach Hyperthermie beobachtet werden.

4.3.3 Die Expression von NK-Zell-Liganden auf Sarkom-Zelllinien

Ob eine Tumorzelle von NK-Zellen erkannt und lysiert wird, hängt nicht nur von der Expression von Hsp70 auf ihrer Zellmembran und der Expression aktivierender Rezeptoren auf den NK-Zellen ab, sondern auch von der Expression entsprechender NK-Liganden auf den Tumorzellen [83].

Deshalb wurden durchflusszytometrische Untersuchungen zur Expression der NK-Liganden auf den Sarkom-Zelllinien und ihre Beeinflussbarkeit durch Hyperthermie durchgeführt. Im Folgenden werden die Marker beispielhaft dargestellt, die bei 37°C von einer oder mehreren Zelllinien ($MFI \geq 1,5$) exprimiert wurden. Außerdem dienen die Abbildungen der Darstellung von Expressionslevels nach 90-minütigem Hitzeschock der Zellen bei 41,8°C und 43°C und darauffolgender Erholungszeit von 4 Stunden. Die Ergebnisse der Messungen, die nach 24 Stunden Erholungszeit erhoben wurden, werden nicht dargestellt, da keine wesentlichen Unterschiede zu den Messungen nach 4 Stunden feststellbar waren. Auf eine statistische Analyse wurde in Anbetracht der geringen Fallzahlen verzichtet.

4.3.3.1 Liganden für aktivierende Rezeptoren

Für NKG2D als aktivierenden Rezeptor auf NK-Zellen wurde die Expression folgender Liganden auf den Sarkom-Zelllinien untersucht: MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-3 und ULBP-2/5/6.

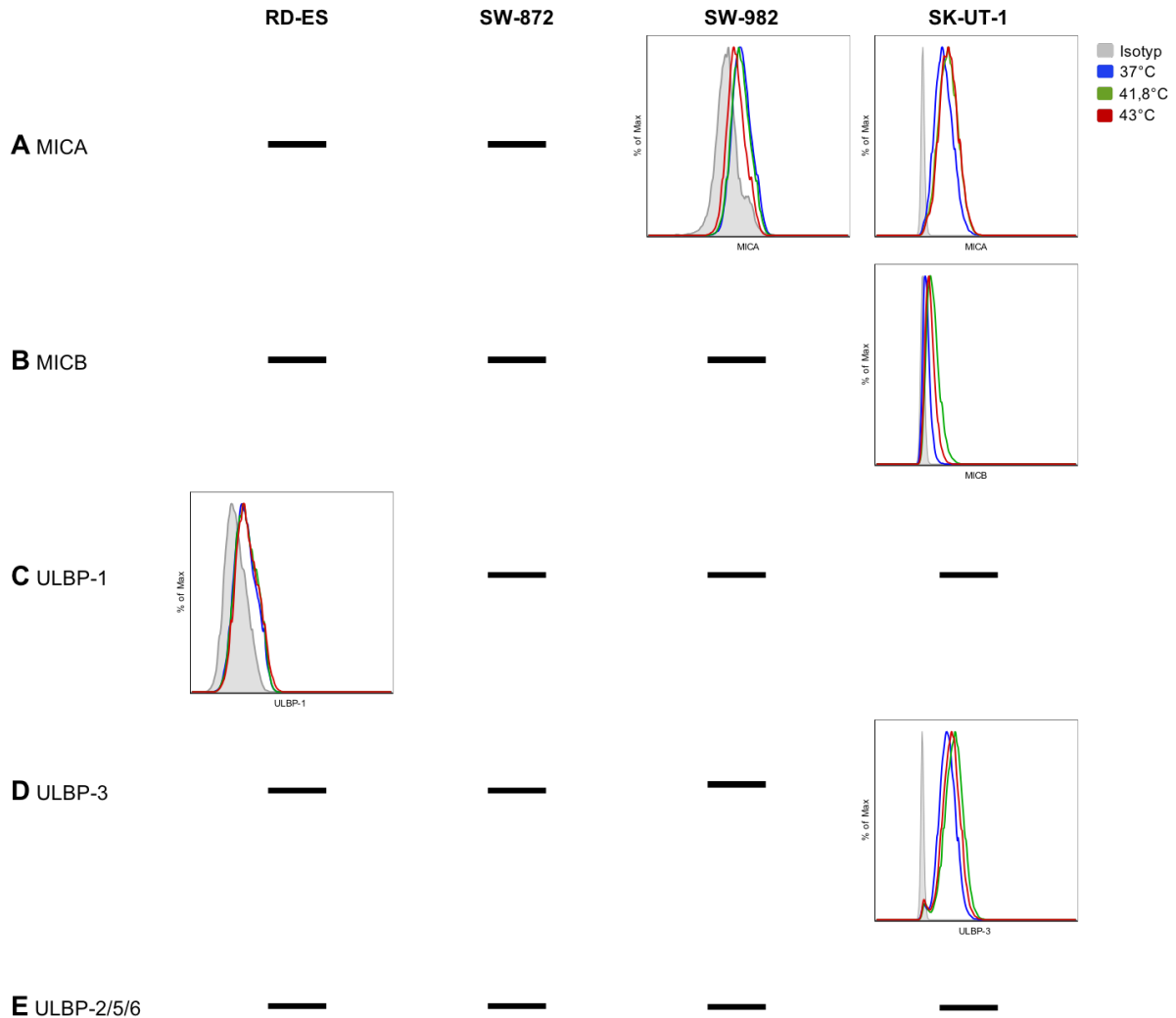


Abbildung 4-26 Expression von den NKG2D-Liganden MICA (A), MICB (B), ULBP-1 (C), ULBP-3 (D) und ULBP-2/5/6 (E) auf den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-1. Dargestellt sind nur die Histogramme der Marker (repräsentative Abbildung aus 3 unabhängigen Experimenten), die bei 37°C auf einer oder mehrere Sarkom-Zelllinien exprimiert wurden. Die Marker, für die keine Expression nachgewiesen werden konnte, wurden mit einem „-“ versehen.

MICA wurde von SKUT-1 und SW982 exprimiert. Die Hitzebehandlung führte bei der Synovialsarkom-Zelllinie zu keiner Änderung der Expressionsintensität. Im Gegensatz dazu, zeigte sich für SKUT-1 eine geringfügige Zunahme der MICA-Expression. Eine Expression von MICB zeigte sich nur auf der SKUT-1-Zelllinie. Auch hier war eine, aber nur sehr leichte, Zunahme der Expression nach Hyperthermie erkennbar.

Die Expression von ULBP-1 wurde nur auf der Ewing-Sarkom-Zelllinie nachgewiesen. Ein Effekt durch die Hitzebehandlung wurde nicht beobachtet.

ULBP-3 wurde auf der SKUT-1-Zelllinie exprimiert. Durch die Hitzebehandlung scheint die Expression von ULBP-3 tendenziell nach 4 Stunden Erholungszeit zuzunehmen. Dieser Effekt scheint bei 41,8°C stärker ausgeprägt zu sein als bei 43°C. ULBP-2/5/6 wurde von keiner der Zelllinien exprimiert.

CD155 und CD112 dienen als Liganden für den ebenfalls aktivierenden NK-Rezeptor DNAM-1. Als Ligand für 2B4 wurde die Expression von CD48 auf den Sarkom-Zelllinien gemessen.

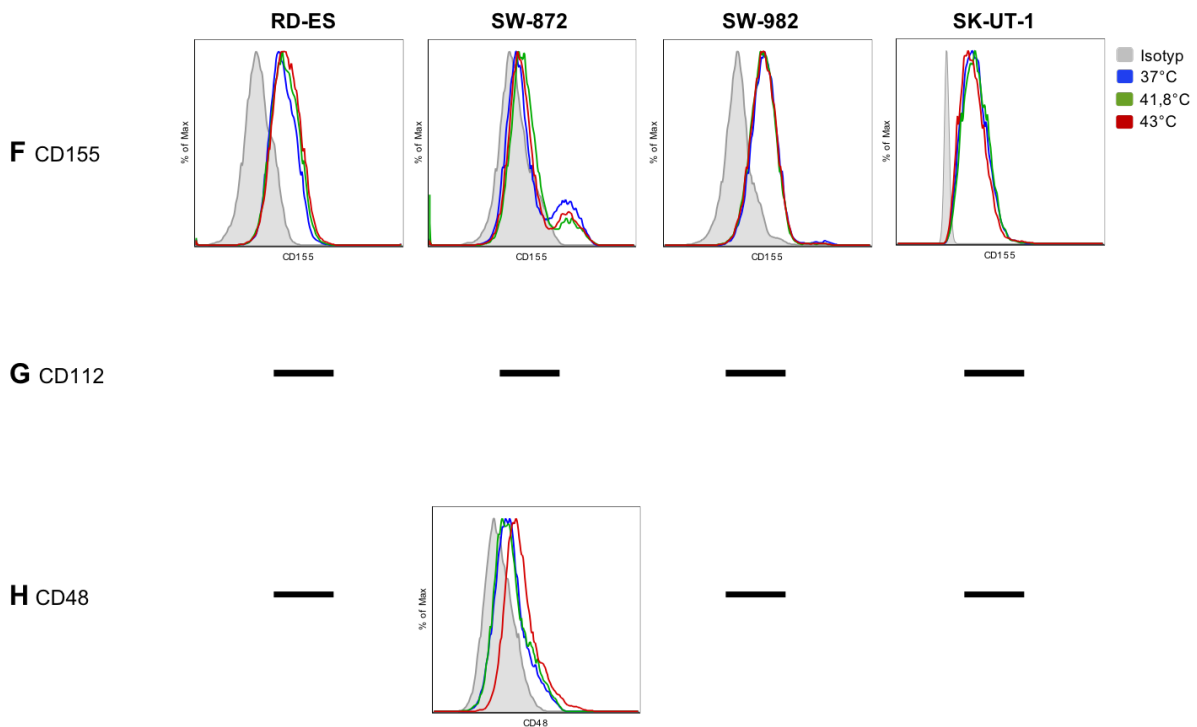


Abbildung 4-27 Expression von den DNAM-1-Liganden CD155 (F) und CD112 (G) sowie dem 2B4-Liganden CD48 (H) auf den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-1. Dargestellt sind nur die Histogramme der Marker (repräsentative Abbildung aus 3 unabhängigen Experimenten), die bei 37°C auf einer oder mehrere Sarkom-Zelllinien exprimiert wurden. Die Marker, für die keine Expression nachgewiesen werden konnte, wurden mit einem „-“ versehen.

Die Expression von CD155 konnte auf allen vier Sarkom-Zelllinien nachgewiesen werden. Nach Hitzebehandlung blieben die Werte der Expressionsintensität konstant. CD112 wurde von keiner der Zelllinien exprimiert.

Ausschließlich SW872-Zellen exprimierten CD48. Eine Induktion von CD48 konnte nur durch einen Hitzeschock bei 43°C beobachtet werden.

4.3.3.2 Liganden für inhibierende Rezeptoren

HLA-A/B/C und HLA-E gehören zu den MHC-Klasse-I-Molekülen, die mit den inhibierenden NK-Rezeptoren, insbesondere mit CD94/NKG2A interagieren.

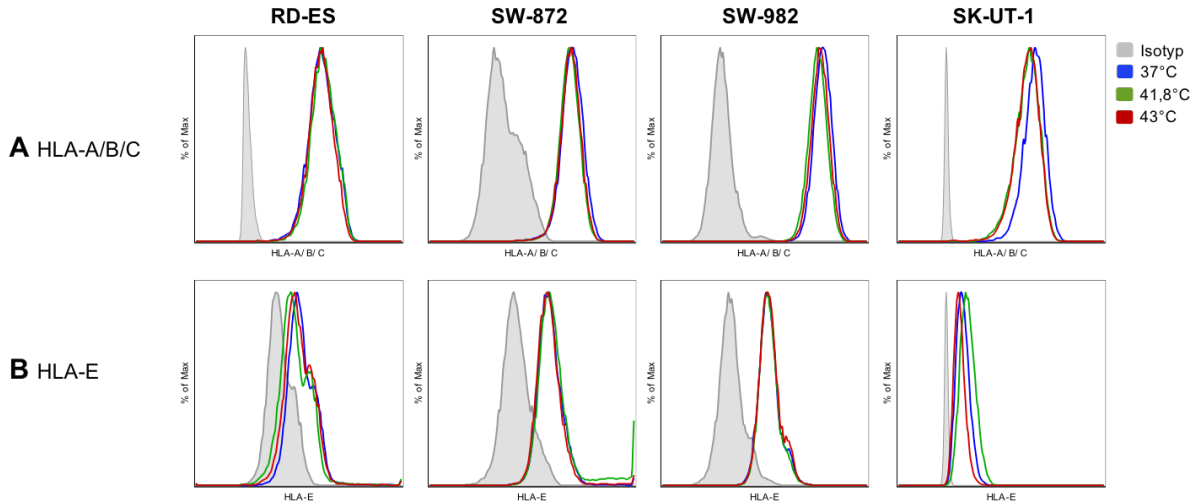


Abbildung 4-28 Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A/B/C (A) und HLA-E (B), auf den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-, die mit den inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren interagieren. Dargestellt sind nur die Histogramme der Marker (repräsentative Abbildung aus 3 unabhängigen Experimenten), die bei 37°C auf einer oder mehrere Sarkom-Zelllinien exprimiert wurden. Die Marker, für die keine Expression nachgewiesen werden konnte, wurden mit einem „-“ versehen.

Beide Moleküle wurden von allen Sarkom-Zelllinien exprimiert. Die Expression von HLA-E zeigte nur auf der SKUT-1-Zelllinie eine minimale Veränderung nach Hitzebehandlung mit 41,3°C. Für HLA-A/B/C bewirkte die Behandlung mit Hyperthermie auf RD-ES und SW872 keine Veränderung des Expressionslevels. Im Gegensatz dazu zeigte sich für SW982 und SKUT-1 eine abnehmende Tendenz der Expression dieses Moleküls.

5 Diskussion

Immuntherapien zur Behandlung von unterschiedlichen Malignomen stehen immer mehr im Fokus. Gerade für Tumore wie Weichteilsarkome, die trotz multimodaler Therapiestrategien eine schlechte Prognose aufweisen, sind neue therapeutische Ansätze notwendig. Zum Verständnis, ob NK-Zellen eine geeignete Therapiemodalität für STS-Patienten darstellen, ist die Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen der Interaktion von NK- und Sarkomzellen dringend erforderlich.

5.1 Immunevasion bei STS-Patienten

NK-Zellen spielen als Teil des angeborenen Immunsystems eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Tumorerkrankungen. Im Rahmen von Tumorerkrankungen kommt es jedoch zu einer Dysfunktion der NK-Zellen. Diese ist charakterisiert durch die Reduktion der Effektorfunktionen und ermöglicht infolgedessen eine unkontrollierte Tumorprogression [83]. Dies ist nicht nur für hämatologische Erkrankungen beschrieben [141, 142], sondern auch für eine Reihe solider Tumore [143-147].

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass STS-Patienten – und zwar Chemotherapie-naive Patienten – im Vergleich zu gesunden Spendern eine signifikante Reduktion der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen im peripheren Blut aufweisen (s. Kapitel 4.1.2). Dies bestätigt die Ergebnisse von Bücklein et al. zur NK-Zell-Funktion von STS-Patienten [82]. Wie es zu dieser Funktionseinbuße der NK-Zellen bei malignen Erkrankungen kommt, ist bislang nur unzureichend verstanden. Es wurden bereits Mechanismen identifiziert, die zu diesem Phänomen beitragen können. Jedoch scheinen diese je nach Tumorentität unterschiedlich zu sein [148]. In der Arbeit von Bücklein et al. konnten für NK-Zellen von STS-Patienten bislang keine Faktoren identifiziert werden, die das Phänomen der Immunevasion von Weichteilsarkomen erklären [82], sodass in vorliegender Arbeit zytotoxische NK-Zellen, also $CD56^{\text{dim}}CD16^{\text{bright}}$ -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern weiter charakterisiert wurden (s. Kapitel 1.2.2). Für die folgenden Abschnitte ist zu beachten, dass im Gegensatz zur Arbeit von Bücklein et al. hier für die Messung der Expression der unterschiedlichen Marker nicht die für den jeweiligen Marker %positiven Zellen, sondern die Expressionsdichte (MFI-Ratio) herangezogen wurde. Darüber hinaus wurde die Zytotoxizität von gesunden NK-Zellen gegenüber unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien und die Expression entsprechender NK-Liganden auf diesen untersucht.

5.1.1 NK-Zell-Dysfunktion unabhängig von NK-Zell-Maturierungsstatus

Eine zwingende Voraussetzung für die Ausbildung der zytotoxischen Funktion ist die korrekte NK-Zell-Reifung. NK-Zellen durchlaufen während ihrer Entwicklung mehrere Stadien. Während unreife NK-Zellen ($CD56^{\text{bright}}$) die Fähigkeit zur Zytokinproduktion haben und somit

regulatorische Funktionen erfüllen, zeichnen sich erst reife NK-Zellen (CD56^{dim}) durch hohes zytotoxisches Potential aus (s. Kapitel 1.2.2). Eine Störung der Maturierung kann folglich zu einer reduzierten NK-Zell-Funktion führen [149].

Außer CD56 stehen noch weitere Marker zur Verfügung, um Aussagen über den Reifegrad der Zellen zu treffen: CD57, TIM-3, CD117 und CD27. Unreife NK-Zellen exprimieren die Marker nicht oder nur in einer sehr geringen Dichte. Während die Expression von CD57 und TIM-3 mit fortschreitender Reifung zunimmt, kommt es für CD117 und CD27 nur initial zu einer Zunahme der Expression, die in den letzten Reifungsstadien jedoch weitgehend wieder verloren geht. Somit zeichnen sich ausdifferenzierte, voll funktionsfähige Zellen mit großem zytotoxischen Potential durch eine hohe Expression von CD57 und TIM-3, sowie keine oder nur geringfügig vorhandene Expression von CD117 und CD27 aus [133-136, 150].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zwischen gesunden Spendern und STS-Patienten außer für CD27 keine signifikanten Unterschiede bestehen (Vgl. Abb. 4-8). Das heißt, dass sich NK-Zellen von STS-Patienten und gesunden Spendern ungefähr im gleichen Reifestadium befinden. Die geringere Expression von CD27 auf Patienten-NK-Zellen weist daraufhin, dass diese auf jeden Fall nicht unreifer als NK-Zellen gesunder Spender sind. Demzufolge müssten NK-Zellen von STS-Patienten auf Basis des Maturierungsgrades mindestens das gleiche zytolytische Potenzial aufweisen wie NK-Zellen gesunder Spender. Auch die vergleichbare Expression von NKp46 (Vgl. Abb. 4-5 C), einem Marker, der nur auf NK-Zellen in späten Reifestadien exprimiert wird [35], bestätigt diese Hypothese.

Darüber hinaus erbrachten die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen hinsichtlich des Anteils der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zell-Population an der Gesamtpopulation der NK-Zellen keine Unterschiede zwischen STS-Patienten und gesunden Spendern (Vgl. Abb. 4-2). Dies kann als weiterer Beleg dafür gewertet werden, dass der NK-Zell-Defekt nicht auf ein Problem der NK-Zell-Reifung zurückzuführen ist, da die zytotoxische CD56^{dim}CD16^{bright}-Subpopulation den terminal differenzierten NK-Zellen entspricht. Die dargestellten Ergebnisse decken sich mit den hierzu publizierten Daten von Bücklein et al. zu STS-Patienten [82].

5.1.2 Normaler Gehalt an Effektormolekülen

Der Hauptmechanismus von NK-Zellen, Zielzellen abzutöten, beruht auf der Ausschüttung von Effektormolekülen, die intrazellulär in Vesikeln gespeichert werden (s. Kapitel 1.2.3.3). Ein unzureichender Gehalt an Effektormolekülen bietet folglich eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte zytotoxische Funktion der NK-Zellen und ist beispielsweise für Patienten mit Malignen Melanomen [151], Lungen-Karzinomen [152], aber auch mit gastrointestinalen Tumoren beschrieben [153].

Hinsichtlich des intrazellulären Gehalts an Granzymen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Obwohl Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern einen etwas

niedrigeren Gehalt an Perforin aufwiesen, war dieser Unterschied nicht signifikant (Vgl. Abb. 4-3). Auch diese Ergebnisse decken sich mit den von Bücklein et al. veröffentlichten Daten [82]. Demzufolge ist ein unzureichender Gehalt an Effektormolekülen nicht ursächlich für die Immunevasion von Weichteilsarkomen.

Eine weitere Möglichkeit, der sich NK-Zellen zur Zerstörung von Zielzellen bedienen, stellt die Fas/FasL-Achse dar (s. Kapitel 1.2.3.3). Veränderungen der Expression von TRAIL und FasL wurden nicht untersucht, sind aber als Ursache für eine NK-Zell-Dysfunktion durchaus denkbar. Im vorliegenden Versuchssetting kommt eine Störung dieser Achse als Erklärung allerdings nicht in Frage, weil die K562-Zelllinie resistent gegenüber den TRAIL/FasL-Signalwegen ist und die NK-Zell-Aktivität demnach im verwendeten Versuchsaufbau davon unbeeinflusst bleibt [154]. Dies impliziert, dass - zumindest im vorliegenden Versuchsaufbau - nicht die Effektorfunktionen an sich das Problem darstellen, sondern die NK-Zell-Dysfunktion eher aus einem Problem der Aktivierung resultiert.

5.1.3 Immunphänotyp von CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen – reduzierte Expression von NKG2D, NKp44, NKp30 und CD2

Ein oft diskutierter Immunevasionsmechanismus beruht auf Veränderungen der Rezeptorausstattung der NK-Zellen, die zu einer mangelhaften NK-Zell-Aktivierung führen. Die NK-Zell-Aktivierung ist ein hochkomplexer Mechanismus, der durch die Integration aktivierender und inhibierender Signale reguliert wird (s. Kapitel 1.2.3.2). Eine Herunterregulation aktivierender Rezeptoren und/oder Überexpression inhibierender Rezeptoren kann zu einer Dominanz inhibitorischer Signale führen, sodass die NK-Zell-Aktivierung in Folge ausbleibt [83].

Die wichtigsten aktivierenden Rezeptoren sind die NCRs NKp30, Nkp44 und NKp46. Die NCRs besitzen mit Ausnahme von NKp46 die Fähigkeit, die Elimination der Zielzellen ohne weitere aktivierende Signale einleiten zu können [51]. Aus diesem Grund kommt ihnen eine Schlüsselrolle in der Erkennung und Elimination von Tumorzellen zu. Insbesondere bei malignen hämatologischen Erkrankungen wurde eine erniedrigte Expression der NCRs als eine der Hauptursachen für die eingeschränkte zytolytische Aktivität identifiziert [84, 155, 156]. Auch für einige solide Tumore konnte ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Expression der NCRs und dem NK-Zell-Defekt hergestellt werden [143, 153, 157, 158]. Dabei waren in erster Linie NKp30 und NKp46 von der Herunterregulation betroffen.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Reduktion der Expression von NKp30 und NKp46 bei Weichteilsarkomen gefunden werden (Vgl. Abb. 4-5 A, C). NKp46 betreffend bestätigte dies die Ergebnisse von Bücklein et al. [82]. Die Expression von NKp30 wurde bisher nicht untersucht. Hier deutete sich zwar eine reduzierte Expression bei STS-Patienten an; die Signifikanz wurde jedoch knapp nicht erreicht. Dies könnte einerseits an den geringen

Fallzahlen liegen, andererseits an der sehr variablen Expressionsdichte von NKp30, die sich mit den in der Literatur angegebenen Daten deckt [143, 153]. Somit kann ein Einfluss der tendenziell reduzierten Expression von NKp30 auf die NK-Zell-Dysfunktion bei STS-Patienten nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wurde die Expression von CD3 ζ , dem Adapterprotein über das NKp46 und NKp30 Signale vermitteln, untersucht. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen gesunden Spendern und STS-Patienten beobachtet werden (Vgl. Abb. 4-5 D), sodass Störungen der CD3 ζ -abhängigen Rezeptorfunktionen von NKp30 und NKp46, wie sie für einige Tumor- und Autoimmunerkrankungen dokumentiert sind [159], bei STS-Patienten nicht in Frage kommen. Dies findet ebenfalls Übereinstimmung mit den von Bücklein et al. veröffentlichten Daten [82]. Interessanterweise zeigten sich für NKp44 signifikant niedrigere MFI-Ratio-Werte bei STS-Patienten (Vgl. Abb. 4-5 B). NKp44 ist ein Marker, der ausschließlich von aktivierten NK-Zellen exprimiert wird [51]. Da in diesem Teil der Arbeit unstimulierte NK-Zellen untersucht wurden, wurde der Marker nicht oder nur minimal exprimiert. Dennoch ist es bemerkenswert, dass der Marker auf NK-Zellen von STS-Patienten eine signifikant niedrigere Expressionsdichte zeigte. Dies könnten erste Hinweise sein, dass es in Folge des Sarkom-vermittelten Immundefekts zu einer erschwerten Aktivierung von NK-Zellen kommt und dass somit die reduzierte Expression von NKp44 eher Folge als Ursache des Defekts ist.

Weitere Analysen beinhalteten die Expression von NKG2D. Eine tumorassoziierte Reduktion der NKG2D-Expression auf zirkulierenden NK-Zellen ist ein weitverbreitetes Phänomen, das für eine Reihe von Tumoren des Gastrointestinaltrakts und für Mammakarzinome dokumentiert ist [144, 146, 147, 153, 160]. Im Gegensatz zu den publizierten Daten von Bücklein et al. konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Reduktion von NKG2D bei STS-Patienten nachgewiesen werden (Vgl. Abb. 4-6 C) [82]. Aufgrund des häufig beobachteten Phänomens ist die Schlussfolgerung, dass die Herabregulation von NKG2D in direktem Zusammenhang mit der eingeschränkten zytotoxischen Funktion der NK-Zellen steht, plausibel. Die Unterschiede zur Arbeit von Bücklein et al. können auf die geringe Anzahl der dort untersuchten Stichproben zurückgeführt werden. Desweiteren scheinen die dort untersuchten gesunden Spender bereits einen im Vergleich zu anderen Arbeiten geringeren Anteil an NKG2D%-positiven Zellen aufzuweisen [82, 153]. Darüber hinaus sei erneut darauf hingewiesen, dass in dieser Arbeit nicht der Anteil der NKG2D-positiven NK-Zellen gemessen wurde, sondern die Expressionsdichte des Markers, was einen unmittelbaren Vergleich ohnehin schwierig macht.

Die koaktivierenden Rezeptoren spielen ebenfalls eine Rolle für die NK-Zell-Funktion, dienen dabei aber eher als „Signalverstärker“ und weniger als eigenständige Aktivatoren (s. Kapitel 1.2.3.2). Dennoch kann eine reduzierte Expression dieser Marker zum NK-Zell-Defekt beitragen [54, 132, 161, 162]. Für Weichteilsarkome wurden keine Unterschiede für die

Expression von DNAM-1, 2B4 und CD8 im Vergleich zu gesunden Spendern festgestellt (Vgl. Abb. 4-6 A, B und E). Insofern ist eine Herabregulation der Expression dieser Marker als Ursache der Funktionseinschränkung auszuschließen. Anders verhält es sich für CD2: Die MFI-Werte der STS-Patienten waren sehr signifikant niedriger als die der gesunden Spender (Vgl. Abb. 4-6 D). Dieses Ergebnis war unerwartet. CD2 wird als koaktivierender Rezeptor für NKp46 eingestuft, weil er durch Bindung an seine Liganden allein nicht in der Lage ist, die Effektorfunktionen zu initiieren [53]. Vielmehr dient CD2 als Adhäsionsmolekül, das durch Bindung seiner Liganden auf den Zielzellen eine Vorbereitung, das sogenannte „Priming“, zur Aktivierung der NK-Zelle in Gang setzt. Erst wenn zusätzlich ein triggerndes Signal durch NKp46 vermittelt wird, kann die Degranulation der Effektormoleküle eingeleitet und die zytotoxische Funktion entfaltet werden [53, 163, 164]. Daraus geht hervor, dass die Reduktion der Expression von CD2 auf Patienten-Zellen einen repräsentativen Mechanismus für die eingeschränkte NK-Zell-Funktion darstellen könnte.

Als Gegenstück zu den aktivierenden Rezeptoren wurde auch die Expression einer Reihe von inhibierenden Rezeptoren untersucht: CD94, NKG2A und PD-1.

CD94 und NKG2A besitzen beide alleine keine Funktion. Erst wenn sie über Disulfidbrücken Heterodimere bilden, entsteht ein funktionsfähiger Rezeptor. Die Aufgabe des CD94/NKG2A-Rezeptors ist in erster Linie, HLA-E-exprimierende gesunde Körperzellen vor einer NK-Zell-vermittelten Zytolyse zu schützen. Es ist zu erwähnen, dass CD94 nicht nur mit NKG2A assoziiert ist, sondern auch in der Lage ist, mit NKG2C oder NKG2E zu dimerisieren und somit als aktivierender Rezeptor zu fungieren [165].

In vorliegender Arbeit wurde eine signifikante Herunterregulation von NKG2A bei gleichbleibenden Expressionslevels von CD94 bei STS-Patienten beobachtet (Vgl. Abb. 4-7 A, B). Die unveränderte CD94-Expression wurde bereits für STS-Patienten dokumentiert [82]. Dennoch war die Konstellation mit einer Herunterregulation von NKG2A nicht erwartet und ist in der Literatur bisher nur für HIV-Patienten mit hoher Viruslast beschrieben. Trotz der niedrigeren Expression von NKG2A und damit einem Defizit der inhibitorischen Signale, konnte eine reduzierte lytische Aktivität der NK-Zellen bei HIV-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern festgestellt werden. Dies war auf eine Hochregulation der inhibitorischen KIRs und auf eine reduzierte Expression aktivierender Rezeptoren zurückzuführen [166]. In vorliegender Arbeit wurde die Expression der inhibitorischen KIRs nicht untersucht, da diese im verwendeten Versuchsaufbau mangels Expression entsprechender Liganden auf den Zielzellen (K562) keinen Einfluss haben. Dennoch wäre eine Hochregulation der KIRs *in vivo* denkbar. Dies ist in der Literatur auch bereits für Tumore des Gastrointestinaltrakts beschrieben [54]. Zum genaueren Verständnis sollte daher eine Untersuchung der zuständigen KIRs in weiteren Analysen erfolgen. Außerdem ist zu erwähnen, dass die

verwendete Zielzelllinie (K562) auch keine Expression von HLA-E aufweist und deshalb Unterschiede in der NKG2A-Expression keine Auswirkungen auf die zytotoxische Funktion der Zellen im verwendeten Versuchsaufbau haben [167, 168]. Es bleibt jedoch zu beachten, dass *in vitro* Messungen nicht die Situation am Tumor widerspiegeln. Aus diesem Grund liefert die Messung der Expressionsdichte von CD94 und NKG2A dennoch wertvolle Informationen. Abgesehen von CD94/NKG2A wurde die Expression von PD-1 analysiert. PD-1 ist ein sehr effektives inhibitorisches Molekül, das auf T-Lymphozyten exprimiert wird, um bei Interaktionen mit Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen überschießende Immunantworten zu verhindern. Tumorzellen machen sich dieses Molekül häufig zunutze, um sich vor einem Angriff zytotoxischer T-Zellen zu schützen. Aus diesem Grund spielt PD-1 seit einiger Zeit eine große Rolle in der Immuntherapie solider Tumore [169, 170] sowie hämatologischer Erkrankungen [171, 172] mittels Immun-Checkpoint-Blockaden [173]. Durch gegen PD-1 gerichtete Antikörper kann die T-Zell-Funktion bei diesen Tumorpatienten wiederhergestellt werden [69, 93]. Ob ein solches Therapiekonzept auch einen vielversprechenden Ansatz für die NK-Zell-Aktivierung darstellt, ist bis dato nicht abschließend geklärt. Dennoch liegen Hinweise vor, dass die Expression von PD-1 auf NK-Zellen von Tumorpatienten durch inhibitorische Signale zu NK-Zell-Defekten beiträgt, so z. B. bei Multiplen Myelomen und Ovarial-Karzinomen [94]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch eine PD-1-basierte Antikörpertherapie die NK-Zell-Funktion bei Multiplen Myelomen wiederhergestellt werden kann [91]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur bei einem Teil der gesunden Spender und Patienten eine minimale Expression von PD-1 nachgewiesen werden (Vgl. Abb. 4-7 C). Dies ist konsistent mit der in der Literatur beschriebenen Expression von PD-1 auf ausdifferenzierten CD56^{dim}-NK-Zellen gesunder Spender [97, 174]. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden. Folglich können inhibitorische Signale von PD-1 als Ursache für den NK-Zell-Defekt bei STS-Erstlinien-Patienten ausgeschlossen werden. Eine PD-1-basierte Antikörpertherapie erscheint für STS-Patienten – beurteilt allein anhand der PD-1-Expression von NK-Zellen des peripheren Bluts – nicht sinnvoll. Dies mag sich in der Untersuchung von T-Zellen und der Situation am Tumor anders darstellen.

Zudem erfolgte die Bestimmung des Aktivierungszustands durch Messung der Expressionsdichte von CD69 und HLA-DR. Auch hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Spendern (Vgl. Abb. 4-4). Die hohe zytotoxische Aktivität der Spender-NK-Zellen ist also nicht auf eine „zufällige“ Aktivierung durch inflammatorische Stimuli zurückzuführen [175, 176]. Ein Selektionsfehler für die Spender-Stichprobe besteht somit nicht. Desweiteren kann gefolgert werden, dass die Tumorerkrankung nicht zu einer anhaltenden Aktivierung der zirkulierenden NK-Zellen führt.

5.1.4 Rolle der Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren und ihre Liganden, die Chemokine, sind für die Migration und Rekrutierung von NK-Zellen zum Tumorgewebe essentiell. Insbesondere CX₃CR1 spielt eine Rolle für NK-Zellen. Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte beobachtet werden, dass NK-Zellen trotz eines hohen Levels an Chemokinen im Tumor die malignen Zellen nicht erreichen. Vielmehr scheinen sie im Stroma „hängen zu bleiben“. Man vermutet folglich, dass die Chemokin-Level im Tumor nicht ausreichen, um NK-Zellen effizient anzulocken [81, 177]. Eine Reduktion der Chemokinrezeptoren, wie es für CD56^{dim}-NK-Zellen von Patienten mit Neuroblastomen beschrieben ist, stellt auch eine plausible Erklärung dar [178]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zeigten ebenfalls eine hochsignifikante Reduktion des CX₃CR1-Rezeptors auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten (Vgl. Abb. 4-9 A), sodass eine Behinderung der Rekrutierung der zytolytischen NK-Zellen *in vivo* denkbar ist. Dies könnte funktionelle Defekte weiter beeinträchtigen. Eine definitive Aussage ist jedoch nicht zulässig, da die Rekrutierung auch vom Tumortyp und den ausgeschütteten Chemokinen abhängt [81]. Für die NK-Zell-Aktivität *in vitro* spielt die Expression von Chemokinrezeptoren keine Rolle.

Die Expression von CXCR6 auf zytolytischen NK-Zellen im peripheren Blut ist umstritten. Die hier vorgestellten Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Berahovich et al., dass nämlich CXCR6 nur von einem Teil der gesunden Spender exprimiert wird [138]. Aus der signifikanten Reduktion des Rezeptors auf Patientenzellen (Vgl. Abb. 4-9 B) eine relevante Rekrutierungsbehinderung abzuleiten, ist aufgrund des insgesamt niedrigen Expressionslevels nicht zu rechtfertigen.

5.1.5 Ligandenausstattung der Tumorzellen

Die NK-Zell-Funktion hängt nicht nur von der Expression aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf den NK-Zellen ab, sondern auch von der Expression entsprechender Liganden auf den Tumorzellen [31, 46].

Gesunde Zellen exprimieren aktivierende NK-Liganden entweder nicht oder in so geringer Dichte, dass die Signale nicht ausreichen, um die NK-Zell-Aktivierung in Gang zu setzen [179, 180]. Im Rahmen der Tumorentstehung kommt es zu einer Hochregulation dieser Liganden, die eine weitere Tumorentwicklung üblicherweise verhindert [179, 181, 182]. Tumorzellen von etablierten Tumoren haben jedoch Mechanismen entwickelt, die die Expression der entsprechenden Liganden unterdrücken, sodass es beim Voranschreiten der Tumorerkrankung wieder zu einer Abnahme oder gar dem Verlust NK-aktivierender Liganden kommt [179, 183-186]. Obwohl die Regulation der Expression für viele epitheliale Tumore beschrieben ist, fehlen ausreichende Informationen zur Expression dieser Liganden auf Sarkom-Zelllinien. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von NKG2D-,

DNAM-1 und 2B4-Liganden sowie von inhibierenden Liganden (HLA-A/B/C und HLA-E) auf Sarkom-Zelllinien untersucht (s. Kapitel 4.3.3).

Die Expression der NK-aktivierenden Liganden war auf den unterschiedlichen Zelllinien sehr heterogen. Auffallend war, dass – sofern die Expression der Liganden überhaupt nachweisbar war – alle Sarkom-Zelllinien eine nur sehr geringe Ligandendichte auf ihrer Oberfläche aufwiesen (Vgl. Abb. 4-26, 4-27). Im Gegensatz dazu exprimierten alle Sarkom-Zelllinien HLA-Antigene (Vgl. Abb. 4-28), die bei Kontakt mit NK-Zellen inhibierende Signale vermitteln. Bemerkenswert war hierbei die hohe Expressionsdichte von HLA-A/B/C (Vgl. Abb. 4-28 A). Die dargestellten Ergebnisse legen also nahe, dass sich Sarkom-Zelllinien durch die Expression von MHC-I-Molekülen „tarnen“, um die Erkennung durch NK-Zellen zu erschweren und gleichzeitig NK-aktivierende Liganden herunterregulieren, sodass die dynamische Regulation der NK-Zell-Funktion stets auf die Seite der inhibitorischen Signale schlägt. Hieraus resultiert eine Resistenz der Tumor-Zelllinien gegenüber NK-Zellen. Dies bestätigt sich in der Beobachtung, dass die Lyse der Sarkom-Zelllinien im Vergleich zur Lyse der K562-Zellen auch bei Verwendung von NK-Zellen gesunder Spender deutlich reduziert war (s. Kapitel 4.1.8).

5.1.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel der im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen war, Immunevasionsmechanismen, die zur NK-Zell-Dysfunktion bei STS führen, herauszuarbeiten.

Durch Immunphänotypisierung von CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der NK-Zell-Aktivierung für die reduzierte Zytotoxizität verantwortlich ist. Insbesondere eine reduzierte Expression der aktivierenden Marker NKG2D, CD2 und NKp44 war ausschlaggebend. Die reduzierte Expression von NKp30 war zwar auffällig, aber statistisch nicht signifikant. Dies impliziert, dass die NK-Zell-Dysfunktion Resultat eines sich zugunsten der Inhibition verschiebenden Gleichgewichts aktivierender und inhibierender Signale ist [83]. Gegen diese Theorie spricht die Beobachtung, dass es im Rahmen der Tumorerkrankung auch zu einer Herunterregulation des inhibierenden NKG2A-Rezeptors kam. Geht man davon aus, dass eine Herunterregulation von NKG2A mit einer Heraufregulation der inhibierenden KIRs assoziiert sein kann, kommt es dennoch zu einem Überwiegen der inhibitorischen Signale [166]. Desweiteren wurde eine nicht oder kaum vorhandene Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren gezeigt, die bei STS-Patienten *in vivo* eine Störung der NK-Migration zum Tumor verursachen könnte [81]. Ob diese Beobachtungen *in vivo* Relevanz haben, muss allerdings noch überprüft werden.

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass sich CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen bei STS-Patienten in einem Zustand der „NK-Zell-Exhaustion“ befinden. Gründe für die scheinbar

tumorassoziierten Veränderungen des Phänotyps von CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen können nicht angeführt werden, da keine entsprechenden Messungen durchgeführt wurden. Denkbar sind die Sekretion immunsuppressiver Moleküle wie TGF- β oder Indoleamin-2,3-Dioxygenase, für die bei anderen malignen Erkrankungen solche Effekte bereits nachgewiesen wurden [147, 178]. Alternativ wäre auch eine Modulation des NK-Zell-Phänotyps durch Liganden-Shedding möglich. So setzen beispielsweise epitheliale Tumore nach Hochregulation von aktivierenden NK-Liganden für NKG2D diese als lösliche Liganden frei. Die erhöhte Konzentration der löslichen Liganden im Serum der Patienten führt dann zu einer Reduktion der Expression des aktivierenden Rezeptors auf NK-Zellen [187].

Darüber hinaus wurde durch durchflusszytometrische Messungen der Antigenausstattung der Sarkom-Zelllinien gezeigt, dass auch die Tumorzellen durch Veränderungen ihres Phänotyps zur NK-Zell-Dysfunktion beitragen könnten. Durch Heraufregulation inhibierender NK-Liganden, insbesondere von HLA-A/B/C, und die Herunterregulation aktivierender NK-Liganden, entwickeln die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber NK-Zellen. Hieraus Rückschlüsse auf involvierte Rezeptor-Liganden-Systeme zu ziehen, ist allerdings nicht gerechtfertigt, da lediglich Sarkom-Zelllinien untersucht wurden. Interessant wäre hierfür eine Analyse an Primärtumormaterial von STS-Patienten.

5.2 Ansätze für immuntherapeutische Strategien zur Wiederherstellung der NK-Zell-Funktion bei STS-Patienten

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war, Informationen über die Wiederherstellung der NK-Zell-Funktion bei STS-Patienten zu sammeln und hieraus Ansätze für immuntherapeutische Strategien abzuleiten.

5.2.1 Direkte Stimulation durch IL-2

Die Voraussetzung für die Anwendung von NK-Zellen als Immuntherapeutikum ist das Überwinden der tumorassoziierten Immunevasionsmechanismen (s. Kapitel 1.2.4.2). Hierzu dienen beispielsweise Zytokine, wie IL-2 (s. Kapitel 1.2.5.1). In der vorliegenden Arbeit wurden NK-Zellen von STS-Erstlinien-Patienten mithilfe einer IL-2-Langzeitkultur manipuliert und im Folgenden hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, der Größe der Subpopulation und ihres Phänotyps untersucht. Gleiches erfolgte mit NK-Zellen gesunder Spender.

5.2.1.1 Aktivierung und Expansion der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen

Um NK-Zellen als Immuntherapeutikum nutzen zu können, sollten sie aktiviert und expandiert werden, sodass sie in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Dies gilt insbesondere für die zytotoxische Subpopulation, also CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen [188, 189]. Von besonderer Bedeutung sind dabei der Reinheitsgrad des NK-Zellprodukts sowie der Proliferations- und

Aktivitätszustand [188, 190]. Aus diesem Grund ist die Expansion hochzytotoxischer NK-Zellen ein äußerst schwieriges Unterfangen, was in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung war [191]. Problematisch ist erstens die oft auftretende Expansion konkurrierender CD3^{pos}-T-Zellen, sogenannter regulierender T-Zellen, die die NK-Zell-Funktion direkt hemmen und im allogenen Setting das Risiko einer Graft-versus-Host-Erkrankung massiv steigern [191]. Zweitens führt eine zu kurze Kultivierung der Zellen in IL-2-haltigem Medium zu einer unzureichenden Expansion, während eine zu lange Kultivierung der Zellen zu einer „Exhaustion“ der NK-Zellen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität führen kann und die Zellen in Folge absterben [192]. Ein weiterer Aspekt ist, dass viele der erprobten Protokolle nicht den GMP-Richtlinien entsprechen und somit für die klinische Anwendung unbrauchbar sind [193, 194]. In der vorliegenden Arbeit wurden in Kooperation mit der Zellwerk GmbH PBMCs zunächst einer CD3-Depletion unterzogen und die so gewonnenen CD3^{neg}-Zellen in einem IL-2-haltigen Langzeitkultursystem kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung als auch die Expansion der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen mithilfe dieser Methode, welche den GMP-Richtlinien entspricht, prinzipiell gute Resultate liefert (s. Kapitel 4.2.1, 4.2.2). Dass eine vollständige Regeneration der NK-Zell-Funktion durch *ex vivo* IL-2-Aktivierung auch bei STS-Patienten möglich ist, konnte bereits in Vorarbeiten gezeigt [114] und in vorliegender Arbeit bestätigt werden (s. Kapitel 4.2.2). Eine Zunahme der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen gesunder Spender ist ebenfalls beschrieben [107, 194, 195]. Diese war hier allerdings nicht nachweisbar. Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass aktivierte NK-Zellen gesunder Spender aus organisatorischen Gründen stets nach vorangegangener Kryokonservierung gemessen wurden. Die Kryokonservierung hat trotz schonender Vorgehensweise Auswirkungen auf die zytotoxische Funktion der Zellen, sodass die gemessene zytotoxische Aktivität niedriger ausfällt, als sie tatsächlich ohne zwischenzeitliche Kryokonservierung wäre [196-198]. Weiterhin war die Zytotoxizität von vornherein so ausgeprägt, dass eine weitere Zunahme kaum möglich war.

Ein weiterer Beleg dafür, dass die Aktivierung der Zellen funktioniert hat, ist die signifikant höhere Expression der Aktivitätsmarker CD69 und HLA-DR sowie von NKp44 sowohl auf Patienten- als auch auf Spenderzellen nach IL-2-Stimulation (Vgl. Abb. 4-16 A, B, 4-17 B) [130, 199]. Das heißt, dass die NK-Zellen beider Gruppen bezüglich ihrer Aktivierung die gleiche Reaktion auf den IL-2-Stimulus zeigten und den gleichen Aktivitätszustand aufwiesen. Im Hinblick auf die Expansion ist Folgendes zu erwähnen: Für beide Gruppen konnte eine deutliche Zunahme sowohl der CD3^{neg}-Zellen als auch der CD56^{dim}CD16^{bright}-Zellen durch die IL-2-Langzeitkultivierung beobachtet werden (Vgl. Abb. 4-12). Obwohl sich innerhalb der Patientengruppe hierfür keine statistisch signifikanten Unterschiede ergaben, sind doch die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich IL-2-manipulierten Zellen ebenfalls nicht signifikant. Das Fehlen statistischer Signifikanz kann auf eine zu geringe Fallanzahl in

der Gruppe der IL-2-behandelten Patientenzellen zurückgeführt werden und sollte nicht Anlass dazu geben, das Expansionspotenzial der Patientenzellen in Frage zu stellen.

Dennoch muss beachtet werden, dass nicht jede IL-2-Langzeitkultivierung zu dem dargestellten und gewünschten Effekt geführt hat. Es gab auch „unerfolgreiche“ Expansionsversuche, bei welchen es zu einer verhältnismäßig geringen Zunahme der CD3^{neg}-Zellen kam, dafür aber auch CD3^{pos}-Zellen proliferierten (Vgl. Abb. 4-11). Dies ist bei *in vitro* IL-2-Stimulation von PBMCs ein vorbeschriebenes Problem. Es ist bekannt, dass eine relevante Zunahme CD3^{neg}CD56⁺-Zellen nach IL-2-Manipulation nur nach vorangegangener CD3-Depletion generiert werden kann, nicht aber aus PBMCs [195, 200]. So liegt die Vermutung nahe, dass die CD3-Depletion trotz vergleichbarer Versuchsbedingungen im Falle der „unerfolgreichen“ Expansion in vorliegender Arbeit unzureichend war. Dafür spricht auch die Tatsache, dass unterschiedliche Ergebnisse der Expansion auch beim selben Patienten in zwei getrennt durchgeführten Expansionen zu beobachten waren. All das unterstreicht ein weiteres Mal die Bedeutung einer suffizienten CD3-Depletion [195].

Bei den expandierten CD3^{pos}-Zellen handelt es sich mutmaßlich um regulierende T-Lymphozyten, die einerseits auf ihrer Oberfläche einen IL-2-Rezeptor exprimieren, woraus eine Konkurrenz um IL-2 für NK-Zellen entsteht, und die andererseits in hohen Dosen TGF- β sezernieren, was zu einer direkten Hemmung der NK-Zell-Aktivität führt [143, 201]. Dies könnte dazu beitragen, dass aus einer „unerfolgreichen“ Expansion eine nur geringe NK-Zell-Aktivität resultierte (Vgl. Abb. 4-14). Eine weitere Ursache hierfür ist, dass es bei den „unerfolgreichen“ Expansionen innerhalb der CD3^{neg}-Zellen zwar zu einer Zunahme der CD56^{dim}CD16^{neg}-NK-Zellen, nicht aber der CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen kam, die die Hauptträger der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen sind. Eine ähnliche Beobachtung machte die Gruppe um Koehl et al., die zwar die Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität nicht untersucht hat, aber auch divergierende Ergebnisse hinsichtlich der Subpopulationen nach IL-2 Stimulation erhalten und diese als interindividuelle Unterschiede gewertet hat [194]. So ist im Rahmen vorliegender Arbeit auffallend, dass das Phänomen der „unerfolgreichen“ Expansion nur bei Verwendung von Patientenmaterial auftrat und dass aus unabhängig voneinander angesetzten Expansionen desselben Patienten sowohl eine „erfolgreiche“ als auch eine „unerfolgreiche“ Expansion resultierte, was (unter der Annahme konstanter Depletionbedingungen) konstante interindividuelle Unterschiede weniger wahrscheinlich macht. Interessant ist zudem der Zusammenhang zur Proliferation von CD3^{pos}-Zellen, woraus man folgern könnte, dass diese nicht nur Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität, sondern auch auf die Expression von CD16 nehmen. Aus all dem einen Sarkom-vermittelten Effekt abzuleiten, erscheint nicht gerechtfertigt, gibt jedoch Anlass dazu, eine strenge Kontrolle von NK-Zellpräparaten hinsichtlich ihrer Reinheit und ihres zytolytischen Potenzials zu fordern, sollten sie mithilfe des hier getesteten IL-2-Langzeitkultursystems klinische Anwendung finden.

5.2.1.2 Relevante Veränderungen des Phänotyps - Hochregulation von NKG2D

Die der Regeneration der NK-Zell-Funktion zugrundeliegenden immunologischen Prozesse sind für STS-Patienten bislang nicht bekannt. Zur Identifizierung beteiligter Faktoren erfolgten durchflusszytometrische Messungen vor und nach IL-2-Langzeitkultivierung der NK-Zellen von STS-Patienten und gesunden Spendern unter Verwendung eines im Vergleich zur Arbeit von Bücklein et al. erweiterten Panels an Markern (Vgl. [82]). Hierfür wurden nur die Zellen verwendet, aus deren Aktivierung/Expansion eine „erfolgreiche“ Expansion resultierte. Die Ergebnisse wurden mit Messungen von NK-Zellen gesunder Spender verglichen.

Wie in der Literatur vorgeschrieben, führt eine IL-2-Stimulation von NK-Zellen zu phänotypischen Veränderungen, insbesondere hinsichtlich der für die Entfaltung der NK-Zell-Aktivität relevanten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren [54]. Interessant war hier die Beantwortung folgender Fragen: Erstens, wie unterscheidet sich der Phänotyp von gesunden Spendern zu dem von STS-Patienten nach IL-2-Aktivierung? Zweitens, gibt es Unterschiede in der Reaktion auf den IL-2-Stimulus? Und drittens, können hieraus unter Beachtung der phänotypischen Veränderungen, die bereits vor IL-2-Manipulation der Zellen bestanden, Rezeptoren identifiziert werden, die eine Schlüsselrolle für die NK-Zell-Funktionalität bei STS-Patienten spielen?

Zur Beantwortung der ersten Frage dient der Vergleich der Ergebnisse von gesunden Spendern und Patientenzellen nach IL-2-Aktivierung. Legt man die statistische Auswertung zugrunde, weisen gesunde Spender und Patienten nach IL-2-Stimulation einen nicht signifikant unterschiedlichen Phänotyp hinsichtlich der Expressionsdichte aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf (s. Kapitel 4.2.5). Das würde bedeuten, dass die unter 5.1.3 beschriebenen Veränderungen des Phänotyps bei STS-Patienten im Vergleich zu nicht-expandierten NK-Zellen gesunder Spender durch IL-2-Stimulation vollständig reversibel sind. In der Literatur finden sich ähnliche Ergebnisse für NK-Zellen von Patienten, die an Brustkrebs oder malignen Melanomen leiden [199, 202]. Aufgrund der in der Gruppe der expandierten Patientenzellen niedrigen Fallzahlen gelten für die statistische Auswertung offensichtliche Beschränkungen. So finden sich Hinweise, dass sich der Phänotyp doch hinsichtlich der Expression folgender Rezeptoren unterscheidet: NKp30, CD2 und NKG2D. Sowohl für NKp30 als auch für CD2 zeigte sich eine niedrigere Expression auf expandierten Patientenzellen als auf expandierten NK-Zellen der Spendergruppe (Vgl. Abb. 4-17 A, 4-18 D). Dies entspricht den Ergebnissen der Untersuchung unstimulierter NK-Zellen (Vgl. Abb. 4-5 A, 4-6D bzw. Kapitel 5.1.3). Das bedeutet, dass die reduzierte Expression von NKp30 und CD2 durch IL-2 nicht vollständig reversibel ist. Dies könnte erneut darauf hinweisen, dass es sich hierbei um einen Sarkom-vermittelten Effekt handelt. Dennoch kann die NK-Zell-Dysfunktion durch IL-2 regeneriert werden. Hieraus geht hervor, dass Veränderungen anderer Rezeptoren ausreichen, um den NKp30 und CD2-vermittelten Defekt von Patientenzellen- zumindest *in*

vitro - zu überwinden. Hierfür kommt vor allem NKG2D in Betracht, das signifikant höher auf expandierten Patientenzellen als auf expandierten Spenderzellen exprimiert wird (Vgl. Abb. 4-18 C).

Betrachtet man die Reaktion der beiden Gruppen auf IL-2, fällt auf, dass sowohl Spender- als auch Patientenzellen das gleiche Verhalten hinsichtlich phänotypischer Veränderungen auf den Stimulus aufweisen. So beinhalteten die phänotypischen Veränderungen bei beiden Gruppen eine Induktion der Expression von NKp44, NKG2D und CD94 und eine Abnahme der Expressionsdichte von CD8 und NKG2A, während die Expressionslevels der restlichen gemessenen aktivierenden oder inhibierenden Rezeptoren gleich blieben. Für NKG2D ist dieser Unterschied nur für Patientenzellen signifikant (Vgl. Abb. 4-18 C), was erneut darauf hindeutet, dass NKG2D eine bedeutende Rolle für die Zytotoxizität bei Patienten mit STS spielt. Die IL-2-vermittelte Hochregulation von NKG2D ist ein bekanntes Phänomen, das mit einer gesteigerten NK-Zell-Aktivität positiv korreliert [202-205]. Gleiches gilt für NKp44 (Vgl. Abb. 4-17 B) [99, 167, 206]. So ist auch hier von einem Zusammenhang zwischen IL-2-induzierter NKG2D- bzw. NKp44-Expression und der verbesserten Zytotoxizität auszugehen. Auch die Hochregulation von CD94 (Vgl. Abb 4-19 A) durch IL-2 ist in der Literatur beschrieben [99, 167, 206] und ist zumindest bei Hsp70-exprimierenden Tumorzellen wie z.B. K562-Zellen mit einer gesteigerten zytolytischen Aktivität assoziiert [168]. Überraschend war jedoch gerade im Zusammenhang mit CD94 die Abnahme der Expressionsdichte von NKG2A (Vgl. Abb. 4-19 B). Diese erreichte zwar nur bei Spenderzellen statistische Signifikanz, ein gleichläufiger Trend lässt sich aber auch bei Patientenproben erkennen. Obwohl eine Abnahme der Expression des inhibierenden Rezeptors ebenfalls eine Erklärung für die gesteigerte Zytotoxizität liefern könnte, hat sie im verwendeten Versuchsaufbau mangels Expression entsprechender Liganden auf K562-Zellen keine Relevanz. Dies gilt jedoch nicht für die Zytotoxizität *in vivo*. Dieser IL-2-Effekt war nicht erwartet und ist umso bemerkenswerter. Hieraus lässt sich die folgende Erklärung für eine Zunahme der Zytotoxizität im Versuchssystem ableiten: CD94 bildet Heterodimere mit Molekülen der NKG2-Gruppe. Durch die Abnahme der NKG2A-Expression wird eine Dimerisierung mit den aktivierenden Rezeptoren NKG2C/E wahrscheinlicher. Beides führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung aktivierender Signale. K562-Zellen exprimieren zwar kein HLA-E auf ihrer Oberfläche, dafür aber Hsp70, das als aktivierender Ligand für NKG2C angesehen wird. So könnte sich eine weitere Verbesserung der Zytotoxizität *in vitro* erklären [167, 168]. Analysen zur Expression von NKG2C/E wurden in vorliegender Arbeit nicht durchgeführt, könnten aber weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Relevanz von CD94/NKG2A liefern, zumal für NKG2C eine IL-2-vermittelte Hochregulation in der Literatur beschrieben ist [107].

Auch die signifikant reduzierte Expression von CD8 auf stimulierten Zellen ist ein überraschendes Ergebnis (Vgl. Abb. 4-18 E). *In vitro* scheint dies keine Rolle für die NK-Zell-

Funktion zu spielen. Ob das *in vivo* auch der Fall ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Ergebnisse bestätigen aber erneut, dass Patienten- und Spenderzellen die gleiche Reaktion auf den Stimulus zeigen.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Immunphänotyp von STS-Patienten dem von gesunden Spendern in erster Linie durch eine reduzierte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKp44, NKG2D, NKp30 sowie des inhibierenden Rezeptors NKG2A unterscheidet. Zudem scheint der „Priming“-Prozess durch die reduzierte Expression von CD2 eine Rolle zu spielen (s. Kapitel 5.1.3). Vergleicht man das mit den Ergebnissen nach Aktivierung der Zellen, scheint insbesondere NKG2D ein zentraler Regulator für die NK-Zell-Funktion bei STS-Patienten darzustellen.

5.2.1.3 Nebeneffekte – Effektormoleküle, Maturierungsmarker und Chemokinrezeptoren

Bezüglich der übrigen untersuchten Marker zeigte die IL-2-Aktivierung noch einige Nebeneffekte. So kam es z.B. zu einer signifikanten Zunahme von Granzym A in IL-2-manipulierten Zellen gesunder Spender, während sich bezüglich des Gehalts an Perforin und Granzym B für beide Gruppen keine Änderung auf den IL-2-Stimulus zeigte (s. Kapitel 4.2.3). Die Ergebnisse hierzu, die in der Literatur beschrieben sind, sind widersprüchlich. So konnte beispielsweise die Gruppe um Berg et al. keine signifikante Änderung der Expression der Effektormoleküle bei gesunden Spendern nach IL-2-Manipulation feststellen [107]. Im Gegensatz dazu erbrachten die Daten der Gruppe um Saito et al. eine relevante Zunahme von Perforin und Granzym B durch IL-2 [195]. Aus diesem Grund erscheint es nicht gerechtfertigt, aus der Zunahme von Granzym A eine Relevanz abzuleiten. Es kann jedoch festgehalten werden, dass gesunde Spender und Patienten sowohl vor als auch nach Stimulation der Zellen einen vergleichbaren Gehalt an Effektormolekülen aufwiesen. Somit ist davon auszugehen, dass bereits vor der IL-2-Manipulation ausreichend Moleküle zur Verfügung standen, um eine effektive Zytolyse einzuleiten, was wiederum ein Beleg für die unter 5.1.2 diskutierte These ist, dass NK-Zellen von STS-Patienten primär durch eine Störung ihrer Aktivierung, und nicht so sehr ihrer Effektorfunktion, eine ineffiziente Zytotoxizität aufweisen.

Die Messungen der Maturierungsmarker erbrachten uneindeutige Ergebnisse. So kam es für CD57 und CD27 zu einer Herunterregulation, für Tim-3 und CD117 zu einer Hochregulation (s. Kapitel 4.2.6.1). Mit Ausnahme von CD27, dessen Herunterregulation nur für gesunde Spender signifikant war, waren die Unterschiede für die restlichen Marker für beide Gruppen signifikant und gleichlautend. Die Expression der Marker nach Aktivierung ergab bei den Gruppen ähnliche Werte. Die signifikanten Unterschiede zwischen vor und nach Aktivierung, die ja teilweise widersprüchlich sind, können lediglich als Nebeneffekt der IL-2-Aktivierung gewertet werden. Die *ex vivo* Langzeitkultivierung mit IL-2 stellt ein sehr artifizielles System dar, sodass hier wahrscheinlich viele weitere Einflussfaktoren eine Rolle spielen. Zudem

wurde in vorliegender Arbeit stets die mittlere Fluoreszenzintensität ausgewertet, also die Expressionsdichte. In der Literatur finden sich für die Maturierungsmarker mit Ausnahme von CD27 meist Angaben zu den %-positiven Zellen, was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse für Schlussfolgerungen schwierig macht. Dennoch kann festgehalten werden, dass die Zellen gesunder Spender und Patienten das gleiche Verhalten auf den IL-2-Stimulus hinsichtlich der Maturierung zeigen und sich im Hinblick auf die Maturierungsmarker phänotypisch nicht unterscheiden. Alleine die Tatsache, dass sich bei „erfolgreichen“ Expansionen weiterhin ganz überwiegend CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen finden, lässt den Schluss zu, dass es sich – sowohl bei gesunden Spendern als auch Patienten – weiterhin um terminal differenzierte NK-Zellen handelt.

Auch die Änderungen der Chemokinrezeptorexpression (s. Kapitel 4.2.6.2) können als Nebeneffekt gewertet werden. Wie bereits erwähnt, spielen die Chemokinrezeptoren *in vitro* keine Rolle für die Funktionsfähigkeit der Zellen, während sie *in vivo* wichtig für die Migration der Zellen zum Tumorgewebe sind [81]. Somit können die insgesamt niedrige Expression von CX₃CR1 und die fehlende Expression von CXCR6 auch nach IL-2-Stimulation *in vivo* ein Problem für die Migration zum Tumor sein.

5.2.2 Indirekte Stimulation der NK-Zell-Funktion durch Hyperthermie der Tumorzellen

Die Hyperthermie stellt einen weiteren potentiellen Mechanismus dar, um die Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber NK-Zellen zu verbessern (s. Kapitel 1.2.5.2).

5.2.2.1 Resistenz der Sarkom-Zelllinien auch nach Hitzeschockbehandlung

Für die Zytotoxizitätsassays von Sarkom-Zelllinien nach Hyperthermie wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass die Hyperthermie -zumindest *in vitro*- die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber NK-Zellen verstärkt [124, 207]. Diese Annahme kann für die getesteten Sarkom-Zelllinien nicht bestätigt werden, da keine relevante Änderung der Zytolyse nachgewiesen werden konnte (Vgl. Abb. 4-22). Überraschenderweise zeigte sich allerdings für K562-Zellen ebenfalls kein Effekt. Dies war nicht erwartet und steht im Gegensatz zu den in der Literatur verfügbaren Daten, was die Belastbarkeit der publizierten Daten in Frage stellt [119, 207]. Die Hitzeschockbehandlung erfolgte stets unter strenger Temperaturkontrolle in eigens hierfür bereitgestellten Brutschränken mit 41,8°C und 43°C. Somit kann eine fehlerhafte Temperaturbehandlung als Ursache ausgeschlossen werden.

Die immunogene Wirkung einer Hitzeschockbehandlung von Tumorzellen soll auf zwei Mechanismen beruhen: Erstens soll die Stressbehandlung zu einer Induktion von Hsp70 sowohl intrazellulär als auch auf der Zellmembran führen und zweitens soll es zu einer Hochregulation NK-aktivierender Liganden kommen [125, 208]. Deshalb wurden in weiteren Schritten Messungen zu den genannten Mechanismen durchgeführt.

5.2.2.2 Induktion der Hsp70-Expression - intrazellulär und/oder extrazellulär

Alle Sarkom-Zelllinien, die mithilfe von Westerblots hinsichtlich ihres intrazellulären Gehalts an Hsp70 untersucht wurden, zeigten nach den Hitzeschockbehandlungen eine deutliche Zunahme von Hsp70 (Vgl. Abb. 4-23, 4-24). Zellen reagieren auf thermalen Stress mit der intrazellulären Produktion von Hsp70, um sich vor stress-induzierter Apoptose zu schützen [140] (s. Kapitel 1.2.5.2). So konnte in vorliegender Arbeit nachgewiesen werden, dass die Hyperthermiebehandlung der Zellen zu einer adäquaten Stressreaktion geführt hat. Eine Perforin- oder Granzym-induzierte Apoptose kann durch Hsp70 nicht verhindert werden [27]. Aus diesem Grund ist es nicht gerechtfertigt, aus dem gesteigerten intrazellulären Gehalt an Hsp70 die hier bestehende Resistenz der Tumorzellen gegenüber einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität abzuleiten. Um NK-Zellen nach der Hyperthermie-Behandlung zu aktivieren, muss Hsp70 auf der Zellmembran exprimiert werden [208]. Dies ist selbst unter physiologischen Bedingungen bei vielen malignen Zellen der Fall und kann durch die Hitzeschockbehandlung noch verstärkt werden [122, 140]. Die durchflusszytometrischen Analysen der Expression von Hsp70 auf der Zellmembran erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. Hsp70 wurde nur auf drei von vier getesteten Sarkom-Zelllinien überhaupt exprimiert und nur bei einer der Sarkom-Zelllinien konnte ein Effekt der Hyperthermiebehandlung gezeigt werden (Vgl. Abb. 4-25). Dies betraf die Zelllinie eines Ewing-Sarkoms, für das eine Hochregulation von Hsp70 auf einen Hitzestimulus bereits dokumentiert ist [117]. Dennoch führte die gesteigerte Hsp70-Expression auf der Zellmembran auch bei dieser Zelllinie zu keiner relevanten Zunahme der NK-Zell-Funktion. Dieses Ergebnis war nicht erwartet und widerspricht erneut den hierzu veröffentlichten Daten [118]. Wie vorbeschrieben, wiesen K562-Zellen bei 37°C eine Expression von Hsp70 auf [168]. Auch diese konnte jedoch durch die Hitzeschockbehandlung kaum gesteigert werden. Das steht ebenfalls im Gegensatz zur verfügbaren Literatur [119]. Dennoch stellt die unveränderte membranständige Expression von Hsp70 sowohl auf K562-Zellen wie auch auf drei der Sarkom-Zelllinien eine Erklärung dafür dar, dass die Hyperthermie der Zellen keine Veränderung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen induzierte.

Wurde Hsp70 auf den Hitzestimulus intrazellulär neu synthetisiert, muss das Protein für die Expression auf der Zelloberfläche die Zellmembran passieren. Über die hierfür notwendigen Eigenschaften verfügt Hsp70 selbst nicht [116]. Deshalb benötigt das Protein einen „Membrantransport“. Dies geschieht durch Interaktion mit bestimmten Lipidkomponenten der Membran [116, 209]. Der Transport ist ein hochkomplexer Vorgang, der bis heute nicht vollständig verstanden ist [210]. Betrachtet man die Ergebnisse hinsichtlich des intra- und extrazellulären Gehalts vor und nach Hitzeschockbehandlung, liegt die Vermutung nahe, dass der „Membrantransport“ bei den Sarkom-Zelllinien (mit Ausnahme des Ewing-Sarkoms) nicht

funktioniert hat. Dass es sich hierbei um einen STS-bedingten Defekt handelt, erscheint vor dem Hintergrund der auch auf K562-Zellen nur wenig induzierbaren Hsp70-Membranexpression jedoch unwahrscheinlich.

Darüber hinaus auffallend war, dass die Zytotoxizität, trotz der von vornherein bestehenden Hsp70-Membranexpression, auf den Sarkom-Zelllinien insgesamt sehr niedrig ausfiel (Vgl. Abb. 4-22). In vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Sarkom-Zelllinien eine hohe Expression NK-inhibierender Liganden aufweisen (s. Kapitel 5.1.5). Dies impliziert, dass Hsp70 -zumindest in der hier festgestellten Expressionsdichte- als NK-aktivierender Ligand nicht ausreicht, um die Signale der Inhibierung zu übertreffen.

5.2.2.3 Veränderungen der Antigenausstattung der Tumorzellen

Die gesteigerte Sensitivität von hitzeschockbehandelten Tumorzellen gegenüber NK-Zellen hängt nicht nur von der Membranexpression von Hsp70 ab, sondern kann auch auf hitzeinduzierte Veränderungen der Expression aktivierender und inhibierender NK-Liganden zurückgeführt werden [123-125]. Dies kann auf die getesteten Sarkom-Zelllinien in dieser Arbeit nicht übertragen werden, da die durchflusszytometrischen Messungen der NK-Liganden nach Hyperthermie der Zellen für keinen der Marker wesentliche Änderungen der Expression erbrachten (s. Kapitel 4.3.3.1, 4.3.3.2). Insofern ist es nicht verwunderlich, dass die Zytotoxizität durch die Hitzebehandlung nicht verbessert werden konnte.

5.2.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Trotz des initial deutlich bestehenden Defekts konnte die NK-Zell-Funktion bei STS-Patienten durch die IL-2-haltige Langzeitkultivierung *in vitro* wiederhergestellt werden. Hierbei konnte ein Aktivitätslevel erreicht werden, das dem stimulierter NK-Zellen gesunder Spender entspricht. Desweiteren konnte eine erfolgreiche Expansion der zytotoxischen NK-Zell-Population nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen gesunder Spender und von STS-Patienten hinsichtlich der Expression verschiedener Rezeptoren die gleiche Reaktion auf den IL-2-Stimulus zeigen und sich phänotypisch nach Aktivierung kaum mehr unterscheiden. Es konnte eine Regeneration der NKG2D-Expression bei STS-Patienten erreicht werden. Die Expression von NKp30 und CD2 blieb zwar unverändert; aber die Hochregulation von NKG2D reicht offensichtlich als Trigger für die Aktivierung aus. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass NKG2D einen geeigneten Marker für das Monitorieren der NK-Zell-Funktion bei STS-Patienten darstellt. Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass eine Immuntherapie basierend auf der hier durchgeführten IL-2-haltigen Langzeitkultur einen vielversprechenden Ansatz für STS-Patienten darstellt. Ob sich hierfür allogene oder autologe NK-Zellen besser eignen, kann nicht beantwortet werden. Um endgültige Rückschlüsse auf involvierte Liganden-Rezeptor-Interaktionen bei STS ziehen zu können, sollte die Verwendung

von Primärtumormaterial als Targetzellen für expandierte NK-Zellen Bestandteil zukünftiger Projekte sein.

Die Hyperthermiebehandlung der Tumorzellen führte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* zu keiner Besserung der NK-Zell-Aktivität. Dennoch wurde die Wirksamkeit einer solchen Behandlung als additive Therapie in klinischen Studien nachgewiesen und führte zu einer Verbesserung des lokalen progressionsfreien Überlebens [211]. Dass diese Effekte über immunologische Mechanismen erreicht werden, ist bislang allerdings nicht erwiesen und ist in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit auch weiterhin unwahrscheinlich.

Andererseits ist zu bedenken, dass die hier erfolgten Zytotoxizitätsassays nur eine grobe Screeningmethode darstellen, die die Situation am Tumor nicht widerspiegelt. Aus diesem Grund wäre für die Untersuchung der potentiellen immunmodulatorischen Aktivität der Hyperthermie die Verwendung von Primärtumormaterial ein weiterer interessanter Ansatz für zukünftige Experimente.

6 Literaturverzeichnis

1. DGHO, D.G.f.H.u.M.O. *Weichgewebssarkome (maligne Weichgewebstumoren) des Erwachsenen*. 2019; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/weichgewebssarkome-maligne-weichgewebstumoren-des-erwachsenen/@@view/html/index.html>.
2. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.
3. Voskoboinik, I., J.C. Whisstock, and J.A. Trapani, *Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(6): p. 388-400.
4. Clark, M.A., et al., *Soft-tissue sarcomas in adults*. N Engl J Med, 2005. **353**(7): p. 701-11.
5. Stiller, C.A., et al., *Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project*. Eur J Cancer, 2013. **49**(3): p. 684-95.
6. Demetri, G.D., et al., *Soft tissue sarcoma*. J Natl Compr Canc Netw, 2010. **8**(6): p. 630-74.
7. Eriksson, M., L. Hardell, and H.O. Adami, *Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(6): p. 486-90.
8. Brady, M.S., J.J. Gaynor, and M.F. Brennan, *Radiation-associated sarcoma of bone and soft tissue*. Arch Surg, 1992. **127**(12): p. 1379-85.
9. Lindor, N.M., et al., *Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2008(38): p. 1-93.
10. Fletcher, C.D., et al., *WHO Classification of tumours of soft tissue and bone. 2013*. Lyon: IARC, 2013: p. 305-310.
11. Ducimetiere, F., et al., *Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e20294.
12. Almond, L.M., et al., *Neoadjuvant and adjuvant strategies in retroperitoneal sarcoma*. Eur J Surg Oncol, 2018. **44**(5): p. 571-579.
13. Coindre, J.M., *Grading of soft tissue sarcomas: review and update*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(10): p. 1448-53.
14. AJCC, A.J.C.o.C., *AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition*. 8th edition ed. Springer Verlag. 2016: American College of Surgeons.

15. ESMO, E.S.N.W.G., *Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii102-12.
16. Wendtner, C.M., S. Delank, and H. Eich, [*Multimodality therapy concepts for soft tissue sarcomas*]. Internist (Berl), 2010. **51**(11): p. 1388-96.
17. Verma, S., et al., *Meta-analysis of ifosfamide-based combination chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma*. Cancer Treat Rev, 2008. **34**(4): p. 339-47.
18. Oosten, A.W., et al., *Outcomes of first-line chemotherapy in patients with advanced or metastatic leiomyosarcoma of uterine and non-uterine origin*. Sarcoma, 2009. **2009**: p. 348910.
19. Scurr, M., *Histology-driven chemotherapy in soft tissue sarcomas*. Curr Treat Options Oncol, 2011. **12**(1): p. 32-45.
20. Kawai, A., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase III study of pazopanib in patients with soft tissue sarcoma: results from the Japanese subgroup*. Jpn J Clin Oncol, 2016. **46**(3): p. 248-53.
21. van der Graaf, W.T., et al., *Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. Lancet, 2012. **379**(9829): p. 1879-86.
22. Issels, R.D., *Hyperthermia adds to chemotherapy*. Eur J Cancer, 2008. **44**(17): p. 2546-54.
23. Hildebrandt, B., et al., *The cellular and molecular basis of hyperthermia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **43**(1): p. 33-56.
24. Kampinga, H.H. and E. Dikomey, *Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance*. Int J Radiat Biol, 2001. **77**(4): p. 399-408.
25. Armour, E.P., et al., *Sensitivity of human cells to mild hyperthermia*. Cancer Res, 1993. **53**(12): p. 2740-4.
26. Harmon, B.V., et al., *Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load*. Int J Radiat Biol, 1990. **58**(5): p. 845-58.
27. Milani, V. and E. Noessner, *Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(3): p. 312-9.
28. Lindner, L.H. and R.D. Issels, *Hyperthermia in soft tissue sarcoma*. Curr Treat Options Oncol, 2011. **12**(1): p. 12-20.
29. Casali, P.G., J.Y. Blay, and E.C.E.C.P.o. experts, *Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 5**: p. v198-203.

30. Lanier, L.L., et al., *Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule*. J Exp Med, 1989. **169**(6): p. 2233-8.
31. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
32. Sutlu, T. and E. Alici, *Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects*. J Intern Med, 2009. **266**(2): p. 154-81.
33. Galy, A., et al., *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 459-73.
34. Langers, I., et al., *Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis*. Biologics, 2012. **6**: p. 73-82.
35. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
36. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4947-55.
37. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 89-94.
38. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
39. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
40. Nagler, A., et al., *Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells*. J Immunol, 1989. **143**(10): p. 3183-91.
41. Jacobs, R., et al., *CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3121-7.
42. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
43. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
44. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 89-95.
45. Karre, K., *NK cells, MHC class I molecules and the missing self*. Scand J Immunol, 2002. **55**(3): p. 221-8.

46. Holmes, T.D., et al., *A human NK cell activation/inhibition threshold allows small changes in the target cell surface phenotype to dramatically alter susceptibility to NK cells.* J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1538-45.
47. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells.* Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
48. Borrego, F., et al., *Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis.* J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 813-8.
49. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors.* Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
50. Burshtyn, D.N., et al., *Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor.* Immunity, 1996. **4**(1): p. 77-85.
51. Hudspeth, K., B. Silva-Santos, and D. Mavilio, *Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 69.
52. Bryceson, Y.T., et al., *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells.* Immunol Rev, 2006. **214**: p. 73-91.
53. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion.* Blood, 2006. **107**(1): p. 159-66.
54. Konjevic, G., A. Vuletic, and K. Mirjagic Martinovic, *Natural killer cell receptors: alterations and therapeutic targeting in malignancies.* Immunol Res, 2016. **64**(1): p. 25-35.
55. Kruse, P.H., et al., *Natural cytotoxicity receptors and their ligands.* Immunol Cell Biol, 2014. **92**(3): p. 221-9.
56. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.* Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
57. Stephens, H.A., *MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?* Trends Immunol, 2001. **22**(7): p. 378-85.
58. Pende, D., et al., *Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity.* Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6178-86.
59. Sivori, S., et al., *Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4526-31.
60. Brown, M.H., et al., *2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48.* J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2083-90.

61. Bottino, C., et al., *Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 557-67.
62. Masson, D., et al., *Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma*. Gut, 2001. **49**(2): p. 236-40.
63. Reymond, N., et al., *DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1331-41.
64. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 501-10.
65. Lopez, J.A., et al., *Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack*. Blood, 2013. **121**(14): p. 2659-68.
66. Voskoboinik, I., M.J. Smyth, and J.A. Trapani, *Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 940-52.
67. Roder, J.C., et al., *A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells*. Nature, 1980. **284**(5756): p. 553-5.
68. Sullivan, J.L., et al., *Deficient natural killer cell activity in x-linked lymphoproliferative syndrome*. Science, 1980. **210**(4469): p. 543-5.
69. Morvan, M.G. and L.L. Lanier, *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(1): p. 7-19.
70. Gorelik, E., et al., *Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice*. Int J Cancer, 1982. **30**(1): p. 107-12.
71. Barlozzari, T., C.W. Reynolds, and R.B. Herberman, *In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats*. J Immunol, 1983. **131**(2): p. 1024-7.
72. Coca, S., et al., *The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma*. Cancer, 1997. **79**(12): p. 2320-8.
73. Ishigami, S., et al., *Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma*. Cancer, 2000. **88**(3): p. 577-83.
74. Villegas, F.R., et al., *Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer*. Lung Cancer, 2002. **35**(1): p. 23-8.
75. Cao, F.M., et al., *[Prognostic significances of natural killer cells and dendritic cells infiltrations in esophageal squamous cell carcinoma]*. Ai Zheng, 2005. **24**(2): p. 232-6.

76. Imai, K., et al., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. Lancet, 2000. **356**(9244): p. 1795-9.
77. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle, *Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4098-102.
78. Wang, B., et al., *p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2359.
79. O'Connell, J., et al., *Fas ligand expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer*. J Pathol, 1998. **186**(3): p. 240-6.
80. Bennett, M.W., et al., *The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5669-75.
81. Vitale, M., et al., *Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function*. Eur J Immunol, 2014. **44**(6): p. 1582-92.
82. Bucklein, V., et al., *Progressive natural killer cell dysfunction associated with alterations in subset proportions and receptor expression in soft-tissue sarcoma patients*. Oncoimmunology, 2016. **5**(7): p. e1178421.
83. Bi, J. and Z. Tian, *NK Cell Exhaustion*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 760.
84. Costello, R.T., et al., *Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3661-7.
85. Balsamo, M., et al., *Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(49): p. 20847-52.
86. Katrinakis, G., et al., *Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha*. Acta Haematol, 1996. **96**(1): p. 16-23.
87. Balsamo, M., et al., *Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC*. Eur J Immunol, 2013. **43**(10): p. 2756-64.
88. Hafner, M., et al., *TNF promotes metastasis by impairing natural killer cell activity*. Int J Cancer, 1996. **66**(3): p. 388-92.
89. Viel, S., et al., *TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway*. Sci Signal, 2016. **9**(415): p. ra19.
90. Li, T., et al., *Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO*. Cancer Lett, 2012. **318**(2): p. 154-61.

91. Castriconi, R., et al., *Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4120-5.
92. Kopp, H.G., T. Placke, and H.R. Salih, *Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7775-83.
93. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
94. Della Chiesa, M., et al., *Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 351.
95. Wiesmayr, S., et al., *Decreased NKp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLD*. Eur J Immunol, 2012. **42**(2): p. 541-50.
96. Beldi-Ferchiou, A., et al., *PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma*. Oncotarget, 2016. **7**(45): p. 72961-72977.
97. Benson, D.M., Jr., et al., *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody*. Blood, 2010. **116**(13): p. 2286-94.
98. Zwirner, N.W. and C.I. Domaica, *Cytokine regulation of natural killer cell effector functions*. Biofactors, 2010. **36**(4): p. 274-88.
99. Hromadnikova, I., P. Pirkova, and L. Sedlackova, *Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp-70-derived 14-mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 405295.
100. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
101. Zamai, L., et al., *NK cells and cancer*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4011-6.
102. Burns, L.J., et al., *IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial*. Bone Marrow Transplant, 2003. **32**(2): p. 177-86.
103. Ishikawa, E., et al., *Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma*. Anticancer Res, 2004. **24**(3b): p. 1861-71.
104. Geller, M.A., et al., *A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer*. Cytotherapy, 2011. **13**(1): p. 98-107.

105. Poznanski, S.M., et al., *Expanded CD56superbrightCD16+ NK cells from ovarian cancer patients are cytotoxic against autologous tumor in a patient-derived xenograft murine model*. *Cancer Immunol Res*, 2018.
106. Chang, S.K., et al., *Carfilzomib combined with ex vivo-expanded patient autologous natural killer cells for myeloma immunotherapy*. *Neoplasma*, 2018.
107. Berg, M., et al., *Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells*. *Cytotherapy*, 2009. **11**(3): p. 341-55.
108. Parkhurst, M.R., et al., *Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(19): p. 6287-97.
109. Krause, S.W., et al., *Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(11): p. 3699-707.
110. Nathenson, M.J., A.P. Conley, and E. Sausville, *Immunotherapy: A New (and Old) Approach to Treatment of Soft Tissue and Bone Sarcomas*. *Oncologist*, 2018. **23**(1): p. 71-83.
111. Schwinger, W., et al., *Feasibility of high-dose interleukin-2 in heavily pretreated pediatric cancer patients*. *Ann Oncol*, 2005. **16**(7): p. 1199-206.
112. Tong, A.A., et al., *Adoptive natural killer cell therapy is effective in reducing pulmonary metastasis of Ewing sarcoma*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(4): p. e1303586.
113. Ratnavelu, K., et al., *Autologous immune enhancement therapy against an advanced epithelioid sarcoma: A case report*. *Oncol Lett*, 2013. **5**(5): p. 1457-1460.
114. Bücklein, V., *Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid in Kombination mit regionaler Hyperthermie in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen – klinische Ergebnisse und Effekte auf die lytische Aktivität von natürlichen Killerzellen*, in *Medizinischen Klinik und Poliklinik III – Campus Großhadern*. 2013, Ludwig-Maximilians-Universität München.
115. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. *Nature*, 1996. **381**(6583): p. 571-9.
116. Multhoff, G., *Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance*. *Methods*, 2007. **43**(3): p. 229-37.
117. Multhoff, G., et al., *A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells*. *Int J Cancer*, 1995. **61**(2): p. 272-9.

118. Multhoff, G., et al., *CD3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells*. Blood, 1995. **86**(4): p. 1374-82.
119. Botzler, C., et al., *Synergistic effects of heat and ET-18-OCH3 on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells*. Exp Hematol, 1999. **27**(3): p. 470-8.
120. Botzler, C., R. Issels, and G. Multhoff, *Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells*. Cancer Immunol Immunother, 1996. **43**(4): p. 226-30.
121. Kleinjung, T., et al., *Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy-a target for natural killer (NK) cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **57**(3): p. 820-6.
122. Multhoff, G., *Heat shock protein 72 (HSP72), a hyperthermia-inducible immunogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's sarcoma cells*. Int J Hyperthermia, 1997. **13**(1): p. 39-48.
123. Ostberg, J.R., et al., *Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(5): p. 1322-31.
124. Kim, J.Y., et al., *Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation*. Exp Mol Med, 2006. **38**(5): p. 474-84.
125. Dayanc, B.E., et al., *Dissecting the role of hyperthermia in natural killer cell mediated anti-tumor responses*. Int J Hyperthermia, 2008. **24**(1): p. 41-56.
126. Friedrichs B., B.C., Tietze-Bürger, Ullrich C., Ried C., Sinelnikov E., Uharek L., Hoffmeister H.,. *Expansion of CD3 negative CD56 positive NK Cells for repeated clinical application in a GMP Compliant Process Using a Novel Bioreactor System*. 2012; Available from: http://www.zellwerk.biz/poster_EBMT_2012.pdf.
127. Krupka, C., et al., *CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330*. Blood, 2014. **123**(3): p. 356-65.
128. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.
129. Borrego, F., et al., *CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor*. Immunology, 1999. **97**(1): p. 159-65.
130. Evans, J.H., et al., *A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG*. Eur J Immunol, 2011. **41**(7): p. 1924-33.

131. Bryceson, Y.T., et al., *Molecular mechanisms of natural killer cell activation*. J Innate Immun, 2011. **3**(3): p. 216-26.
132. Addison, E.G., et al., *Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity*. Immunology, 2005. **116**(3): p. 354-61.
133. Lopez-Verges, S., et al., *CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3865-74.
134. Ndhlovu, L.C., et al., *Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity*. Blood, 2012. **119**(16): p. 3734-43.
135. Freud, A.G., et al., *Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 1033-43.
136. Vossen, M.T., et al., *CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3739-45.
137. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.
138. Berahovich, R.D., et al., *Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7833-40.
139. Lanier, L.L., et al., *Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen*. J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1572-85.
140. Gehrman, M., et al., *The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells*. Cell Stress Chaperones, 2008. **13**(1): p. 1-10.
141. Parry, H.M., et al., *NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma*. Oncotarget, 2016. **7**(42): p. 68513-68526.
142. Sanchez, C.J., et al., *Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(1): p. 1-13.
143. Mamessier, E., et al., *Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3609-22.
144. Saito, H., T. Osaki, and M. Ikeguchi, *Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer*. Gastric Cancer, 2012. **15**(1): p. 27-33.

145. Paul, S., et al., *Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(12): p. e1235106.
146. Nieto-Velazquez, N.G., et al., *Altered Expression of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients*. *Transl Oncol*, 2016. **9**(5): p. 384-391.
147. Pietra, G., et al., *Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity*. *Cancer Res*, 2012. **72**(6): p. 1407-15.
148. El-Sherbiny, Y.M., et al., *The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8444-9.
149. Hamblet, C.E., et al., *NK Cell Maturation and Cytotoxicity Are Controlled by the Intramembrane Aspartyl Protease SPPL3*. *J Immunol*, 2016. **196**(6): p. 2614-26.
150. Silva, A., et al., *Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets*. *Int Immunol*, 2008. **20**(4): p. 625-30.
151. Guillot, B., et al., *The expression of cytotoxic mediators is altered in mononuclear cells of patients with melanoma and increased by interferon-alpha treatment*. *Br J Dermatol*, 2005. **152**(4): p. 690-6.
152. Hodge, G., et al., *Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)-gamma by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells*. *Clin Exp Immunol*, 2014. **178**(1): p. 79-85.
153. Peng, Y.P., et al., *Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer*. *J Transl Med*, 2013. **11**: p. 262.
154. Hietakangas, V., et al., *Erythroid differentiation sensitizes K562 leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by downregulation of c-FLIP*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(4): p. 1278-91.
155. Fauriat, C., et al., *Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction*. *Blood*, 2007. **109**(1): p. 323-30.
156. Veuillen, C., et al., *Primary B-CLL resistance to NK cell cytotoxicity can be overcome in vitro and in vivo by priming NK cells and monoclonal antibody therapy*. *J Clin Immunol*, 2012. **32**(3): p. 632-46.
157. Garcia-Iglesias, T., et al., *Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 186.
158. Fregni, G., et al., *Phenotypic and functional characteristics of blood natural killer cells from melanoma patients at different clinical stages*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76928.

159. Hanaoka, N., et al., *NKG2D initiates caspase-mediated CD3zeta degradation and lymphocyte receptor impairments associated with human cancer and autoimmune disease*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 5732-42.
160. Rocca, Y.S., et al., *Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 413.
161. Pegram, H.J., et al., *Activating and inhibitory receptors of natural killer cells*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 216-24.
162. Srour, E.F., et al., *Cytolytic activity of human natural killer cell subpopulations isolated by four-color immunofluorescence flow cytometric cell sorting*. Cytometry, 1990. **11**(3): p. 442-6.
163. Sabry, M., et al., *Leukemic priming of resting NK cells is killer Ig-like receptor independent but requires CD15-mediated CD2 ligation and natural cytotoxicity receptors*. J Immunol, 2011. **187**(12): p. 6227-34.
164. North, J., et al., *Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 85-94.
165. Gunturi, A., R.E. Berg, and J. Forman, *The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity*. Immunol Res, 2004. **30**(1): p. 29-34.
166. Mavilio, D., et al., *Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15011-6.
167. Stangl, S., et al., *Influence of Hsp70 and HLA-E on the killing of leukemic blasts by cytokine/Hsp70 peptide-activated human natural killer (NK) cells*. Cell Stress Chaperones, 2008. **13**(2): p. 221-30.
168. Gross, C., et al., *Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells*. Cell Stress Chaperones, 2003. **8**(4): p. 348-60.
169. Strome, S.E., et al., *B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6501-5.
170. Hamanishi, J., et al., *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3360-5.
171. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12293-7.

172. Rosenwald, A., et al., *Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 851-62.
173. Ribas, A. and J.D. Wolchok, *Cancer immunotherapy using checkpoint blockade*. Science, 2018. **359**(6382): p. 1350-1355.
174. Pesce, S., et al., *Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization*. J Allergy Clin Immunol, 2016.
175. Hanna, J., et al., *Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation*. J Clin Invest, 2004. **114**(11): p. 1612-23.
176. Marzio, R., J. Mael, and S. Betz-Corradin, *CD69 and regulation of the immune function*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1999. **21**(3): p. 565-82.
177. Halama, N., et al., *Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(4): p. 678-89.
178. Castriconi, R., et al., *Neuroblastoma-derived TGF-beta1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells*. J Immunol, 2013. **190**(10): p. 5321-8.
179. Champsaur, M. and L.L. Lanier, *Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses*. Immunol Rev, 2010. **235**(1): p. 267-85.
180. Gao, J., et al., *CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors*. Cancer Sci, 2017. **108**(10): p. 1934-1938.
181. Paschen, A., J. Baingo, and D. Schadendorf, *Expression of stress ligands of the immunoreceptor NKG2D in melanoma: regulation and clinical significance*. Eur J Cell Biol, 2014. **93**(1-2): p. 49-54.
182. Bowers, J.R., et al., *Poliovirus Receptor: More than a simple viral receptor*. Virus Res, 2017. **242**: p. 1-6.
183. Vetter, C.S., et al., *Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma*. Br J Cancer, 2004. **91**(8): p. 1495-9.
184. McGilvray, R.W., et al., *NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(22): p. 6993-7002.
185. Elias, S., et al., *Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia*. Blood, 2014. **123**(10): p. 1535-43.
186. Kearney, C.J., et al., *Loss of DNAM-1 ligand expression by acute myeloid leukemia cells renders them resistant to NK cell killing*. Oncoimmunology, 2016. **5**(8): p. e1196308.

187. Chitadze, G., et al., *Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications*. Scand J Immunol, 2013. **78**(2): p. 120-9.
188. Cheng, M., et al., *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(3): p. 230-52.
189. Klingemann, H., *Challenges of cancer therapy with natural killer cells*. Cytotherapy, 2015. **17**(3): p. 245-9.
190. Arai, S. and H.G. Klingemann, *Natural killer cells: can they be useful as adoptive immunotherapy for cancer?* Expert Opin Biol Ther, 2005. **5**(2): p. 163-72.
191. Suck, G. and M.B. Koh, *Emerging natural killer cell immunotherapies: large-scale ex vivo production of highly potent anticancer effectors*. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2010. **3**(3): p. 135-42.
192. Luevano, M., A. Madrigal, and A. Saudemont, *Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(4): p. 310-20.
193. Becker, P.S., et al., *Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(4): p. 477-84.
194. Koehl, U., et al., *Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 118.
195. Saito, S., et al., *Ex vivo generation of highly purified and activated natural killer cells from human peripheral blood*. Hum Gene Ther Methods, 2013. **24**(4): p. 241-52.
196. Mata, M.M., et al., *Effects of cryopreservation on effector cells for antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) cell activity in (51)Cr-release and CD107a assays*. J Immunol Methods, 2014. **406**: p. 1-9.
197. Voshol, H., et al., *Human natural killer cells: a convenient purification procedure and the influence of cryopreservation on cytotoxic activity*. J Immunol Methods, 1993. **165**(1): p. 21-30.
198. Fujiwara, S., et al., *Cryopreservation of human lymphocytes for assessment of lymphocyte subsets and natural killer cytotoxicity*. J Immunol Methods, 1986. **90**(2): p. 265-73.
199. Shenouda, M.M., et al., *Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours*. Breast Cancer Res, 2017. **19**(1): p. 76.
200. Klingemann, H.G. and J. Martinson, *Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications*. Cytotherapy, 2004. **6**(1): p. 15-22.
201. Sim, G.C., et al., *IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients*. J Clin Invest, 2014. **124**(1): p. 99-110.

202. Konjevic, G., et al., *In-vitro IL-2 or IFN-alpha-induced NKG2D and CD161 NK cell receptor expression indicates novel aspects of NK cell activation in metastatic melanoma patients*. *Melanoma Res*, 2010. **20**(6): p. 459-67.
203. Decot, V., et al., *Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression*. *Exp Hematol*, 2010. **38**(5): p. 351-62.
204. Kloess, S., et al., *IL-2-activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(11): p. 3255-67.
205. Smyth, M.J., et al., *NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer*. *J Exp Med*, 2004. **200**(10): p. 1325-35.
206. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 197-223.
207. Jaattela, M., *Effects of heat shock on cytolysis mediated by NK cells, LAK cells, activated monocytes and TNFs alpha and beta*. *Scand J Immunol*, 1990. **31**(2): p. 175-82.
208. Jolesch, A., et al., *Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system*. *Eur J Cell Biol*, 2012. **91**(1): p. 48-52.
209. Vega, V.L., et al., *Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages*. *J Immunol*, 2008. **180**(6): p. 4299-307.
210. De Maio, A., *Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa*. *Cell Stress Chaperones*, 2011. **16**(3): p. 235-49.
211. Issels, R.D., et al., *Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(6): p. 561-70.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Algorithmus für die Diagnostik von Weichteiltumoren.....	2
Abbildung 1-2	NK-Subpopulationen im peripheren Blut anhand der Expressionsdichte von CD56 und CD16 auf CD3 ^{neg} -Zellen.....	5
Abbildung 1-3	Dynamische Regulation der NK-Zell-Aktivierung.....	6
Abbildung 1-4	Die Ausschüttung von Effektormolekülen.....	8
Abbildung 3-1	Gatingstrategie zur Immunphänotypisierung der CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -Subpopulation von NK-Zellen.....	25
Abbildung 4-1	NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zur Zytotoxizität bei gesunden Spendern bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).....	32
Abbildung 4-2	Vergleich des Anteils an CD3 ^{neg} -Zellen an Lymphozyten (A) und CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -Zellen an CD3 ^{neg} -Zellen (B) bei STS-Patienten und gesunden Spendern.	33
Abbildung 4-3	Gehalt an den Effektormolekülen Perforin (A), Granzym A (B) und Granzym B (C) in CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	34
Abbildung 4-4	Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 (A) und HLA-DR (B) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	35
Abbildung 4-5	Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 (A), NKp44 (B), NKp46 (C) und des Signal-Adapterproteins CD3 ζ (D) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	36
Abbildung 4-6	Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM- 1 (A), 2B4 (B), NKG2D (C), CD2 (D) und CD8 (E) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	38
Abbildung 4-7	Expressionsdichte der inhibierenden Rezeptoren CD94 (A), NKG2A (B) und PD-1 (C) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.	40
Abbildung 4-8	Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57 (A), Tim-3 (B), CD117 (C) und CD27 (D) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.	41
Abbildung 4-9	Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX ₃ CR1 (A) und CXCR6 (B) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	42
Abbildung 4-10	Zytotoxizität von NK-Zellen gesunder Spender gegenüber unterschiedlicher Sarkom-Zelllinien im Vergleich zu K562 bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).	43
Abbildung 4-11	Effekte der ex vivo-Expansion in IL-2-haltigem Medium in Bezug auf Lymphozyten, CD3 ^{neg} -Zellen und CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen. Vor Expansion (A), Erfolgreiche Expansion (B), Nicht erfolgreiche Expansion (C).....	45
Abbildung 4-12	Vergleich des Anteils an CD3 ^{neg} -Zellen an Lymphozyten (A) und CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -Zellen an CD3 ^{neg} -Zellen (B) vor und nach IL-2-haltiger Langzeitkultivierung bei STS-Patienten und gesunden Spendern.	46
Abbildung 4-13	NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2 bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).....	47

Abbildung 4-14 NK-Zell-Zytotoxizität von STS-Patienten in Abhängigkeit von der expandierten Subpopulation.	48
Abbildung 4-15 Gehalt an den Effektormolekülen Perforin (A), Granzym B (B) und Granzym A (C) in CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	49
Abbildung 4-16 Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 (A) und HLA-DR (B) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	50
Abbildung 4-17 Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 (A), NKp44 (B), NKp46 (C) und des Signal-Adapterproteins CD3 ζ (D) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2. .	52
Abbildung 4-18 Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM- 1 (A), 2B4 (B), NKG2D (C), CD2 (D) und CD8 (E) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	54
Abbildung 4-19 Expressionsdichte der inhibierenden Rezeptoren CD94 (A), NKG2A (B) und PD-1 (C) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	56
Abbildung 4-20 Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57 (A), Tim-3 (B), c-kit (C) und CD27 (D) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.....	58
Abbildung 4-21 Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX ₃ CR1 (A) und CXCR6 (B) auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	60
Abbildung 4-22 NK-Zell-Aktivität gesunder Spender gegenüber K562 (n=1) und Sarkom-Zelllinien (n=3) vor und nach regionaler Hyperthermie mit 41,8°C und 43°C sowie 4- bzw. 24-stündiger Regenerationszeit bei einer E:T-Ratio von 10:1.	61
Abbildung 4-23 Induktion des intrazellulären Gehalts von Hsp70 in unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien durch die Hyperthermiebehandlung bei 41,8°C und 43°C nach 4, 16, 24, und 48 Stunden Regenerationszeit.....	62
Abbildung 4-24 Induktion des intrazellulären Gehalts von Hsp70 in unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien durch die Hyperthermiebehandlung bei 41,8°C und 43°C nach 4, 16, 24, und 48 Stunden Regenerationszeit nach semiquantitativer densitometrischer Auswertung der Westernblotergebnisse.....	63
Abbildung 4-25 Expression von Hsp70 auf der Zellmembran von den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-1 und von der Positivkontrolle K562 vor und nach Hyperthermie mit 41,8°C und 43°C und nach Ablauf von 4 Stunden Regenerationszeit... ..	64
Abbildung 4-26 Expression von den NKG2D-Liganden MICA (A), MICB (B), ULBP-1 (C), ULBP-3 (D) und ULBP-2/5/6 (E) auf den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-1... ..	65
Abbildung 4-27 Expression von den DNAM-1-Liganden CD155 (F) und CD112 (G) sowie dem 2B4-Liganden CD48 (H) auf den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-1.....	66

Abbildung 4-28 Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A/B/C (A) und HLA-E (B), auf den Sarkom-Zelllinien RD-ES, SW872, SW982 und SK-UT-, die mit den inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren interagieren. ... 67

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1	Patientencharakteristika	31
Tabelle 4-2	NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zur Zytotoxizität bei gesunden Spendern bei einer E:T-Ratio von 10:1 (in % spezifische Lyse).....	32
Tabelle 4-3	Vergleich des Anteils an CD3 ^{neg} -Zellen an Lymphozyten und CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -Zellen an CD3 ^{neg} -Zellen bei STS-Patienten und gesunden Spendern.	33
Tabelle 4-4	Gehalt an den Effektormolekülen Perforin, Granzym A und Granzym B in CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	34
Tabelle 4-5	Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 und HLA-DR auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.	35
Tabelle 4-6	Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und des Signal-Adapterproteins CD3 ζ auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.	37
Tabelle 4-7	Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM- 1, 2B4, NKG2D, CD2 und CD8 auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.	39
Tabelle 4-8	Expressionsdichte inhibierender Rezeptoren CD94, NKG2A und PD-1 auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	40
Tabelle 4-9	Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57, Tim-3, CD117 und CD27 auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	42
Tabelle 4-10	Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX ₃ CR1 und CXCR6 auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	43
Tabelle 4-11	Vergleich des Anteils an CD3 ^{neg} -Zellen an Lymphozyten und CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -Zellen an CD3 ^{neg} -Zellen vor und nach IL-2-haltiger Langzeitkultivierung bei STS-Patienten und gesunden Spendern.	46
Tabelle 4-12	NK-Zell-Zytotoxizität bei STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2 (in % spezifische Lyse).....	47
Tabelle 4-13	Gehalt an den Effektormolekülen Perforin, Granzym B und Granzym A in CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.....	50
Tabelle 4-14	Expressionsdichte der Aktivitätsmarker CD69 und HLA-DR auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	51
Tabelle 4-15	Expressionsdichte der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und des Signal-Adapterproteins CD3 ζ auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	53
Tabelle 4-16	Expressionsdichte der ITAM-unabhängigen aktivierenden Rezeptoren DNAM- 1, 2B4, NKG2D, CD2 und CD8 auf CD56 ^{dim} CD16 ^{bright} -NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2.	55

Tabelle 4-17 Expressionsdichte der inhibierenden Rezeptoren CD94, NKG2A und PD-1 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2. 57

Tabelle 4-18 Expressionsdichte der Maturierungsmarker CD57, Tim-3, c-kit und CD27 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2. 59

Tabelle 4-19 Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CX₃CR1 und CXCR6 auf CD56^{dim}CD16^{bright}-NK-Zellen von STS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern vor und nach Aktivierung durch IL-2. 60

7.3 Patienten- und Probandeninformation, Einwilligungserklärung

Klinikum der Universität München · Medizinische Klinik und Poliklinik III ·
Marchioninstr. 15, · 81377 München

Ansprechpartner:

Prof. Dr. R. Issels
PD Dr. med. M. Subklewe
Herr V. Bücklein

Telefon +49 (0)89 7095 - 0

rolf.issels@med.uni-
muenchen.de
marion.subklewe@med.uni-
muenchen.de
veit.buecklein@med.uni-muenchen.de

München, 13. September 2012

Patienten- und Probandeninformation

In-vitro-Studie zur Etablierung neuer Immuntherapien bei Patienten mit Weichteilsarkomen

**Bevor Sie Ihre Zustimmung zur Teilnahme an dieser Untersuchung geben, ist es wichtig, dass Sie diese Patienteninformation aufmerksam lesen und verstehen.
Wenn Sie etwas nicht verstehen, fragen Sie bitte Ihren behandelnden Arzt.**

Sehr geehrte(r) Patient/in, sehr geehrte(r) Blutspender,

wir laden Sie ein, an der oben genannten Untersuchung teilzunehmen. Bevor Sie sich dafür oder dagegen entscheiden, ist es wichtig für Sie zu verstehen, warum diese Untersuchung durchgeführt wird und was sie beinhaltet. Sie werden über den Nutzen und die möglichen Risiken einer Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung von Ihrem behandelnden Arzt umfassend aufgeklärt. Bitte nehmen Sie sich darüber hinaus die Zeit, die folgenden Informationen sorgfältig durchzulesen, und besprechen Sie sie eventuell mit einer vertrauten Person und Ihrem behandelnden Arzt. Sie können uns jederzeit fragen, wenn Sie etwas nicht verstehen oder gerne weitere Informationen hätten. Entscheiden Sie ganz in Ruhe, ob Sie an der Studie teilnehmen wollen oder nicht.

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen durch Sie beendet werden, ohne dass Ihnen hierdurch Nachteile entstehen.

Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung dieser Untersuchung ist, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich erklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zum ärztlichen Informationsgespräch sorgfältig durch und zögern Sie nicht, Fragen zu stellen.

Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur

- wenn Sie Art und Ablauf der Untersuchung vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Teilnehmer an dieser Untersuchung im Klaren sind.

Diese Untersuchung, die Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft und es bestanden dagegen keine Einwände.

1. Hintergrund zur untersuchten Erkrankung und zur Behandlung

Weichteilsarkome sind seltene bösartige Tumorerkrankungen, die vom Bindegewebe ausgehen und überall im Körper auftreten können. Standardtherapie dieser Tumore ist die vollständige operative Entfernung. Diese ist jedoch nicht bei allen Patienten anwendbar, da der Tumor möglicherweise in lebenswichtige Organe einwächst oder bereits Absiedelungen in anderen Organen (Metastasen) gebildet hat.

Bei diesen Patienten kommt eine Chemotherapie, möglicherweise in Kombination mit regionaler Hyperthermie, also eine Erwärmung des Tumors oder des ehemaligen Tumorgebiets, zum Einsatz. Es gelingt jedoch auch unter Anwendung dieser Therapieverfahren nur in einem Teil der Patienten, eine dauerhafte Heilung der Erkrankung zu erreichen. Das Risiko ist hoch, dass die Erkrankung trotz entsprechender Therapie weiter fortschreitet oder wiederkehrt (rezidiviert). Deshalb wird nach Wegen gesucht, die krankheitsfreie Zeit bei diesen Patienten zu verlängern oder die Rate an Rezidiven zu senken. Ein möglicherweise erfolgversprechender Ansatz ist die Unterstützung des patienteneigenen Immunsystems, da die Immunabwehr eine wichtige Rolle in der Verhinderung und Bekämpfung von Tumorerkrankungen spielt.

2. Ziel der Untersuchung

Im Rahmen dieser Untersuchung werden Ihre weißen Blutkörperchen hinsichtlich Zahl und Funktion untersucht und diese Werte mit den Ergebnissen von Untersuchungen an gesunden Spendern verglichen. Hierzu werden weiße Blutkörperchen, die über eine normale Blutentnahme gewonnen werden, bezüglich des Vorhandenseins bestimmter Eiweiße auf ihrer Zelloberfläche untersucht (sog. Durchflusszytometrie). Mit Hilfe dieser Analyse ist es möglich, die Zellen verschiedenen Untergruppen zuzuordnen und Informationen über ihre Funktion zu erhalten. Durch den Vergleich mit gesunden Spendern kann erkannt werden, ob Zellen bestimmter Untergruppen in erhöhter oder verminderter Zahl im Blut vorliegen. Dies lässt Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit Ihres Immunsystems zu. Insgesamt sollen diese Untersuchungen an 30 Patienten und zu Vergleichszwecken auch an 10 gesunden Probanden durchgeführt werden.

In einem zweiten Schritt sollen bei 2 - 6 der untersuchten Patienten Analysen der Funktionsfähigkeit von Zellen einer bestimmten Lymphozyten-Untergruppe, den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), erfolgen sowie eine Vermehrung dieser NK-Zellen im Brutschrank versucht werden. Dabei sollen NK-Zellen aus Ihrem Blut durch Lagerung in einer nährstoffreichen Flüssigkeit und Hinzufügung von Signalstoffen, die eine Teilung der Zellen auslösen, in ihrer Zahl deutlich gesteigert werden. Ziel ist die Erreichung einer Zellzahl, wie sie für die Verwendung für therapeutische Zwecke notwendig ist. Wird diese Zellzahl erreicht, sollen wiederum durchflusszytometrische Analysen erfolgen, um erneut Informationen über ihre Funktion erhalten. Genetische Untersuchungen werden jedoch **nicht** durchgeführt.

3. Möglicher Nutzen der Teilnahme für den Probanden

Die Untersuchung dient vorerst einem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, der zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen beitragen soll. Damit hat die vorliegende Untersuchung für Sie keinen möglichen Nutzen, Sie tragen jedoch möglicherweise zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten von zukünftigen Patienten mit Weichteilsarkom.

4. Ablauf der Untersuchung

Im Rahmen einer Routine-Blutentnahme werden Ihnen ca. 10 – 20 ml Blut für die oben beschriebenen Forschungszwecke entnommen.

Sollten Sie aufgrund der Ergebnisse der ersten Analyse für die oben erwähnten weiterführenden Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit der NK-Zellen und zur Vermehrung dieser Zellen in Frage kommen, wird, Ihr Einverständnis vorausgesetzt, bei Ihnen einmalig eine Entnahme von 80-100ml Blut durchgeführt.

5. Abbruch der Untersuchung

Wenn Sie sich dazu bereit erklären, an der Untersuchung teilzunehmen, haben Sie das Recht, jederzeit ohne Angabe von Gründen die Zusage zur Teilnahme an der Untersuchung zurückzuziehen und die Untersuchung abubrechen.

Der verantwortliche Leiter der Studie hat das Recht, Ihre Teilnahme an der Untersuchung zu beenden, wenn schwerwiegende Begleiterkrankungen, unannehmbare unerwünschte Ereignisse, Verletzungen des Untersuchungsprotokolls oder andere Gründe vorliegen, denen zufolge der Abbruch im besten medizinischen Interesse liegt.

6. Risiken und Nebenwirkungen der Untersuchung

Zusätzliche Risiken oder Nebenwirkungen sind bei Entnahme von 5 – 10ml Blut im Rahmen einer Routine-Blutentnahme nicht zu erwarten. Bei Entnahme einer größeren Blutmenge (80 – 100 ml) sollten Sie darauf achten, genügend Flüssigkeit zu sich zu nehmen, um möglicherweise auftretenden Schwindel und ein Schwächegefühl im Anschluss an die Blutentnahme zu vermeiden. Außerdem sollten Sie in den ersten Stunden nach Durchführung dieser Blutentnahme vorsichtig bei Lageänderungen, z.B. beim Aufstehen aus liegender Position, sein.

7. Schweigepflicht/Vertraulichkeit der Daten/Datenschutz

Bei dieser Untersuchung werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und weitergegeben werden diese Daten jedoch nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form, d.h. weder Ihr Name noch ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Es kann Einsicht in die Originaldaten durch autorisierte Personen genommen werden, vor allem zur Überwachung der Untersuchungssicherheit. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die gespeicherten Daten irreversibel anonymisiert und weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Herr Prof. Dr. R. Issels und Frau PD Dr. M. Subklewe, ihre Stellvertreter Herr Prof. Dr. W. Hiddemann, Frau Dr. D. Sauter und Herr V. Bücklein.

Die Unterlagen werden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III aufbewahrt. Die außerhalb der Krankenakte aufgezeichneten Daten werden 10 Jahre, die in die Krankenakte aufgenommenen Daten 30 Jahre aufbewahrt und danach gelöscht bzw. vernichtet.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit ihrer persönlichen Daten in jedem Fall gewährleistet; wenn überhaupt, werden die Daten in verschlüsselter Form verwendet.

Wenn Sie diese Patienten- und Probandeninformation in Ruhe gelesen und mit der Teilnahme an der Untersuchung einverstanden sind, dann bestätigen Sie dies bitte mit Ihrer Unterschrift auf der Einwilligungserklärung. Dieses Einverständnis kann von Ihnen selbstverständlich jederzeit und ohne Angaben von Gründen widerrufen werden.

Wir danken Ihnen für Ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Untersuchung!

Einwilligungserklärung

In-vitro-Studien zur Etablierung neuer Immuntherapien bei Patienten mit Weichteilsarkomen

Name -----

Vorname -----

Geburtsdatum -----

Patienten/Probandennummer -----

Ich habe die von Frau/Herrn Dr. med. ----- unternommene Aufklärung über Art und Durchführung sowie die Risiken der betreffenden wissenschaftlichen Untersuchung verstanden und hatte ausreichend Gelegenheit, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit dem aufklärenden Arzt zu klären. Ferner hatte ich die Gelegenheit, die „Patienten- und Probandeninformation“ durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen. Die von mir gestellten Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet. Ich konnte mir genügend Zeit nehmen, bevor ich meine Entscheidung zur Teilnahme getroffen habe.

Eine Kopie dieser Patienten- und Probandeninformation sowie der vorliegenden Einwilligungserklärung habe ich vom aufklärenden Arzt erhalten.

Ich bin bereit an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie teilzunehmen.

Die Teilnahme ist freiwillig. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten jederzeit widersprechen kann.

Ich bin damit einverstanden, dass der Studienleiter oder -arzt sich mit meinem/r behandelndem/n Arzt/Ärztin im Rahmen dieser Studie in Verbindung setzt.

Ich bin darüber aufgeklärt, dass die vorliegende Untersuchung nach nationalen sowie internationalen Qualitätsstandards durchgeführt wird. Dementsprechend gelten die nachfolgenden

Datenschutzbestimmungen:

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, und gespeichert, aber nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form weitergegeben, d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Es kann Einsicht in die Originaldaten durch autorisierte Personen genommen werden, vor allem zur Überwachung der Studiensicherheit. Im Falle eines Widerrufs der

Einwilligung werden die gespeicherten Daten irreversibel anonymisiert und weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Herr Prof. Dr. R. Issels und Frau PD Dr. M. Subklewe, ihre Stellvertreter Herr Prof. Dr. W. Hiddemann, Frau Dr. D. Sauter und Herr V. Bücklein.

Die Unterlagen werden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III aufbewahrt. Die außerhalb der Krankenakte aufgezeichneten Daten werden 10 Jahre, die in die Krankenakte aufgenommenen Daten 30 Jahre aufbewahrt und danach gelöscht bzw. vernichtet.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit meiner persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet; wenn überhaupt, werden die Daten in verschlüsselter Form verwendet.

Die Beachtung des Bundesdatenschutzgesetzes ist in vollem Umfange sichergestellt.

Den Inhalt der vorliegenden Einwilligungserklärung habe ich verstanden; mit der vorstehend geschilderten Vorgehensweise bin ich einverstanden.

Einwilligungserklärung zur Datenverarbeitung

Ich willige darin ein, dass die wissenschaftliche Einrichtung Klinikum der Universität München, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Campus Großhadern, mich betreffende personenbezogene Daten und Gesundheits- bzw. Krankheitsdaten im Rahmen und zum Zweck des o.g. Forschungsvorhabens verarbeitet.

Ich willige darin ein, dass meine im Rahmen der o.g. Studie erhobenen Krankheitsdaten aufgezeichnet, verschlüsselt (pseudonymisiert), verschlüsselt (pseudonym) gespeichert und die pseudonymisierten Ergebnisse veröffentlicht werden.

Darüber hinaus bin ich mit der Entnahme, Herauslösung, Untersuchung sowie verschlüsselten (pseudonymisierten) Lagerung meines im Rahmen dieser klinischen Studie entnommenen Blutes für den Zweck der Studie durch den/die Studienarzt/-Studienärztin bzw. das Labor für Leukämiediagnostik einverstanden.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorgenannte Untersuchung einschließlich der dafür notwendigen ärztlichen Untersuchungen an mir durchgeführt wird, und ich stimme der Aufzeichnung meiner Daten/Krankheitsdaten sowie der Einsichtnahme in meine Akte in der oben beschriebenen Form zu.

München, den _____

Unterschrift Proband / Patient

Hiermit erkläre ich, den/die o.g. Versuchsteilnehmer/in am _____ über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken dieser klinischen Prüfung mündlich und schriftlich aufgeklärt und ihm/ihr eine Ausfertigung der Information sowie dieser Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

München, den _____

Unterschrift Prüfarzt

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich es nicht verpassen, allen Menschen meinen herzlichen Dank auszusprechen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Marion Subklewe, die mir die Möglichkeit gab, dieses Thema unter Ihrer Schirmherrschaft zu bearbeiten und die mir durch Ihre kritischen Fragen stets neuen Ansporn gab.

Besonders danken möchte ich auch meinem Betreuer, Herrn Dr. Veit Bücklein, für die Betreuung und Unterstützung, die produktiven Gespräche und Diskussionen, die Geduld und die stets konstruktive Kritik.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Kristina Krupka und Dr. Dominique Harnicek bedanken, die mich im Rahmen meiner Laborphase mit viel Geduld, vielen Ratschlägen, Tipps und Tricks begleitet haben.

Für die zur Verfügungstellung des Hsp70-Antikörpers möchte ich Frau Prof. Elfriede Nößner meinen Dank ausdrücken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danke sagen - allen voran aber meinen Eltern, die bis heute nicht müde geworden sind, mich in jeglicher Hinsicht zu unterstützen und mir stets mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Ihre andauernden Aufmunterungen und guten Zusprüche trotz meiner zahlreichen Klagen waren mir eine große Stütze. Aber auch bei meinem Verlobten möchte ich mich für die Geduld, die Aufmerksamkeit und die zwischendurch dringend notwendigen kleinen Ablenkungen während der Arbeit an dieser Dissertation besonders bedanken.

Vielen Dank!

7.5 Publikationen

- 06/2016 **American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting** – Chicago, Illinois
Bücklein V., Jorg T., Pass D., Krupka C., Schlegel P., Lang P., Hoffmeister sen. H., Lindner L., Hiddemann W., Subklewe M.
„Immunotherapeutic approaches for soft-tissue sarcoma: augmentation of Natural Killer cell cytotoxicity by ex-vivo expansion and use of an Anti-GD2 antibody“.
- 10/2015 **Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V. (DGHO) Jahrestagung** – Basel, Schweiz
Bücklein V., Jorg T., Pass D., Krupka C., Schlegel P., Lang P., Hoffmeister sen. H., Lindner L., Hiddemann W., Subklewe M.
„Preclinical evaluation of expanded natural killer cells and an anti-GD2 antibody for immunotherapy of soft-tissue sarcoma“.
- 07/2013 **15. Wissenschaftliches Symposium der LMU** – Herrsching
Pass D., Bücklein V., Krupka C., Issels R., Hiddemann W., Hoffmeister sen. H., Subklewe M. *„Successful expansion and activation of natural killer cells of soft-tissue sarcoma patients for immunotherapeutic usage“.*

7.6 Eidesstattliche Versicherung

Désirée Waitszies geb. Pass

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Die Charakterisierung Natürlicher Killerzellen bei Patienten mit Weichteilsarkomen und ihre Beeinflussbarkeit durch *ex vivo*-Stimulation und Hyperthermie“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 26.04.2021

Ort, Datum Unterschrift

Désirée Waitszies

Doktorandin bzw. Doktorand