

AUS DEM INSTITUT FÜR MOLEKULARE IMMUNOLOGIE

Leiterin: Prof. Dolores J. Schendel

GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Aspekte der antitumoralen Effektorfunktion  
zytotoxischer T-Zellen und Betrachtungen ihres Zusammenspiels  
mit Makrophagen und dendritischen Zellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

David Anz

aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatterin: PD Dr. rer. nat. Elfriede Nößner
2. Berichterstatter: Prof. Thomas Brocker
- Mitberichterstatter: PD Dr. Peter Nelson  
Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

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

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2007

Meinen Eltern



---

## Inhalt

1. EINLEITUNG .....	1
1.1. Das Nierenzellkarzinom .....	1
1.2. Zelltypen des Immunsystems .....	4
1.2.1. Makrophagen und dendritische Zellen .....	4
1.2.2. T-Zellen .....	5
1.2.3. Natürliche Killer-Zellen .....	5
1.3. Chemokine und Chemokinrezeptoren .....	6
1.4. Der Ablauf der Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen .....	6
1.4.1. Antigenaufnahme und Präsentation: Ein fremdes Antigen wird von dendritischen Zellen aufgenommen und präsentiert .....	6
1.4.2. Migration und Reifung: Die dendritische Zelle wandert in den Lymphknoten und unterliegt einem Reifungsprozess .....	7
1.4.3. T-Zellinitialisierung: Die dendritische Zelle aktiviert im Lymphknoten eine antigenspezifische T-Zelle .....	10
1.4.4. Effektorphase: Die Fremdantigen tragende Zelle wird von der aktivierten T- Zelle erkannt und abgetötet .....	12
1.5 Die CD3 $\zeta$ -Kette .....	12
1.6. Erklärungskonzepte für fehlende Tumordestruktion durch zytotoxische T-Zellen .	13
1.7. Aufgabenstellung .....	15
2. MATERIAL .....	16
2.1. Geräte, Chemikalien und Reagenzien .....	16
2.1.1. Geräte .....	16
2.1.2. Chemikalien .....	16
2.1.3. Materialien und Lösungen für die Zellkultur .....	17
2.1.4. Materialien und Lösungen für die Immunzytologie und Immunhistologie .....	17
2.1.5. Lösungen für die Durchflusszytometrie .....	18
2.2. Zellen, Peptide, Antikörper und Gewebe .....	18
2.2.1 Zellen .....	18
2.2.2. Peptide .....	19
2.2.3. Antikörper .....	19
2.2.4. Nierenzellkarzinome .....	20
3. METHODEN .....	21
3.1. Zellkultur .....	21
3.1.1. Bestimmung der Zellzahl .....	21
3.1.2. Isolierung peripherer Blutlymphozyten und Monozyten .....	21
3.1.3. Auftauen von Zellen .....	21

---

3.1.4. Einfrieren von Zellen .....	22
3.1.5. Bestrahlung von Zellen .....	22
3.1.6. Kultivierung adhärent wachsender Tumorzellen .....	22
3.1.7. Kultivierung von EBV-transformierten B-Zelllinien .....	23
3.1.8. Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen .....	23
3.1.9. CFDA SE Markierung von Tumorzellen .....	23
3.1.10. Stimulation des T-Zellklons TyrF8 mit Zielzellen – Ansatz zur durchflusszytometrischen Analyse .....	24
3.2. Immunhistologische und immunzytologische Färbung .....	24
3.2.1. Präparation von Gewebe für die immunhistologische Färbung .....	24
3.2.2. Präparation von Zellen für die immunzytologische Färbung .....	24
3.2.3. Präparation von Zellkonjugaten aus zytotoxischen T-Zellklonen und Zielzellen für die immunzytologische Färbung .....	25
3.2.4. Immunhistochemische und immunzytochemische Färbung mit der APAAP- Methode .....	25
3.2.5. Immunhistochemische Doppelfärbung .....	27
3.2.6. Immunfluoreszenz .....	28
3.2.7. Lichtmikroskopie .....	29
3.2.8. Konfokale Lasermikroskopie .....	30
3.2.9. Digitale Bildbearbeitung .....	31
3.2.10. Erstellung von Fluoreszenzintensitätsprofilen .....	32
3.3. Durchflusszytometrie .....	33
3.3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie .....	33
3.3.2. Färbung von Antigenen auf der Oberfläche der Zelle .....	34
3.3.3. Färbung von Antigenen im Zellinneren .....	34
3.3.4. Darstellung und Auswertung in der Durchflusszytometrie .....	35
4. ERGEBNISSE .....	37
4.1. Beschreibung der Morphologie Tumor infiltrierender Leukozyten nach immunhistochemischer Färbung .....	37
4.2. Charakterisierung des monozytären Infiltrats im Nierenzellkarzinom .....	39
4.2.1. Phänotypische Charakterisierung von infiltrierenden Makrophagen <i>in situ</i> ...	39
4.2.2. Charakterisierung von dendritischen Zellen und deren räumlicher Beziehung zu T-Zellen im Gewebe .....	41
4.2.2.1. Nachweis von dendritischen Zellen durch den Antikörper DC-Sign .....	42
4.2.2.2. Nachweis von dendritischen Zellen durch den Antikörper DC-Lamp .....	43
4.3. Effektorfunktion und Aktivierungsstatus von Tumor infiltrierenden Lymphozyten ..	46
4.3.1. Die zytotoxische Effektorfunktion Tumor infiltrierender Lymphozyten .....	47
4.3.1.1. Quantitative Analyse der Perforinexpression in Tumor infiltrierenden T- Zellen <i>in situ</i> .....	47

---

4.3.1.2. Intrazelluläre Verteilung von Perforin in T-Zellklonen und Tumor infiltrierenden T-Zellen .....	49
4.3.1.3. Intrazelluläre Verteilung von Perforin in Tumor infiltrierenden NK-Zellen .....	52
4.3.1.4. Nachweis von Zielzellerkennung durch zytotoxische T-Zellen im Nierenzellkarzinom .....	54
4.3.2. Aktivierungsstatus von Tumor infiltrierenden T-Zellen .....	58
4.3.2.1. IFN- $\gamma$ Sekretion von Tumor infiltrierenden T-Zellen .....	58
4.3.2.2. Expression der CD3 $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten .....	60
4.3.2.2.1. Quantifizierung der Expression von CD3 $\zeta$ .....	60
4.3.2.2.2. Die CD3 $\zeta$ -Expression im Tumorstroma .....	66
4.3.2.2.3. Die CD3 $\zeta$ -Expression in Lymphozytenansammlungen .....	68
4.3.2.3. Die Expression von CD69 in Tumor infiltrierenden Lymphozyten .....	69
4.3.2.4. Proliferation von Tumor infiltrierenden T-Zellen .....	71
4.4. CCL5 als Effektormolekül zytotoxischer T-Zellen .....	73
4.4.1. CCL5 wird bei Kontakt mit Zielzellen zusammen mit Perforin ausgeschüttet .....	73
4.4.2. Von T-Zellen sezerniertes CCL5 bindet an die Tumorzelloberfläche .....	77
4.4.3. Die Ausschüttung von CCL5 erfolgt gerichtet zur Tumorzelle hin .....	84
5. DISKUSSION .....	87
5.1. Unreife und reife dendritische Zellen zeigen im Nierenzellkarzinom ein unterschiedliches Verteilungsmuster .....	87
5.2. Fehlende Sekretion von IFN- $\gamma$ und unzureichende Bestände an Perforin in zytotoxischen T-Zellen als mögliche Ursache für mangelnde Kontrolle des Tumorwachstums .....	89
5.3. Die Expression der CD3 $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden T-Zellen des Nierenzellkarzinoms zeigt ein heterogenes Muster .....	93
5.4. Zytotoxische T-Zellen deponieren CCL5 selektiv auf Zielzellen und fördern dadurch deren Beseitigung durch Makrophagen .....	95
6. ZUSAMMENFASSUNG .....	98
7. LITERATURVERZEICHNIS .....	100
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	113
DANKSAGUNG .....	114
VERÖFFENTLICHUNGEN .....	115
LEBENS LAUF .....	116



## 1. Einleitung

Zahlreiche Krankheiten des Menschen können in unterschiedlicher Weise mit seinem Immunsystem in Zusammenhang gebracht werden. Das Immunsystem erfüllt die Funktion, Körperfremdes im eigenen Organismus zu eliminieren. Oft haben die "Fremdlinge" aber Strategien entwickelt, die ihre Erkennung und Eliminierung erschweren oder unmöglich machen und es kommt zur Krankheit. Hierbei handelt es sich um Bakterien, Viren und andere Erreger. In den letzten Jahrzehnten konnten auch auf Krebszellen Strukturen nachgewiesen werden, die nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß auf Zellen der gesunden menschlichen Gewebe vorkommen. Das Immunsystem ist unter geeigneten Bedingungen in der Lage, fremde Strukturen auf Zellen zu erkennen und diese daraufhin abzutöten. So konnte auch bei einigen malignen Tumoren eine Erkennung von Tumorzellen nachgewiesen werden, welche allerdings offensichtlich nicht ausreicht, um den Tumor effektiv zu bekämpfen. Diese Zusammenhänge erklären, warum die Krebsforschung in der Immunbiologie von zentraler Bedeutung ist.

Substanzen, die gezielt bestimmte Komponenten des Immunsystems stimulieren, werden bereits als Medikamente in der Krebstherapie bestimmter Tumore eingesetzt und führen in einigen Fällen zu einem Rückgang des Tumors. Besondere Erfolge wurden hierbei insbesondere bei der Therapie des malignen Melanoms und des Nierenzellkarzinoms erzielt [Lokich, 1997; Vogelzang, 1998]. Diese Tumore werden deshalb häufig als "immunogen" bezeichnet und sind für die immunologische Forschung von besonderem Interesse. Zudem können im Nierenzellkarzinom erhebliche Mengen von Zellen des Immunsystems unmittelbar im Tumorgewebe gefunden werden. Es handelt sich hierbei insbesondere um Makrophagen und T-Zellen. Zytotoxische T-Zellen sind die Zellen des Immunsystems, welche andere Zellen mit fremden Oberflächenstrukturen zerstören können und sie sind deshalb für die tumorimmunologische Forschung besonders interessant.

Mit der vorliegenden Arbeit soll dazu beigetragen werden, Erkenntnisse über das Ausmaß der Funktionalität und Aktivität von im Tumor befindlichen zytotoxischen T-Zellen auszuweiten und zu vertiefen. Es sollen hierbei insbesondere auch Einflüsse von im Tumor befindlichen Makrophagen und dendritischen Zellen auf die zytotoxischen T-Zellen untersucht werden. Weiterhin sollen detailliertere Kenntnisse über die Abläufe bei der Vernichtung von Tumorzellen durch T-Zellen gewonnen werden.

### 1.1. Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom ist ein maligner, langsam wachsender epithelialer Tumor, der sich vom Tubulusepithel der Niere ableitet. Erst Nierentumore mit einem Durchmesser

von über 1 cm werden als Nierenzellkarzinome bezeichnet, vorher handelt es sich definitionsgemäß um ein Nierenadenom, welches in diesem Stadium noch keine Zellatypien aufweist [Böcker, 2001]. Es gibt unterschiedliche Grundtypen, die sich in der histologischen Struktur des Gewebes und in der Herkunft unterscheiden. Am häufigsten ist das klarzellige Nierenzellkarzinom, welches sich vom Epithel des proximalen Tubulus ableitet und histomorphologisch durch helle Tumorzellen charakterisiert ist. Es gibt weiterhin das chromophile und das chromophobe Nierenzellkarzinom, sowie das Ductus Bellini Karzinom, auf deren Besonderheiten hier nicht weiter eingegangen werden soll.

Die Prognose hängt nachhaltig vom Stadium ab, in dem sich der Tumor zur Zeit der Diagnose befindet. Dieses leitet sich aus der pathologischen TNM (pTNM) Klassifikation der UICC (*Union Internationale contre le Cancer*) ab, die Angaben über Tumorgöße, Lymphknotenbefall und Metastasierung macht (Tabelle 1.1). Weiterhin gibt es eine, insbesondere im amerikanischen Raum verwendete, Stadieneinteilung nach Robson, die unabhängig von der pTNM Klassifikation definiert ist (Tabelle 1.2).

T0:	Kein Anhalt für Primärtumor
T1:	Tumor 7 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere (neu seit 1997) <i>(Tumor 2,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere [bis 1997])</i>
T1a:	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1b:	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung (neu seit 2002)
T2:	Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere (neu seit 1997) <i>(Tumor mehr als 2,5 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere [bis 1997])</i>
T3:	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Fettgewebe, jedoch nicht über die Gerotafaszie hinaus
T3a:	Tumor infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerotafaszie hinaus (schließt peripelvines Fettgewebe mit ein)
T3b:	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) (schließt segmentale Äste [mit muskulärer Wand] ein) oder V. cava [einschließlich Wandbefall] unterhalb des Zwerchfells
T3c:	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die V. cava (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
T4:	Tumor infiltriert über die Gerotafaszie hinaus
TX:	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
N0:	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1:	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten ( <i>Metastase in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung [bis 1997]</i> )
N2:	Metastase(n) in mehr als einem regionären Lymphknoten <i>(Metastase(n) in solitärem Lymphknoten, mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen Lymphknoten, keine mehr als 5 cm in größter Ausdehnung [bis 1997])</i>
	<i>(N3: Metastasen in Lymphknoten, mehr als 5 cm in größter Ausdehnung [bis 1997])</i>
NX:	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
M0:	Keine Fernmetastasen
M1:	Fernmetastasen
MX:	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0 T1,2,3 N1 M0
Stadium IV	T4 N0,N1 M0 Jedes T N2 M0 Jedes T Jedes N M1

**Tabelle 1.1:** pTNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach der UICC, Stand 2002 (Quelle: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Urogenitale Tumoren, Tumorzentrum München)

Stadium	Beschreibung	Entsprechende TNM-Klassifikation
I	Tumor innerhalb der Nierenkapsel	T1–2 N0 M0
II	Einbruch des Tumors in das perirenale Fettgewebe oder Nebenniere	T3a N0 M0
III	Regionale Tumorausbreitung mit A) Tumoreinbruch in die Vena renalis oder Vena cava inferior B) regionärem Lymphknotenbefall C) Kombination A und B	T3b–c N0 M0 T1–3a N1 M0 T3b–c N1 M0
IV	A) Befall benachbarter Organe außer Nebennieren B) Fernmetastasen	T4 N0–2 M0 T1–4 N0–2 M1

**Tabelle 1.2:** Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach Robson (Quelle: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Urogenitale Tumoren, Tumorzentrum München)

Unterschiede zwischen der Stadieneinteilung der UICC und der nach Robson bestehen in der Definition des Stadium I. Robson definiert das Stadium I unabhängig von der Tumorgöße, solange der Tumor die Nierenkapsel nicht durchbrochen hat. Weiterhin ist für die Stadieneinteilung der UICC die Überschreitung des Tumorwachstums über die Gerota-Faszie (lateinisch: *fascia renalis*) hinaus von Relevanz (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Die Gerota-Faszie**

Dargestellt ist ein Sagittalschnitt durch das rechte Drittel des menschlichen Rumpfs, links ist dorsal und rechts ist ventral. Die Gerota-Faszie ist transparent-rot markiert; sie grenzt das Nierenlager nach dorsal von der autochthonen Rückenmuskulatur und nach ventral vom Abdomen ab (modifiziert nach „Sobotta Anatomie des Menschen“, Urban und Fischer 2002).

Operative Verfahren stellen in frühen Stadien den einzigen kurativen Therapieansatz dar. Palliativ kommen als Maßnahmen die Immuntherapie mit IFN- $\alpha$  und IL-2, Chemotherapie, Chemoembolisation oder Radiotherapie in Frage [Krejci, 2004]. Die 5-Jahres-Überlebensrate, die für einige solide Tumore als statistische Definition einer Vollremission auf Dauer angesehen werden kann, beträgt im Stadium I nach Robson je nach Literatur zwischen 65 % und 70 %, während sie im Stadium IV unter 10 % liegt.

Im Nierenzellkarzinom befindet sich charakteristischer Weise ein teils massives Infiltrat

an Lymphozyten und Zellen monozytären Ursprungs [Hamada, 2002; Nakano, 2001]. Dokumentierte Spontanremissionen, Ansprechen auf Immuntherapien [Lokich, 1997; Vogelzang, 1998] und der Nachweis von Tumor infiltrierenden Lymphozyten, die klonale Expansion zeigen und *in vitro* sogar in der Lage sind autologe Tumorzellen zu lysieren [Jantzer, 1998; Schendel, 1997], begründen das immunologische Interesse am Nierenzellkarzinom.

## 1.2. Zelltypen des Immunsystems

Das Immunsystem verfügt über zahlreiche unterschiedlich differenzierte Zelltypen, die verschiedene Aufgaben erfüllen. Im Folgenden sollen die für das Verständnis dieser Arbeit relevanten Zelltypen beschrieben werden.

### 1.2.1. Makrophagen und dendritische Zellen

In beinahe allen Geweben des Körpers befinden sich Makrophagen und dendritische Zellen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Sie leiten sich von Monozytenvorläuferzellen ab, die die Blutzirkulation verlassen und in das Gewebe einwandern. Makrophagen besitzen auf ihrer Zellmembran Rezeptoren, die allgemeine Strukturen von Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen oder Parasiten erkennen und diese Pathogene nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor phagozytieren. Verschiedene Toll-like-Rezeptoren erkennen bakterielle Bestandteile, der Makrophagen-Mannose-Rezeptor erkennt bakterielle und virale Zuckermoleküle und zahlreiche Scavenger-Rezeptoren erkennen ein breites Spektrum an pathogenen Strukturen [Aderem, 1999]. Auch bei der Aufnahme von apoptotischen Zellfragmenten, die beim Zerfall körpereigener Zellen entstehen, spielen Makrophagen eine wichtige Rolle [Aderem, 1999]. Die phagozytierten Bestandteile werden in der Zelle durch lysosomalen Abbau zerstört. Nach Phagozytose von Pathogenen, nicht aber von apoptotischen körpereigenen Zellen [Aderem, 1999], werden die Makrophagen aktiviert. Dabei initiieren sie durch die Sekretion zahlreicher Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 oder TNF- $\alpha$  und die Freisetzung von Chemokinen wie IL-8 oder MIP-1 $\beta$ , eine lokale Entzündungsreaktion [Svanborg, 1999].

Dendritische Zellen phagozytieren ebenfalls Pathogene, die – ähnlich wie Makrophagen – durch Rezeptoren mit einem breiten Erkennungsspektrum aufgenommen werden [Sallusto, 1995]. Weiterhin nehmen dendritische Zellen auch große Mengen von örtlich im Gewebe vorkommenden extrazellulären Antigenen auf, unabhängig davon, ob es sich um Pathogene oder frei im Gewebe befindliche körpereigene Proteine handelt. Die Aufnahme geschieht über Makropinozytose [Sallusto, 1995], wobei extrazelluläre Flüssigkeit mit sämtlichen in ihr vorhandenen

Proteinen unspezifisch aufgenommen wird [Reis e Sousa, 1993; Sallusto, 1995] (Abbildung 1.2 Vorgang 1-2). Dendritische Zellen spielen bei der Aktivierung von T-Zellen eine entscheidende Rolle (s. Abschnitt 1.4).

### 1.2.2. T-Zellen

T-Zellen befinden sich in großer Menge im Blutkreislauf und den lymphatischen Organen und wandern nach ihrer Aktivierung in entzündlich veränderte Gewebe aus. Funktionell lassen sich T-Zellen in zwei übergeordnete Gruppen unterscheiden. T-Zellen, die das CD8-Oberflächenantigen aufweisen, sind in der Mehrzahl zytotoxische T-Zellen und für die direkte Zerstörung von anderen Zellen verantwortlich, wenn diese für das Immunsystem fremde Proteinstrukturen (Antigene) besitzen. Diese werden über den T-Zell-Rezeptor erkannt, welcher sich auf der Zellmembran jeder T-Zelle befindet. T-Zellen, die das CD4-Oberflächenantigen aufweisen, werden als T-Helferzellen bezeichnet. Nach ihrer Aktivierung sezernieren sie lösliche Faktoren wie IL-2, IL-4 oder IFN- $\gamma$  und aktivieren dadurch Makrophagen, zytotoxische T-Zellen und B-Lymphozyten. Nach ihrer Reifung im Thymus werden T-Zellen als "naiv" bezeichnet, da sie zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Lage sind, Fremdartigen tragende Zellen abzutöten oder Makrophagen und B-Zellen zu stimulieren. Erst nach ihrer Aktivierung durch eine dendritische Antigen präsentierende Zelle durchlaufen T-Zellen einen Differenzierungsprozess, der sie zu diesen Aufgaben befähigt (s. Abschnitt 1.4).

### 1.2.3. Natürliche Killer-Zellen

Ähnlich wie zytotoxische T-Zellen, sind Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) in der Lage eine Zielzelle durch unmittelbare Zell-Zell-Interaktion abzutöten. Im Gegensatz zu den T-Zellen, welche primär naiv sind und erst nach ihrer Aktivierung in Zielzellen Apoptose induzieren können, sind NK-Zellen ohne vorheriges Aktivierungsprogramm fähig ihre Zielzelle abzutöten. Dabei unterscheiden sich die beiden Zelltypen allerdings darin, welche Signale den zytotoxischen Mechanismus auslösen. Während T-Zellen nach Durchlaufen ihres Aktivierungsprozesses ein spezifisches Antigen auf ihrer Zielzelle erkennen und diese daraufhin abtöten, weisen NK-Zellen aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf, die eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen auf der Zielzelle erkennen können und die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle entweder positiv oder negativ beeinflussen. Das Überwiegen von aktivierenden gegenüber inhibierenden Signalen entscheidet letztendlich über die Auslösung der zytotoxischen Reaktion gegen die Zielzelle [Lanier, 1998; Renard, 1997]. Inhibitorische Rezeptoren binden beispielsweise an den MHC-Klasse-I-Komplex der Zielzelle; falls Zielzellen eine Abregulation von MHC-Klasse-I-Komplexen aufweisen, kann es somit zum

Überwiegen der aktivierenden Signale in NK-Zellen und zur Zerstörung der entsprechenden Zielzelle kommen.

### 1.3. Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die Zellen des Immunsystems müssen zur Ausübung ihrer Funktion in vielen Fällen innerhalb des Organismus ihren "Aufenthaltsort" wechseln. So wandern sie beispielsweise vom Blut ins Gewebe oder von dort weiter in den Lymphknoten. Diese Wanderungsprozesse werden durch Chemokine beeinflusst, die von Zellen im jeweiligen Zielgewebe sezerniert werden und einen Konzentrationsgradienten aufbauen, dem die einwandernden Zellen dann folgen [DeVries, 1999]. Dieser als Chemotaxis bezeichnete Prozess wird durch Chemokinrezeptoren ermöglicht, die auf der Oberfläche der einwandernden Zelle exprimiert werden.

Ein Beispiel für ein Chemokin stellt das Protein RANTES ("*Regulated on activation and normally T cell expressed and secreted*" – oder neuer auch als CCL5 bezeichnet) dar; es wird von aktivierten Fibroblasten, Endothelzellen oder T-Zellen sezerniert und der aufgebaute Konzentrationsgradient zieht Zellen an, welche Rezeptoren für CCL5 aufweisen. Dabei handelt es sich um Makrophagen, dendritische Zellen oder T-Zellen, da diese Zellen in der Regel die CCL5-Rezeptoren CCR1, CCR3 oder CCR5 exprimieren.

### 1.4. Der Ablauf der Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen

Zellen, die körperfremde Antigene exprimieren, können unter geeigneten Bedingungen durch zytotoxische T-Zellen erkannt und gezielt abgetötet werden. Der Weg bis zur Beseitigung der entsprechenden Zielzelle ist komplex und soll im folgenden in mehreren Schritten dargestellt werden, die je nach Relevanz für das Verständnis dieser Arbeit mit unterschiedlicher Genauigkeit ausgeführt werden (siehe hierzu auch Abbildung 1.2).

#### 1.4.1. Antigenaufnahme und Präsentation: Ein fremdes Antigen wird von dendritischen Zellen aufgenommen und präsentiert

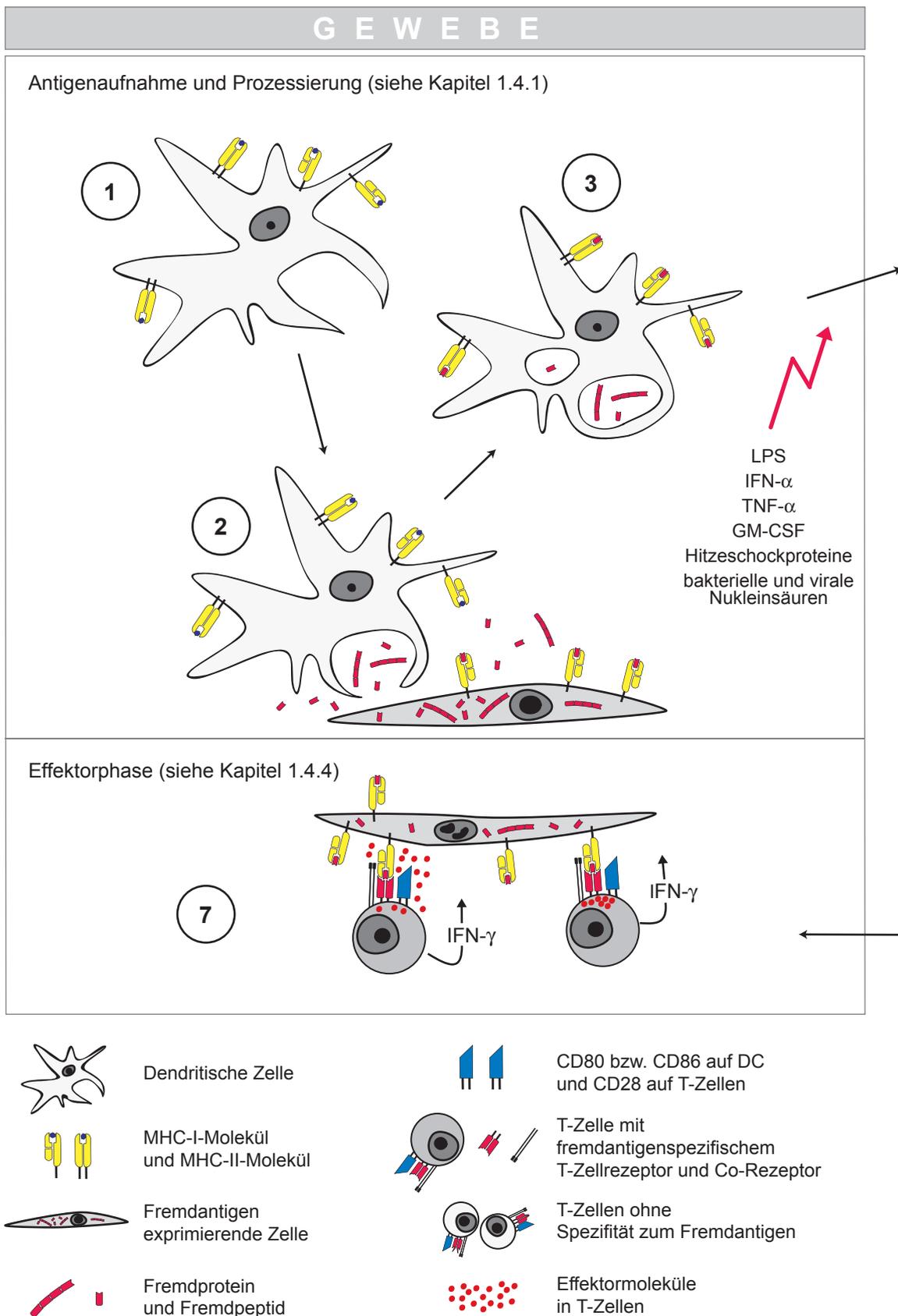
Wichtig für die Erkennung und Vernichtung von Fremdartigen tragenden Zellen durch T-Zellen ist, dass das entsprechende Fremdartigen vor Ort von dendritischen Zellen aufgenommen wird (Abbildung 1.2 Vorgang 1+2). Diese verarbeiten die von ihnen aufgenommen Proteine zu Peptidfragmenten und präsentieren sie zusammen mit einem Proteinkomplex (siehe unten) auf ihrer Zelloberfläche (Abbildung 1.2

Vorgang 3). Von Präsentation wird hierbei deshalb gesprochen, weil die Peptide auf der Oberfläche später den T-Zellen gezeigt werden sollen. Der hierzu nötige Proteinkomplex wird als "*major histocompatibility complex*" (MHC) bezeichnet, wobei zwischen MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Molekülen unterschieden wird. Peptidfragmente, die auf MHC-Klasse-I an der Zelloberfläche präsentiert werden, können von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Beinahe jede kernhaltige Zelle des Körpers exprimiert auf ihrer Oberfläche MHC-Klasse-I-Moleküle, auf denen Peptidfragmente von zelleigenen und fremden Proteinen präsentiert werden (siehe "Fremdantigen exprimierende Zelle" in Abbildung 1.2 Vorgang 2 und 7). Dadurch wird gewährleistet, dass potentiell alle kernhaltigen Zellen des Organismus durch zytotoxische T-Zellen eliminiert werden können. MHC-Klasse-II-Moleküle befinden sich nur auf Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen oder spezialisierten T-Zellen und werden von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen erkannt.

#### **1.4.2. Migration und Reifung: Die dendritische Zelle wandert in den Lymphknoten und unterliegt einem Reifungsprozess**

Die dendritische Zelle soll nach Aufnahme des Antigens und dessen Präsentation auf MHC-Molekülen unter den vielen Millionen verschiedenen T-Zellen des menschlichen Körpers diejenige finden, die einen für das Antigen passenden T-Zell-Rezeptor exprimiert. Die dendritische Zelle befindet sich allerdings nach Aufnahme des Antigens im Gewebe, wo sie nicht mit der großen Menge von im Organismus befindlichen T-Zellen in Kontakt kommen kann. Sie wandert deshalb aus dem Gewebe aus und gelangt mit der Lymphe in einen Lymphknoten, wo ständig große Mengen von T-Zellen zirkulieren [Bouso, 2003]. Die Wanderung wird durch die Expression von Chemokinrezeptoren erleichtert, die vom Lymphknoten ausgehende Chemokingradienten erkennen [Sallusto, 2000].

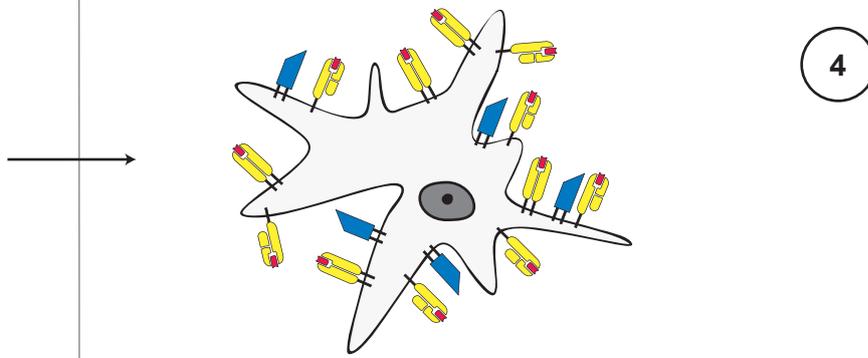
Des Weiteren ist eine T-Zellaktivierung nur dann möglich, wenn die dendritische Zelle selbst einen Reifungsprozess durchgemacht hat. Zur Induktion dieser Reifung genügt die Aufnahme von Antigen allerdings nicht; hierzu muss der Zelle signalisiert werden, dass am Ort der Antigenaufnahme für den Organismus eine Gefahr besteht [Banchereau, 1998] (Abbildung 1.2 Vorgang 3). Solche Gefahrensignale sind bakterielles LPS, IFN- $\alpha$  [Banchereau, 1998], welches von virusinfizierten Zellen gebildet wird, Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder GM-CSF [Banchereau, 1998], freie Hitzeschockproteine [Tamura, 1997] sowie bakterienspezifische oder viral induzierte Nukleinsäuren [Kaisho, 2003]. Die Reifung beinhaltet eine Hochregulation von MHC-Molekülen und die Expression von CD80 und CD86, beides Membranproteine, die später für die Aktivierung jener T-Zelle, die das Antigen erkennen soll, unabdingbar sind [Gonzalo, 2001] (Abbildung 1.2 Vorgang 4).



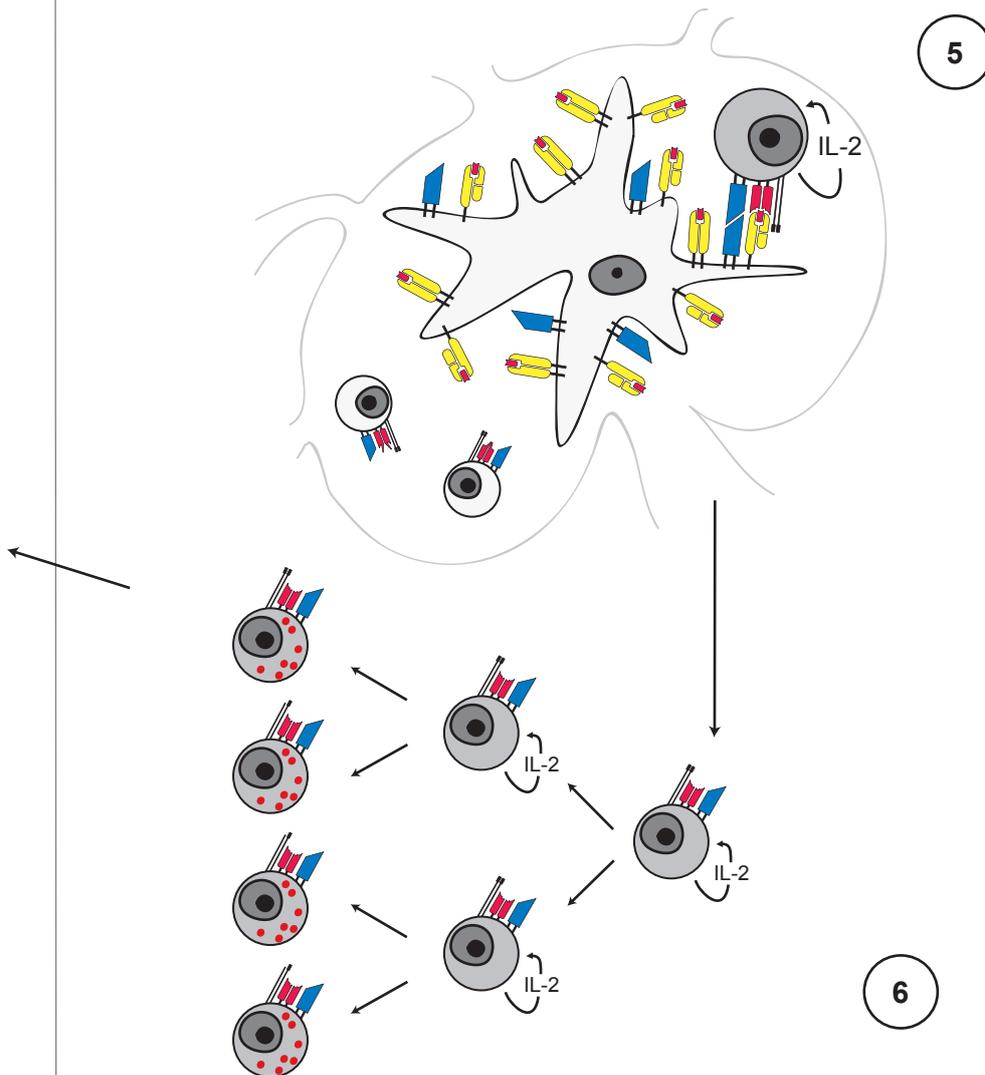
**Abbildung 1.2:** Der Vorgang der Immunantwort (Legende siehe nachfolgende Seite)

# LYMPHSYSTEM UND BLUT

Migration und Reifung (siehe Kapitel 1.4.2)



T-Zellinitialisierung (siehe Kapitel 1.4.3)



**Legende zu Abbildung 1.2: Der Vorgang der Immunantwort**

① Die dendritische Zelle ist morphologisch durch zahlreiche Ausläufer ihres Zytoplasmas gekennzeichnet und weist auf ihrer Zelloberfläche MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle (beide gelb) auf. Auf diesen Proteinkomplexen werden antigene Peptide (blau) präsentiert.

② Die dendritische Zelle gelangt in die Nähe einer Zelle, welche körperfremde Proteine exprimiert (dargestellt als rote Ketten). Fragmente dieser Fremdproteine werden als antigene Peptide (dargestellt als Glied dieser Kette) auf MHC-Klasse-I-Molekülen der Zelle präsentiert und gelangen nach dem Zerfall der Zelle in den extrazellulären Raum. Dendritische Zellen können die fremden Proteinbestandteile und Peptide über Makropinozytose oder Phagozytose aufnehmen.

③ Nach Aufnahme der Proteinbestandteile werden diese in der dendritischen Zelle prozessiert, um anschließend auf den zelleigenen MHC-Molekülen präsentiert werden zu können. Die präsentierten Fremdantigene sind dabei rot dargestellt.

④ Liegen im Gewebe geeignete Gefahrensignale vor (stilisiert durch den roten Pfeil unter „3“), wird in der dendritischen Zelle ein Reifungsprozess initiiert; dabei nimmt die Menge an MHC-Molekülen auf der Zelle zu und die für die anschließende T-Zell-Stimulation notwendigen Proteine CD80 und CD86 (dargestellt als spitze blaue Vierecke) werden hochreguliert. Die reife dendritische Zelle wandert nun in den regionalen Lymphknoten des entsprechenden Gewebes.

⑤ Die reife dendritische Zelle trifft im Lymphknoten auf T-Zellen mit jeweils unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren (alle rot). Nicht antigenspezifische T-Zellen sind in dem stilisierten Lymphknoten links unten dargestellt. Findet sich eine T-Zelle, deren T-Zell-Rezeptor den MHC-Peptid-Komplex mit dem Fremdantigen erkennt, kommt es zur Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Peptid-Komplex der dendritischen Zelle (rechts oben); die Bindung wird durch den CD8-Co-Rezeptor stabilisiert. Weiterhin interagiert das CD28-Molekül der T-Zelle (dargestellt als spitzes blaues Viereck) mit den co-stimulatorischen Rezeptoren CD80 oder CD86 (ebenfalls als spitzes blaues Viereck dargestellt). Die T-Zelle wird dadurch aktiviert und beginnt mit der Produktion von IL-2.

⑥ Durch die Sekretion von IL-2 werden die aktivierten T-Zellen zur Proliferation anregt (autokrine Stimulation). Innerhalb kurzer Zeit liegen zahlreiche T-Zellen vor, die alle den gleichen T-Zell-Rezeptor besitzen und somit auch das gleiche Antigen erkennen können. Weiterhin werden Effektormoleküle (dargestellt durch rote Punkte innerhalb der T-Zelle) exprimiert, welche später zur Apoptoseinduktion in der Zielzelle nötig sind. Die T-Zellen werden in diesem Zustand als aktivierte zytotoxische T-Zellen bezeichnet.

⑦ Die aktivierte zytotoxische T-Zelle erkennt über den T-Zell-Rezeptor den Komplex aus Antigen und MHC-Klasse-I-Molekül auf der Fremdantigen exprimierenden Zelle. Die Erkennung der Zielzelle bewirkt, dass die zytotoxischen Effektormoleküle innerhalb der T-Zelle zur Zielzelle hin orientiert und daraufhin ausgeschüttet werden. In der Zielzelle wird daraufhin Apoptose ausgelöst. Weiterhin kommt es im Rahmen der Zielzellerkennung zur Sekretion des Zytokins IFN- $\gamma$  durch die T-Zelle. Zur Ausübung dieses Effektorprogrammes wird kein co-stimulatorisches Signal benötigt und es ist somit keine Expression der Moleküle CD80 oder CD86 auf der Zielzelle nötig.

**1.4.3. T-Zellinitialisierung: Die dendritische Zelle aktiviert im Lymphknoten eine antigenspezifische T-Zelle**

T-Zellen erkennen auf MHC-Moleküle gebundene Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor. Dieser besitzt eine variable Region, deren Substruktur auf praktisch jeder T-Zelle unterschiedlich ist. Bedingt durch die außerordentlich hohe Vielfältigkeit dieser Region des T-Zell-Rezeptors gibt es unter den Millionen von T-Zellen im Organismus nur einige wenige, die ein jeweiliges Antigen erkennen [Bousoo, 2003]. Durch die Lymphknoten zirkulieren täglich große Mengen an T-Zellen, wodurch es

wahrscheinlich wird, dass eine dendritische Zelle dort T-Zellen antrifft, die T-Zell-Rezeptoren exprimieren, welche den MHC-Antigen-Komplex der dendritischen Zelle erkennen [Bousoo, 2003]. Zur T-Zell-Aktivierung kommt es nach der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Komplex aus MHC-Molekül und antigenem Peptid. Zusätzlich sorgen auf der T-Zelle befindliche Adhäsionsmoleküle sowie der CD8-Co-Rezeptor für eine stabilere Bindung mit dem MHC-Peptid-Komplex. In Abbildung 1.2 "Vorgang 5" ist der Kontakt von T-Zelle und dendritischer Zelle im rechten oberen Teil des stilisierten Lymphknotens dargestellt; die kleineren T-Zellen links unten weisen einen anderen T-Zell-Rezeptor auf und können den MHC-Peptid-Komplex nicht erkennen. Die Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle ist für den Organismus nicht ungefährlich; falls diese gegen ein körpereigenes Antigen aktiviert werden würde, könnten alle Zellen, die dieses tragen, anschließend durch die zytotoxischen T-Zellen attackiert werden und es käme zur Autoimmunreaktion. Die Aktivierung ist daher streng reguliert, so reicht die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Peptid-Komplex der dendritischen Zelle zur Aktivierung nicht aus. Die T-Zelle benötigt zusätzlich ein weiteres Signal, welches durch die Proteine CD80 und CD86 auf der dendritischen Zelle gewährleistet und als co-stimulatorisches Signal bezeichnet wird [Gonzalo, 2001]. Diese Proteine werden von der dendritischen Zelle, wie bereits oben erwähnt, nur nach einem Gefahrensignal exprimiert, welches die Aufnahme und Präsentation von körpereigenem Antigen in der Regel nicht darstellt. Der Rezeptor für CD80 und CD86 auf der T-Zelle ist das Protein CD28. Die Bindung von CD28 an CD80 oder CD86 (im oberen Teil von Abbildung 1.2 Vorgang 5 durch die spitzen blauen Vierecke auf T-Zelle und dendritischer Zelle dargestellt) verhindert in der T-Zelle die ansonsten sicherheitshalber stattfindende Induktion von Apoptose und die T-Zelle wird nun letztendlich aktiviert.

Vor dem Kontakt mit der Antigen präsentierenden Zelle wird die T-Zelle als "naiv" bezeichnet. Durch den Kontakt beginnt sie sich zu teilen und unterliegt fortan einer starken Proliferation. Dieser Prozess wird insbesondere durch das von den T-Zellen selbst sezernierte Zytokin Interleukin-2 angetrieben. Die Proliferation der antigenspezifischen T-Zelle hat zur Konsequenz, dass in kürzester Zeit hunderttausende T-Zellen existieren, die alle das entsprechende Fremdanigen erkennen [Gudmundsdottir, 1999] (Abbildung 1.2 Vorgang 6). Die proliferierenden T-Zellen unterliegen weiterhin einem Differenzierungsprozess, der bewirkt, dass Membranproteine, die eine wiederholte Einwanderung der T-Zellen in den Lymphknoten unterstützen, abreguliert werden [Galkina, 2003], während intrazelluläre Effektormoleküle, die für die Apoptoseinduktion in Zielzellen relevant sind, neu exprimiert werden (Effektormoleküle sind in Abbildung 1.2 Vorgang 6 als rote Punkte innerhalb der Zellen dargestellt). Wichtige Effektormoleküle für zytotoxische T-Zellen sind Perforin, Granzym A und Granzym B; diese befinden sich in etwa fünf Tage nach der T-Zellaktivierung in intrazellulären Granula. Zeitgleich mit den Zytotoxinen wird auch das als Chemokin bekannte Protein CCL5 exprimiert [Ortiz, 1997]. Die

differenzierten ehemals naiven T-Zellen werden nun als "aktivierte zytotoxische T-Zellen" bezeichnet.

#### **1.4.4. Effektorphase: Die Fremdartigen tragende Zelle wird von der aktivierten T-Zelle erkannt und abgetötet**

Aktivierte T-Zellen verlassen den Lymphknoten und wandern in Gewebe ein, die beispielsweise mittels Chemokinen entzündliche Signale aussenden.

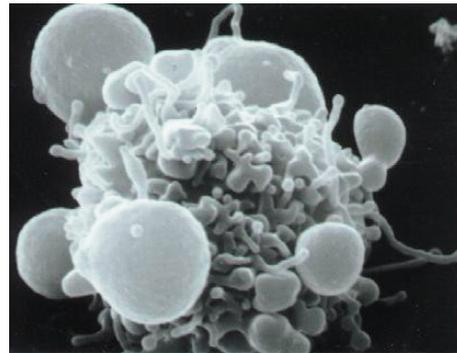
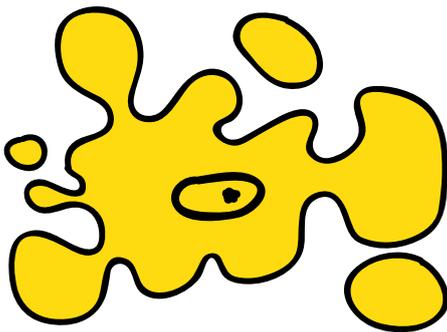
Im Gewebe werden solche Zellen erkannt, welche über ihren MHC-Klasse-I-Komplex das entsprechende Fremdartigen präsentieren. Durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-Peptid-Komplex der Zielzelle kommt es zur Produktion und Sekretion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  (Abbildung 1.2 Vorgang 7). Weiterhin werden die in den intrazellulären Granula gespeicherten Effektormoleküle zur Kontaktstelle mit der Zielzelle hin orientiert und daraufhin ausgeschüttet [Lieberman, 2003] (Abbildung 1.2 Vorgang 7). Zur Ausübung dieses Effektorprogramms benötigt eine aktivierte T-Zelle keine weiteren co-stimulatorischen Signale (vgl. Abbildung 1.2 Vorgang 7: die Fremdartigen exprimierende Zelle besitzt kein CD80 oder CD86).

Die zytotoxischen Effektormoleküle werden in die Zielzelle eingeschleust, wo sie den als Apoptose bezeichneten programmierten Zelltod auslösen. Im Laufe der Apoptose verliert die Zelle den Kontakt zu ihren Nachbarzellen, es kommt zu einer Schrumpfung des Zytoplasmas und zur Kondensation nukleärer und zytoplasmatischer Proteine. Später faltet sich die Zellmembran auf und es lösen sich zytoplasmatische Fragmente blasenförmig ab (Abbildung 1.3); diese werden daraufhin als apoptotische Körper (engl. *apoptotic bodies*) bezeichnet und letztendlich von Makrophagen oder dendritischen Zellen beseitigt.

### **1.5 Die CD3 $\zeta$ -Kette**

Nach der Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem MHC-Peptid-Komplex erfolgt in der T-Zelle eine intrazelluläre Weiterleitung des Erkennungssignals. Dies geschieht über eine Signalkaskade, die letztendlich zur Induktion von Transkriptionsfaktoren im Zellkern [van Oers, 1999] oder zur Ausübung des Effektorprogramms der T-Zelle führt [Trapani, 2002]. Der T-Zell-Rezeptor hat keine intrazytoplasmatischen Anteile mit Signalfunktion und ist daher mit dem zur Signalweiterleitung befähigten CD3-Komplex assoziiert. Die CD3 $\zeta$ -Kette stellt einen überwiegend intrazellulären Bestandteil des CD3-Komplexes dar. Ihre intrazellulären Proteinanteile werden als ITAMs (*immune receptor tyrosine-based activation motifs*) bezeichnet und enthalten jeweils zwei Tyrosine, die für die folgende Signalweiterleitung

der T-Zelle phosphoryliert werden müssen [Frank, 1990; Lin, 2001] (Abbildung 1.4). Ohne den CD3-Komplex und die CD3 $\zeta$ -Kette kann die T-Zelle somit nicht aktiviert werden und weiterhin kein Effektorprogramm ausführen [Trapani, 2002].



**Abbildung 1.3: Entstehung von apoptotischen Körpern**

Schematische Darstellung und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle in der späten Phase der Apoptose. Es bilden sich blasenartige Strukturen, die sich von der Zelle ablösen und als apoptotische Körper bezeichnet werden. Die rasterelektronenmikroskopische Abbildung zeigt eine Epithelzelle im späten Stadium der Apoptose (freundlicherweise überlassen von Prof. Walter Malorni, Direttore di Reparto Patologia subcellulare, Institute Superiore di Sanita, Rom, Italien).

### **1.6. Erklärungskonzepte für fehlende Tumordestruktion durch zytotoxische T-Zellen**

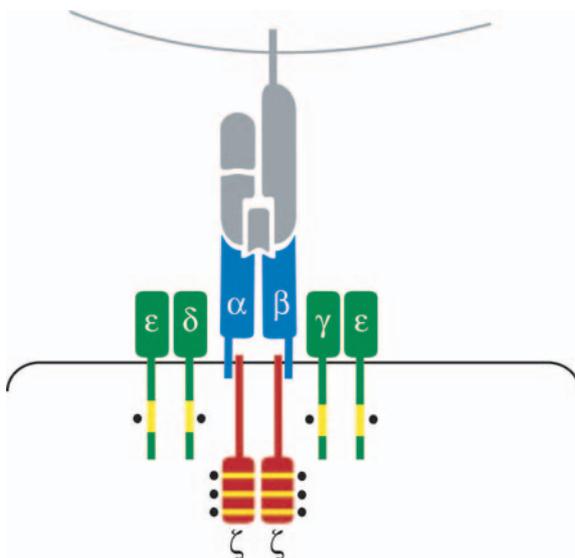
Durch die Zerstörung oder Veränderung von relevanten Abschnitten im Genom kommt es, dass auch Tumorzellen Proteine produzieren, die dem Immunsystem fremd sind [Boon, 1997; Van den Eynde, 1997]. Beispiele für Tumorantigene sind Proteine, die durch Punktmutation oder posttranslationale Veränderung neu entstanden sind [Houghton, 1994; Wolfel, 1995] oder auf Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert sind [Rickinson, 1997]. Bestandteile derartiger Proteine werden als Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen der Tumorzelle präsentiert. Eine T-Zell-Erkennung der entsprechenden Tumorzelle ist daher potentiell möglich und aus zahlreichen malignen Tumoren konnten T-Zellen isoliert werden, welche die entsprechenden Tumorzellen unter geeigneten Bedingungen *in vitro* abtöten [Rosenberg, 2001]. Tatsächlich aber findet eine effektive Zerstörung von Tumorzellen, die zur Rückbildung des Tumors führt, im Patienten offensichtlich nicht statt.

Die obigen Ausführungen über den Vorgang der Immunantwort verdeutlichen die Komplexität dieses Ablaufes und damit die Tatsache, dass die Ursachen für die ungenügende Zerstörung des Tumors vielfältig sein können. Einige relevante Erklärungskonzepte der unzureichenden Immunreaktion gegen maligne Tumore sollen im folgenden dargelegt werden.

Fehlt der Tumorzelle ein entsprechendes Antigen oder verliert sie es durch Mutation, wird die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen unmöglich [Bodmer, 1993]. Auch wurden Tumorzellen beschrieben, deren Expression von MHC-Klasse-I Molekülen abreguliert ist, wodurch die Präsentation des Tumorantigens und folglich die Erkennung durch antigenspezifische T-Zellen ausgeschlossen ist [Garrido, 1997].

Da Tumoren sich aus körpereigenem Gewebe entwickeln, senden sie in der Regel keine Gefahrensignale aus, die zur Induktion des Reifungsprozesses der Antigen präsentierenden Zelle nötig sind. Dieser fehlen somit die co-stimulatorischen Proteine und eine T-Zellaktivierung im Lymphknoten bleibt aus [Fuchs, 1996; Gallucci, 1999]. Selbst wenn antigenspezifische T-Zellen aktiviert werden und bis in den Tumor vordringen, können sie vor Ort durch lösliche Faktoren an der Ausübung ihrer Effektorfunktion gehindert werden. Ein häufig diskutiertes Beispiel stellt hierbei das Zytokin TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) dar, welches zytotoxische T-Zellen direkt in ihrer Aktivität hemmen kann [Torre-Amione, 1990]. Eine wichtige Quelle für TGF- $\beta$  stellen regulatorische T-Zellen dar, die als Infiltrat in vielen malignen Tumoren identifiziert werden konnten [Zou, 2006].

Letztendlich können sich Tumorzellen vor der Apoptose induzierenden Wirkung der zytotoxischen Effektormoleküle schützen, indem sie Proteine exprimieren, die insbesondere die Aktivität von Granzym B hemmen [Trapani, 2002].



**Abbildung 1.4: Der CD3-Komplex**

Der an den MHC-Peptid-Komplex (grau) bindende T-Zell-Rezeptor (blau) besteht aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette. Assoziiert sind die überwiegend extrazellulären Proteine CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$  und CD3 $\delta$  (grün) und die überwiegend intrazellulären Proteine CD3 $\zeta$  (rot). Auf den Proteinen des CD3-Komplexes befinden sich Aminosäuresequenzen, die als ITAMs bezeichnet werden (gelbe Streifen). Im Rahmen der intrazellulären Signalweiterleitung werden diese durch intrazelluläre Enzyme (schwarze Punkte) phosphoryliert (nachgezeichnet in Anlehnung an „Immunobiology“, Garland Publishing 2001).

## 1.7. Aufgabenstellung

Die Erkennung und Vernichtung einer Tumorzelle durch zytotoxische T-Zellen sind komplexe Abläufe, die an zahlreichen Stellen gestört werden können. Therapeutische Verfahren der Zukunft basieren auf dem genauen Kenntnis der Prozesse, die zu einer Störung der Immunantwort führen. Behandlungsstrategien, die Defizite in der T-Zell-vermittelten Immunreaktion gezielt beheben, gelten als vielversprechende Therapiekonzepte [Smyth, 2001]. Es ist daher zunächst ein detailliertes Verständnis von möglichen Störungsmechanismen nötig.

Aus Nierenzellkarzinomen konnten T-Zellen isoliert werden, die autologe Tumorzellen *in vitro* abtöten [Schendel, 1997]. Dies lässt auf das Vorhandensein von Tumorantigenen, die Aktivierung Antigen präsentierender Zellen und die Einwanderung aktivierter T-Zellen in den Tumor schließen. Die Störung liegt hier somit eher am Ende des gesamten Ablaufs der Immunreaktion und könnte durch eine Inaktivierung der T-Zellen durch das Milieu im Tumor begründet sein [Finke, 1999; Marincola, 2000; Radoja, 2000].

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, Erkenntnisse über das Ausmaß der Funktionalität und Aktivität von im Tumor befindlichen zytotoxischen T-Zellen auszuweiten und zu vertiefen. Hierzu sollten Tumor infiltrierende Lymphozyten durch Untersuchungen des Effektormoleküls Perforin auf ihren Effektorstatus und durch die Analyse der Expression der CD3 $\zeta$ -Kette sowie der Sekretion von IFN- $\gamma$  auf ihren Aktivierungsstatus hin untersucht werden.

Darüber hinaus sollten insbesondere Zusammenhänge zwischen T-Zell-Infiltration und myeloischem Infiltrat analysiert werden. Zur detaillierteren Beurteilung des Infiltrats an dendritischen Zellen und Makrophagen sollten Antikörper gegen neu beschriebene Differenzierungsantigene dieser Zellen verwendet werden.

Durch immunhistologische Untersuchungen sollten dabei quantitative Aussagen getroffen, insbesondere aber auch die räumliche Verteilung der einzelnen leukozytären Subpopulationen zueinander beurteilt werden. Funktionsabläufe und zelluläre Interaktionen sollten in Zellkulturmodellen *in vitro* simuliert und mit histologischen Beobachtungen *in situ* verglichen werden.

Anhand eines Zellkulturmodells sollte auch die Rolle des Chemokins CCL5 bei der Effektorfunktion von T-Zellen untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1. Geräte, Chemikalien und Reagenzien

#### 2.1.1. Geräte

Bestrahlungsanlage	HWM-D-2000 Gamma Cell 40
Brutschrank	Heraeus
Kryostat	Leica, Jung CM 3000
Durchflusszytometer (FACS)	Becton Dickinson, FACS Calibur
Konfokale Lasermikroskope	Leica TCS SP2 Zeiss LSM510 NLO
Lichtmikroskope	Leica DMLS Zeiss Axioskop
Digitalkamera des Lichtmikroskops	Fujix, HC-300Z
Neubauer Zählkammer	GLW
Sterilbank	BDK
Zentrifugen	Eppendorf, Heraeus

#### 2.1.2. Chemikalien

Aceton	Merck	Natriumacetattrihydrat	Merck
Aminoethylcarbazol	Sigma	Natriumacid	Sigma
Bromphenolblau	Merck	Natriumchlorid	Merck
CFDA SE (Carboxy- fluorescein Diacetat Succinimidylester)	Molecular Probes	Natriumcitrat	Merck
Chloroform	Merck	Natriumnitrit	Merck
DAPI (4',6-Diamidino-2- Phenylindol)	Sigma	Naphtol AS-BI Phosphat	Sigma
Dimethylformamid	Sigma	Neufuchsin	Aldrich
EDTA	Merck	Paraformaldehyd	Sigma
Ethanol	Merck	Perhydrol	Aldrich
Essigsäure	Merck	PMA	Sigma
Fast Blue BB Salz	Sigma	Poly-L-Lysin	Sigma
Ionomycin	Sigma	Propidiumjodid	Sigma
Formamid	Sigma	Salzsäure	Sigma
HEPES	Merck	Saponin	Sigma
Hämalaun	Merck	TRIS	Merck
Isopropanol	Merck	Trypanblau	ICN Biomedicals
Levamisol	Sigma	TOPRO3	Molecular Probes
Methanol	Merck	Wasser, destilliertes	Braun

### 2.1.3. Materialien und Lösungen für die Zellkultur

Als fertige Lösungen wurden verwendet:

Fötales Kälberserum (FCS)*	GibcoBRL
HBSS mit Ca, Mg	GibcoBRL
HBSS ohne Ca, Mg	GibcoBRL
Humanes Serum	Serumgemisch aus vier Spendern
PBS (Phosphat gepufferte Saline) ohne Ca/Mg	GibcoBRL
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	GibcoBRL
Ficoll	Pancoll, PAN Biotech

\*FCS wurde vor Gebrauch 45 Minuten im Wasserbad bei 56°C inaktiviert

Als Zusätze wurden verwendet:

Actinomycin D	Sigma
DMSO	Merck
L-Glutamin	GibcoBRL
MEM-NEAA (nicht essentielle Aminosäuren)	GibcoBRL
Natriumpyruvat	GibcoBRL
Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL
Rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2)	Proleukin, Chiron Biopharmaceuticals
Trypsin-EDTA in PBS	GibcoBRL

Aus den Fertiglösungen wurden folgende Medien selbst hergestellt:

**RPMI III:** RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1x nicht essentielle Aminosäuren

**RCC-Medium:** RPMI III, 12 % FCS

**T-Zell-Medium:** RPMI III, 7,5% FCS, 7,5% Humanserum, 50 U/ml rIL-2, 1000 U/ml Penicillin/Streptomycin

**B-LCL-Medium:** RPMI III, 7 % FCS

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von der Firma Greiner, Falcon und Becton Dickinson bezogen.

### 2.1.4. Materialien und Lösungen für die Immunzytologie und Immunhistologie

**TBS-Puffer:** 10 mM TRIS, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,5

**AP-Puffer:** 100 mM TRIS, 100 mM Natriumchlorid

**Entwicklungspuffer:** 10 mM TRIS, 100 mM Natriumchlorid

**Neufuchsinlösung:** 5 g Neufuchsin-Pulver in 100 ml 2 N Salzsäure

**Acetatpuffer 0,1 M:** 21 ml 0,1 N Essigsäure werden zu 79 ml 0,1 M Natriumacetat-trihydratlösung gegeben

**SSC-Stocklösung:** 0,3 M Natriumzitat, 3 M Natriumchlorid in destilliertem Wasser

**DAPI-Lösung:** 15 µg DAPI in 1:10 verdünnter SSC-Stocklösung

**Biotin-Blocking-Kit:** Fertige Lösung der Firma DakoCytomation

**Bovines Serumalbumin:** Sigma

**Eindeckmedium:** Immu Mount, Shandon und Vectarshield, Vector Laboratories

**Immersionsöl:** Leica

**Kammerobjektträger:** 8-well CultureSlide, BD Falcon

**Objektträger:** Super Frost oder Polysine, Menzel Gläser

### 2.1.5. Lösungen für die Durchflusszytometrie

**FACS-Puffer:** PBS ohne Ca/Mg, 2 % FCS, 2 mM EDTA, 0,1 % Natriumacid

**Saponin-Lösung:** PBS ohne Ca/Mg, 2 % FCS, 0,1 % oder 0,35 % Saponin

**Paraformaldehyd- (PFA) Lösung:** PBS ohne Ca/Mg, 1 % PFA

## 2.2. Zellen, Peptide, Antikörper und Gewebe

### 2.2.1 Zellen

**TyrF8:** Zytotoxischer T-Zellklon, der ein Peptid aus Tyrosinase restringiert auf HLA-A\*0201 erkennt. Herkunft ist Leiden.

**TIL-26 GG:** T-Zellklon, der aus Tumor infiltrierenden Lymphozyten eines Nierenzellkarzinoms isoliert wurde und spezifisch die autologe Tumorzelllinie RCC-26 erkennt. Herkunft ist das Institut für Molekulare Immunologie, GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München.

**JB4:** T-Zellklon, der das HLA-A2 Molekül als Alloantigen erkennt. Herkunft ist das Institut für Molekulare Immunologie, GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München.

**Mel 93.04 A12.1 IL2 (kurz Mel IL2):** Melanomzelllinie, die auf HLA-A\*0201 das Tyrosinase Peptid präsentiert und mit einem IL-2-Gen transfiziert ist. Herkunft ist Leiden, Niederlande.

**Mel A375:** HLA-A\*0201<sup>+</sup> Melanomzelllinie, die keine Tyrosinase exprimiert. Herkunft ist ATCC (CRL 1619).

**PBMC:** Periphere Bluteukozyten gesunder Spender. Granulozyten sind bedingt durch die Isolationsmethode nicht enthalten.

**B-LCL LAZ388:** EBV-transformierte B-Zelllinie, Herkunft ist Freiburg.

**RCC-26:** Nierenzellkarzinomlinie, die spezifisch von TIL-26 GG erkannt wird. Herkunft ist das Institut für Molekulare Immunologie, GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München.

## 2.2.2. Peptide

### Tyrosinase-Peptid: Aminosäuresequenz YMNGTMSQV

## 2.2.3. Antikörper

Primäre Antikörper sind in Tabelle 2.1 und sekundäre Antikörper sowie weitere sekundäre Reagenzien in Tabelle 2.2 dargestellt.

Spezifität	Spezies	Isotyp	Klon	Firma	Fixierung			Verdünnung (1:x)			Markierung
					A	PFA	Chl	IHC	IF	FC	
25F9	M	IgG1 $\kappa$	25F9	Dianova	ja		ja	50			keine
CD16	M	IgG1 $\kappa$	DJ 130c	DakoCytomation	ja		ja	400			keine
CD163	M	IgG1 $\kappa$	ber-MAC3	DakoCytomation	ja		ja	400			keine
CD3	M	IgG1 $\kappa$	UCHT1	DakoCytomation	ja		ja	1000			keine
CD3	M	IgG1 $\kappa$	UCHT1	Immunotech	ja		ja	20		10	Fitc
CD3	Rb		polyklonal	DakoCytomation	ja		ja	50	50		keine
CD31	M	IgG1 $\kappa$	JC/70A	DakoCytomation	ja		ja	300			keine
CD38	M		T16	Immunotech	ja			500	600		keine
CD3 $\zeta$	M	IgG1 $\kappa$	2H2D9	BD Pharmingen	ja		ja	500	800		keine
CD56	M	IgG1 $\kappa$	eric1	Novocastra	ja		ja	150			keine
CD68	M	IgG1 $\kappa$	KP1	DakoCytomation	ja		ja	50			Fitc
CD68	M	IgG1 $\kappa$	KP1	DakoCytomation	ja		ja	2000			keine
CD69	M	IgG1 $\kappa$	FN50	BD Pharmingen	ja			20	20		Fitc
CD8	M	IgG1 $\kappa$	C8/144B	DakoCytomation	ja		ja	500			keine
DC-Lamp	M	IgG1	104.G4	Immunotech	ja		ja	400	400		keine
DC-Sign	M	IgG2b $\kappa$	DCN46	BD Pharmingen	ja		nein	50	50		Fitc
IFN $\gamma$	M	IgG1	B27	BD Pharmingen		ja		100	200		keine
Ki67	M	IgG1 $\kappa$	MIB - 1	DakoCytomation	ja			400	400		keine
MRP 14	M	IgG1 $\kappa$	S 36.48	BMA Biomedical	ja		ja	300			keine
MRP 8	M	IgG1 $\kappa$	8-5C2	BMA Biomedical	ja		ja	500			keine
MRP 8/14	M	IgG1 $\kappa$	27 E 10	BMA Biomedical	ja		ja	200			keine
MRP14	M	IgG1 $\kappa$	Mac 387	DakoCytomation	ja		ja	400			keine
Perforin	M	IgG2b	$\delta$ G9	BD Pharmingen	ja	nein	ja	100	100	100	keine
Perforin	M	IgG2b	$\delta$ G9	BD Pharmingen						25	Fitc
Perforin	R	IgG2a	KM585 (P1-8)	Kamiya Biomedical Company	ja	nein				100	keine
Rantes	M	IgG2b	VL1	Med. Poliklinik Innenstadt, München	ja	ja		pur	pur	pur	keine
Rantes	M	IgG2b	VL2	Med. Poliklinik Innenstadt, München	ja	ja		pur	pur	pur	keine
TCR V $\beta$ 22	M	IgG1	IMMU 546	Immunotech	ja				200		Biotin
TCR $\gamma\delta$	M	IgG1	IMMU 510	Immunotech	ja		ja	40			keine
GMP17/TIA-1	M	IgG1	2G9	Immunotech	ja			400	300		keine

**Tabelle 2.1:** Primäre Antikörper, Abkürzungen: M = Maus, Rb = Kaninchen, R = Ratte, A = Aceton, PFA = Paraformaldehyd, Chl = Chloroform, IHC = Immunhistochemie, IF = Immunfluoreszenz, FC = Durchflusszytometrie. Falls keine Angabe über die entsprechende Fixierung gemacht wird, liegen hierzu keine Erfahrungswerte vor.

Spezies	anti	Spezies	Art	Markierung	Firma	Verdünnung
Kaninchen	anti	Maus	IgG		DakoCytomation	1:20
APAAP					DakoCytomation	1:40
Streptavidin				AP	NEN	1:100
Streptavidin				Cy5	Dianova	1:300
Streptavidin				Fitc	DakoCytomation	1:100
Esel	anti	Kaninchen	F (ab') <sub>2</sub> Fragment	Fitc	Dianova	1:40
Esel	anti	Kaninchen	F (ab') <sub>2</sub> Fragment	Cy5	Dianova	1:100
Ziege	anti	Maus	IgG			
Ziege	anti	Maus	IgG	Cy3	Dianova	1:800
Ziege	anti	Maus	F ab Fragment	Rhodamine Red X	Dianova	1:50
Ratte	anti	Maus	F (ab') <sub>2</sub> Fragment	Biotin	Dianova	1:300
Ratte	anti	Maus	F (ab') <sub>2</sub> Fragment	Fitc	Dianova	1:70
Ziege	anti	Maus	F ab Fragment	Cy5	Dianova	1:50
Ziege	anti	Ratte	F (ab') <sub>2</sub> Fragment	Fitc	Dianova	1:200
Maus	anti	FITC	IgG	HRP	DakoCytomation	1:25
Maus	anti	Ratte	F (ab') <sub>2</sub> Fragment	Fitc	Dianova	1:200

**Tabelle 2.2:** Sekundäre Antikörper

#### 2.2.4. Nierenzellkarzinome

Die Bezeichnungen und Eigenschaften der verwendeten Nierenzellkarzinomgewebe sind Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Bezeichnung	Patient: Jahrgang, Geschlecht	Tumor- größe	TMN-Status, Differenzierungs- grad, Stadium (nach UICC)	Histologie	Besonderheiten
S58T	1943, M	5 cm	T1 N0 M0, G0, I		
S60T	1932, M	4 cm	T1 N0 M0, G1, I		
S66T	1920, M	4 cm	T1 N0 M0, G2, I		
S67T	1942, M	4 cm	T1 N0 M0, G2, I	klarzellig	Rezidiv
S71T	1964, M		T4 N2 M0, G2, IV	klarzellig	
S72T	1937, M	6 cm	T1 N0 M1, G2, IV		ossäre Metastase
RCC T1	1926, M	7,5 cm	T3 Nx M0, G2, III	klarzellig	
RCC T2	1931, W		T1 N1 Mx, G1, III	chromophil	papilläres Wachstum
RCC T3	1946, M		T4 N0 M0, G3, IV	klarzellig	sarkomatoides Wachstum
RCC T4	1920, W	7,8 cm	T3 N2 M0, G2, IV	klarzellig	
RCC T5	1921, W		T1 N0 M1, G3, IV	klarzellig	
RCC T7	1934, M	7,8 cm	T3 N0 M1, G2, IV	klarzellig	pulmonale Metastasen
RCC T8	1919, W		T1 N0 M0, G2, I	klarzellig	
RCC T10	1928, M		T3 N0 M1, G2, IV	klarzellig	Gehirnmetastasen
RCC T11	1934, W		T3 N0 M0, G2, III	klarzellig	
RCC T12	1934, M		T1 N0 Mx, G2, I	klarzellig	gleichzeitig Prostata-CA
RCC T13	1926, W		T3 N0 M0, G2, III	klarzellig	
RCC T16	1933, W		T1 Nx Mx, G2, I	klarzellig	
RCC IMa	1931, W		T3a N0 M0, G3, III	klarzellig	
RCC MKo	1940, M		T3b N0 M0, G3, III	klarzellig	

**Tabelle 2.3:** Bezeichnungen und Eigenschaften der verwendeten Nierenzellkarzinome

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze in der Zellkultur wurden entsprechende Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank durchgeführt.

##### **3.1.1. Bestimmung der Zellzahl**

Aus einer Zellsuspension wurde ein Volumen von 20 µl entnommen, mit Trypanblau in einem definierten Verhältnis gemischt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Die nicht gefärbten lebenden Zellen wurden in allen vier Großquadranten ausgezählt und die mittlere Zellzahl je Großquadrant wurde bestimmt. Zur Berechnung der Zellzahl in der Zellsuspension wurde folgende Formel verwendet: *Zellzahl/ml = mittlere Zellzahl im Großquadrat x Verdünnungsfaktor mit Trypanblau x 10<sup>4</sup>*

##### **3.1.2. Isolierung peripherer Blutlymphozyten und Monozyten**

Aus heparinisiertem Vollblut wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation steril isoliert. Dazu wurde das Vollblut mit RPMI 1640 im Verhältnis 1:2 verdünnt und in bereits 15 ml Ficoll enthaltende 50 ml Röhrchen gegeben; hierbei sollte das Blut-Mediumgemisch das Ficoll überschichten. Anschließend wurden die Röhrchen für 25 Minuten bei 840 g ohne zugeschaltete Bremse zentrifugiert. Das Sediment nach der Zentrifugation bestand aus Erythrozyten und Granulozyten. Die PBMC befanden sich in der Interphase zwischen Ficoll und Blutplasma. Durch Abnehmen des Interphaseringes konnten die PBMC gewonnen werden; diese wurden bei 760 g 12 Minuten lang abzentrifugiert und das Sediment in RPMI 1640 resuspendiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit RPMI 1640; hierbei wurde für jeweils 10 Minuten bei 540 g zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in RPMI 1640 aufgenommen und es wurde die Zellzahl bestimmt.

##### **3.1.3. Auftauen von Zellen**

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden möglichst schnell nach Entnahme in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und unmittelbar danach in 1 ml FCS aufgenommen. Nach sofortiger Zentrifugation bei 540 g für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen im gewünschten Medium aufgenommen.

#### **3.1.4. Einfrieren von Zellen**

Zellen benötigen ein Gefrierschutzmittel für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff, damit das intrazelluläre Wasser keine Eiskristalle bilden kann und die Zellen nicht aufplatzen. Als Gefrierschutzmittel wurde 20 % Dimethylsulfoxyd (DMSO) in RPMI 1640 verwendet, welches im Verhältnis 1:1 mit FCS gemischt wurde. Da DMSO bei Raumtemperatur toxisch für die Zellen ist, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden sedimentiert und in kaltem FCS resuspendiert; der Suspension wurde tropfenweise das gleiche Volumen an 20 % DMSO in RPMI 1640 zugegeben. Diese Suspension wurde in 1 ml-Einheiten in 1,8 ml Einfrierröhrchen überführt; diese wurden, um zu schnelles Abkühlen zu verhindern, in Zellstoff eingewickelt und zunächst für einige Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert, bevor sie für die Langzeitlagerung in einem Tank mit flüssigem Stickstoff deponiert wurden.

#### **3.1.5. Bestrahlung von Zellen**

Zellen wurden in einer Bestrahlungsanlage mit einer Cäsiumquelle bestrahlt, um deren Proliferation zu unterbinden. Die Bestrahlung erfolgte je nach Zelle mit unterschiedlicher Intensität. Mel IL2 bei wurden mit 10 Gy, RCC-26 mit 10 Gy, PBMC mit 5 Gy und B-LCL LAZ388 mit 15 Gy bestrahlt.

#### **3.1.6. Kultivierung adhärent wachsender Tumorzellen**

Hierzu gehören Mel IL2, Mel A375 und RCC-26. Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen unterschiedlicher Größe und stets in RCC-Medium. Da adhärent wachsende Zellen in einer Schicht auf einem speziell behandelten Plastikboden von Kulturgefäßen wachsen und diese Adhärenz für die Vitalität der Zellen erforderlich ist, müssen diese Zellen bei zu dichtem Wachstum auf neue Kulturflaschen verteilt werden. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 x Trypsin/EDTA in PBS versetzt. Es folgte eine Inkubation von 5 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$ ; dadurch lösten sich die Zellen von der Plastikoberfläche und konnten in Kulturmedium resuspendiert werden. Die somit erhaltene Zellsuspension wurde ohne weitere Zentrifugation auf die gewünschte Menge an Kulturflaschen aufgeteilt und weiter kultiviert.

### 3.1.7. Kultivierung von EBV-transformierten B-Zelllinien

Lymphoblastoide B-Zelllinien (B-LCL) sind humane B-Zellen, die durch Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisiert wurden und somit in Kultur wachsen können. Als Kulturmedium wurde B-LCL-Medium verwendet und verbrauchtes Medium wurde in regelmäßigen Abständen durch Frisches ersetzt. Bei zu dichtem Zellwachstum wurden die Zellen auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt.

### 3.1.8. Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen

Die zytotoxischen T-Zellklone wurden in 24-Lochplatten in 1,5 ml T-Zell-Medium je Loch kultiviert. Nach jedem dritten Tag wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch Frisches ersetzt, ohne dabei die am Boden befindlichen Zellen aufzuwirbeln. Alle 14 Tage wurden die T-Zellklone mit Antigen tragenden Stimulatorzellen und so genannten "Feederzellen" restimuliert. Bei den "Feederzellen" handelte es sich um PBMC und B-LCL LAZ388, die alle bestrahlt wurden. Die jeweiligen Zelltypen wurden den T-Zellen ( $6 \times 10^5$ ) in folgendem Verhältnis zugegeben:  $6 \times 10^4$  Antigen tragende Stimulatorzellen,  $1,5 \times 10^6$  PBMC,  $1 \times 10^5$  B-LCL LAZ388.

### 3.1.9. CFDA SE Markierung von Tumorzellen

Es wurde nach Herstellerangaben eine 10 mM CFDA SE (CFSE) Stocklösung in DMSO angesetzt und diese in 5 µl Einheiten in Eppendorf Röhrchen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Färbung wurde diese Stocklösung im Verhältnis 1:3000 in PBS (ohne Ca/Mg) verdünnt. 6 ml der verdünnten Lösung wurden im Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt. Das Zellkulturmedium in der Kulturflasche wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 6 ml der vorgewärmten CFSE-Lösung zugegeben und die Kulturflasche wurde für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert; die Lösung wurde daraufhin abgesaugt, es wurden 10 ml vorgewärmtes RCC-Medium zugegeben und für weitere 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Bevor die Zellen wieder zurück in Kultur kamen, wurde noch zweimal mit PBS gewaschen. Da bei schnellem Zellwachstum der Tumorzellen eine Abschwächung des CFSE-Signals zu erwarten ist, wurden die Zellen spätestens 24 Stunden nach Markierung für das entsprechende Experiment verwendet.

### **3.1.10. Stimulation des T-Zellklons TyrF8 mit Zielzellen – Ansatz zur durchflusszytometrischen Analyse**

Die Zielzellen wurden bereits am Vorabend in der Kulturflasche mit CFSE markiert und nach dem Ernten in T-Zell-Medium ohne IL-2 resuspendiert, gezählt und möglichst ohne weitere Zentrifugation auf 50.000 Zellen/50 µl eingestellt. Anschließend wurde TyrYMN-Peptidlösung in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben und die Zellen wurden für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, danach abzentrifugiert und im selben Volumen wieder aufgenommen. Die gleiche Anzahl an Zellen des zytotoxischen T-Zellklons TyrF8 wurde ebenfalls auf 50.000 Zellen/50 µl eingestellt und durch auf- und abpipettieren mit der Suspension aus Zielzellen vermischt. Die Zellen wurden daraufhin in je 100 µl Einheiten auf große FACS-Röhrchen verteilt. Die Ansätze wurden in den Brutschrank gestellt und zum entsprechenden Zeitpunkt entnommen; es wurde daraufhin 500 µl FACS-Puffer (mit 0,1% NaN<sub>3</sub> und 2 mM EDTA) zugegeben und der Ansatz zur Färbung und späteren Analyse in kleine FACS-Röhrchen überführt. Da die durch Stimulation entstehenden Reaktionen der T-Zellen mit den Tumorzellen teils sehr schnell und mit Nachdruck stattfinden, wurde für die Messung von 0-Stunden-Werten unmittelbar nach Zusammenmischen der T-Zellen mit ihrer Zielzelle, eiskalter FACS-Puffer zugegeben und die Zellen in vorgekühlter Zentrifuge sofort abzentrifugiert, sowie unmittelbar danach auf Eis oder im Kühlschrank in 1 % PFA-Lösung fixiert.

## **3.2. Immunhistologische und immunzytologische Färbung**

### **3.2.1. Präparation von Gewebe für die immunhistologische Färbung**

Tumorgewebe, Normalnierengewebe, Tonsille und Milz wurden direkt nach der Entnahme, in Alufolie gewickelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Am Mikrotom wurden bei einer Objektträgertemperatur von -16°C und einer Kammertemperatur von -21°C 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Diese trockneten über Nacht bei Raumtemperatur und konnten anschließend im Gefrierschrank bei -80°C für längere Zeit aufbewahrt werden. Vor der Färbung wurden diese nach Entnahme aus dem Gefrierschrank für 2 Stunden wiederum bei Raumtemperatur getrocknet.

### **3.2.2. Präparation von Zellen für die immunzytologische Färbung**

Die Zellen wurden geerntet und auf eine Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Objektträger wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet, damit die Zellen

später auf ihnen haften bleiben. Hierzu wurde die Poly-L-Lysin-Lösung (2 µg/ml) aufgetragen und nach 20 Minuten mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die Objektträger wurden daraufhin 15 Minuten lang bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend mit TBS-Puffer bedeckt. Dieser wurde nach 5 Minuten abgesaugt und die Zellsuspension wurde aufgetragen. Nach 20 Minuten hafteten die Zellen für die anschließende Fixierung und Färbung ausreichend gut.

### **3.2.3. Präparation von Zellkonjugaten aus zytotoxischen T-Zellklonen und Zielzellen für die immunzytologische Färbung**

Als Zellkonjugat wird die Formation bezeichnet, die durch Aneinanderbindung zweier Zellen zustande kommt. Im Folgenden sollten möglichst stabile Zellkonjugate aus T-Zellen und deren Zielzellen gebildet werden, die anschließend einer immunzytologischen Färbung zugänglich sind. Der Ansatz fand auf Kammer-Objektträgern statt, da die Zellen hier in relativ großem Volumen unter sterilen Bedingungen inkubiert werden können. Die Objektträger wurden pro Loch mit 50 µl Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet, die nach 20 Minuten durch mehrmaliges waschen mit destilliertem Wasser entfernt wurde. Anschließend wurden die Objektträger für 15 Minuten luftgetrocknet, bevor sie mit 50 µl PBS/Loch überschichtet wurden. Für jedes Loch wurden 10.000 TyrF8 (T-Zellen) mit 2.500 Mel IL-2 (Tumorzellen) in je 30 µl T-Zell-Medium (hier mit nur 10 U rIL-2/ml) zu 60 µl vereinigt. Zur Bildung der Zellkonjugate wurde die gesamte Suspension vor dem Auftragen auf die Objektträger in 10 ml Rundboden-Röhrchen vereinigt und für 5 Minuten bei 244 g zentrifugiert. Die sich hierbei am Boden des Röhrchens bildenden Zellkonjugate wurden durch vorsichtiges Aufschütteln wieder in Suspension gebracht. Daraufhin wurde das PBS auf dem Kammer-Objektträger abgesaugt und pro Kammer 60 µl der Suspension aus Zellkonjugaten aufgetragen. Die Objektträger wurden daraufhin in den Brutschrank gestellt und zum gewünschten Zeitpunkt entnommen. Nach Entfernung des Kammeraufbaus waren die Objektträger zur anschließenden Fixierung und Färbung bereit.

### **3.2.4. Immunhistochemische und immunzytochemische Färbung mit der APAAP-Methode**

Antigene – im Gewebe oder auf Zellen – können spezifisch durch die chemische Farbreaktion eines an entsprechende Antikörper gekoppelten Enzyms identifiziert werden. Die Färbung von Gewebe (Immunhistochemie) unterscheidet sich im methodologischen Ablauf hierbei nicht von der Färbung von Zellen (Immunzytochemie). In einem ersten Schritt wurden Gewebe oder Zellen für 10

Minuten in 100 % Aceton fixiert; alternativ konnte die Fixierung auch in 4 % PFA in PBS durchgeführt werden. Eine zusätzliche Fixierung in 100 % Chloroform kann fakultativ durchgeführt werden, ist aber zum Nachweis bestimmter Antigene (beispielsweise DC-Sign) ungeeignet. Unmittelbar nach der Fixierung wurde für 5 Minuten TBS-Puffer aufgetragen, dieser wurde abgesaugt und das Gewebe oder die Zellen wurden 30 Minuten lang mit 2 % BSA in TBS inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Nach Absaugen der BSA-Lösung erfolgte eine Stunde lang die Inkubation mit dem unkonjugierten Primärantikörper. Hierbei handelte es sich um einen Antikörper aus der Maus, der spezifisch an das gewünschte Antigen bindet. Dieser wurde vorangehend in einer Lösung aus 12 % Humanserum in TBS verdünnt. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Lösung mit dem Primärantikörper abgesaugt und mehrmals mit TBS-Puffer gewaschen. Der Sekundärantikörper stammt aus dem Kaninchen und bindet an den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers aus der Maus. Nach 30 Minuten Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde wiederum mehrmals gewaschen und das APAAP-Reagenz aufgetragen. Dieses enthält das Enzym Alkalische Phosphatase und einen spezifisch an dieses Enzym bindenden Antikörper, der wie bereits der Primärantikörper aus der Maus stammt und dessen F<sub>c</sub>-Teil vom Sekundärantikörper gebunden wird; somit entsteht eine Verbindung des Antigens mit allen drei Antikörpern und dem Enzym (Abbildung 3.1). Die Inkubation mit Sekundärantikörper und APAAP-Reagenz wurde anschließend für jeweils 15 Minuten wiederholt.

Nach mehrmaligem Waschen wurden die Objektträger für 20 Minuten in eine Küvette mit der Farbentwicklerlösung überführt. Diese besteht aus drei Lösungen und wurde wie folgt angesetzt:

Lösung A: In einem Becherglas werden 25 ml AP-Puffer, 70 ml Entwicklungspuffer und 70 mg Levamisol gemischt

Lösung B: In einem Eppendorf-Röhrchen werden 600 µl Dimethylformamid mit 50 mg Naphtol AS-BI-Phosphat gemischt

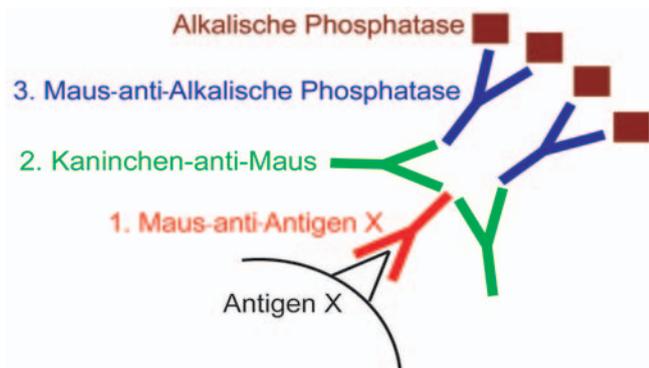
Lösung C: In einem Eppendorf-Röhrchen werden 500 µl destilliertes Wasser mit 40 mg Natriumnitrit und 200 µl der Neufuchsin-Stammlösung gemischt

Anschließend wird die Lösung C in die Lösung A pipettiert und danach die Lösung B zugegeben.

Nach Entnahme aus der Entwicklerlösung wurden die Objektträger in destilliertem Wasser gewaschen, zur Gegenfärbung des Gewebes kurz in Hämalaun getaucht, anschließend für einige Minuten mit Leitungswasser gewaschen und mit Immumount-Medium eingedeckt.

### Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der APAAP-Methode

Der Primärantikörper aus der Maus (rot) bindet an das gewünschte Antigen „X“ (schwarzes Dreieck). Der gegen Maus-Immunglobuline gerichtete Sekundärantikörper aus dem Kaninchen (grün) bindet an den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers. Der aus der Maus stammende Tertiärantikörper (blau) bindet spezifisch an das Enzym Alkalische Phosphatase (braun) und wird gleichzeitig an seinem F<sub>c</sub>-Teil durch den Sekundärantikörper gebunden.



### 3.2.5. Immunhistochemische Doppelfärbung

Bei der immunhistochemischen Doppelfärbung wurden in einem Präparat zwei Strukturen mit verschiedenen Primärantikörpern, zwei enzymatischen Detektionssystemen und somit unterschiedlichen Farben dargestellt. Die Vorbereitung der Präparate erfolgte in gleicher Weise, wie bereits für die immunhistochemische Einzelfärbung beschrieben. Nach Abwaschen des ersten Primärantikörpers aus der Maus wurde mit einem anti-Maus-Antikörper inkubiert, an den das Enzym Alkalische Phosphatase gebunden war. In einem dritten Schritt wurde der zweite Primärantikörper zugegeben, an den das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (Fitc) gebunden war. Da Fitc selbst ein Antigen darstellt, konnte in einem vierten Schritt ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter anti-Fitc-Antikörper zugegeben werden, der den Fitc-konjugierten zweiten Primärantikörper erkannte. Anschließend wurden in zwei Entwicklungsschritten erst die Alkalische Phosphatase durch eine blaue Farbreaktion mit dem Fast Blue Reagenz detektiert und danach die Meerrettichperoxidase durch das AEC-Reagenz, welches zu einer braun-rötlichen Farbreaktion führte.

Herstellung des Fast Blue Reagenz: 20 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat wurden mit 2 ml Dimethylformamid in 98 ml TBS-Puffer gelöst. Direkt vor dem Gebrauch wurden zu 5 ml dieser Lösung 1 mg Fast Blue BB-Salz und 10 mg Levamisol gegeben und die Lösung wurde filtriert. Die Präparate wurden 2 Minuten mit dieser Lösung inkubiert.

Herstellung des AEC-Reagenz: 4 mg Amino-Ethylcarbazol wurden mit 1 ml Dimethylformamid in 14 ml 0,1 M Acetatpuffer gelöst. Die Lösung wurde filtriert und unmittelbar vor Gebrauch wurden 15 µl Perhydrol-Lösung zugegeben. Die Präparate wurden 5 Minuten mit dieser Lösung inkubiert.

### 3.2.6. Immunfluoreszenz

Alternativ zur Immunhistochemie oder Immunzytochemie können Antigene im Gewebe oder auf Zellen auch durch Antikörper erkannt werden, an die ein Fluorochrom gebunden ist. Hierbei handelt es sich um ein Molekül, welches während der Beleuchtung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in einer charakteristischen Wellenlänge leuchtet. Durch Verwendung von Fluorochromen, die in verschiedenen Farben leuchten, können aussagekräftige Mehrfachfärbungen erzielt werden. Bis zur Inkubation des Primärantikörpers, wurden die Objektträger mit dem Gewebe oder den Zellen in gleicher Weise wie bereits im Abschnitt 3.2.4 beschrieben, vorbereitet. Daraufhin wurden zwei unkonjugierte Primärantikörper, die aus unterschiedlichen Spezies stammten, in TBS mit 12 % Humanserum verdünnt und die Gewebeschnitte oder Zellen eine Stunde damit inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden mit Fluorochromen konjugierte Sekundärantikörper gegen die entsprechenden Spezies der Primärantikörper aufgetragen und ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gewebe oder Zellen 10 Minuten lang mit 4 % PFA in PBS fixiert, danach mit TBS gewaschen und mit Vectarshield Eindeckmedium eingedeckt.

Es bestand weiterhin die Möglichkeit des Einsatzes von Sekundärantikörpern, die mit Biotin konjugiert waren; nach Inkubation mit diesen wurde in einem dritten Schritt 30 Minuten lang mit Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin inkubiert. Hier galt es zu beachten, vor Inkubation mit Antikörpern endogen exprimiertes Biotin zu blockieren. Hierzu wurde, unmittelbar nach Applikation der BSA-Lösung, ein als Biotin-Blocking-Kit bezeichnetes System der Firma DakoCytomation gemäß den Herstellerangaben verwendet.

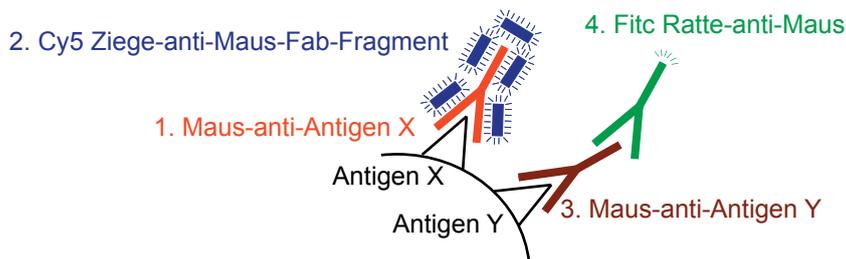
Zellkerne konnten bei Bedarf durch das den Kern färbende Fluorochrom DAPI markiert werden. Hierzu wurden die Objektträger nach der Färbung und zweiten Fixierung eine Minute lang in eine Küvette mit DAPI-Lösung gestellt und danach mit destilliertem Wasser gewaschen.

Einen Sonderfall stellte die Doppelfärbung mit zwei Primärantikörpern aus der Maus dar (Abbildung 3.2). Der Primärantikörper gegen das erste Antigen ("X") wurde eine Stunde lang inkubiert. Nach gründlichem Waschen folgte eine Stunde lang die Inkubation mit einem anti-Maus-Sekundärantikörper aus der Ziege, der nur aus einem Fab-Fragment bestand, welches die Eigenschaften hat, alle Bindungsstellen des ersten Primärantikörpers vollständig abzusättigen. Nach weiteren Waschschritten wurde wiederum eine Stunde mit dem Primärantikörper gegen das zweite Antigen ("Y") inkubiert. Der anschließend für eine Stunde eingesetzte zweite anti-Maus-Sekundärantikörper aus der Ratte konnte nur an den zweiten Primärantikörper aus der Maus binden, da der erste Primärantikörper aus der Maus bereits durch das Fab-Fragment abgesättigt war.

Nachfolgend sind drei Beispiele von in der vorliegenden Arbeit verwendeten

Doppelimmunfluoreszenz-Färbeprotokollen aufgelistet, wobei "X" und "Y" für zwei unterschiedliche antigene Strukturen auf humanen Zellen stehen.

- |             |  |
|-------------|--|
| Protokoll A | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Maus-anti-Humanes X<br/>Kaninchen-anti-Humanes Y</li> <li>2. Ziege-anti-Maus Cy3<br/>Esel-anti-Kaninchen-Fitc</li> </ol>                                 |
| Protokoll B | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Maus-anti-Humanes X<br/>Kaninchen-anti-Humanes Y</li> <li>2. Ratte-anti-Maus-Biotin<br/>Esel-anti-Kaninchen Cy5</li> <li>3. Streptavidin-Fitc</li> </ol> |
| Protokoll C | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Maus-anti-Humanes X</li> <li>2. Ziege-Fab-Fragment-anti-Maus Cy5</li> <li>3. Maus-anti-Humanes Y</li> <li>4. Ratte-anti-Maus-Fitc</li> </ol>             |



**Abbildung 3.2: Darstellung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Fab-Fragmenten**

Der erste Primärantikörper aus der Maus (rot) bindet an das Antigen „X“. Anschließend wird der mit Cy5 konjugierte Sekundärantikörper (blau) zugegeben; dieser besteht nur aus Fab-Fragment und sättigt alle Bindungsstellen des ersten Primärantikörpers ab. Daraufhin wird der zweite Primärantikörper (braun) zugegeben, der an das Antigen „Y“ bindet. Der zweite gegen Maus gerichtete Sekundärantikörper (grün) kann nur an den zweiten Primärantikörper binden, da alle Bindungsstellen auf dem ersten Primärantikörper durch das Fab-Fragment blockiert sind.

### 3.2.7. Lichtmikroskopie

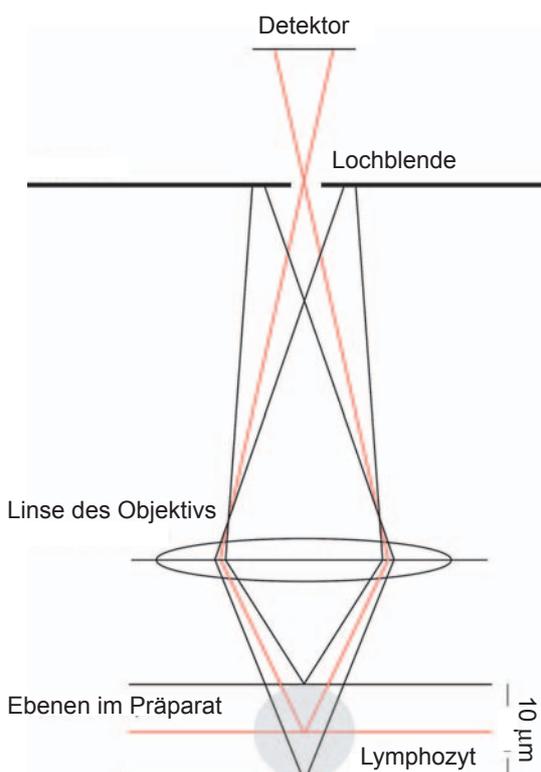
Immunhistochemische und immunzytochemische Aufnahmen wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Die Auszählung von Zellen wurde an einem Leica DMLS Mikroskop unter Verwendung eines 40-fach vergrößernden Objektivs der numerischen Apertur 0,65 vorgenommen. Digitalisierte Aufnahmen wurden an einem

Zeiss Axioskop Mikroskop mittels einer Digitalkamera unter optimaler Ausleuchtung des Präparates nach Köhler erstellt.

### 3.2.8. Konfokale Lasermikroskopie

Die an die Antikörper gebundenen Fluorochrome werden im konfokalen Mikroskop durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt und emittieren dadurch wiederum Licht in einem für jedes Fluorochrom charakteristischen Spektrum. Durch Anregung verschiedener Fluorochrome mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge leuchten diese folglich in verschiedenen Farben. Die emittierten Farben werden in digitale Signale umgewandelt und somit kann ein Bild mit der genauen Lokalisation der einzelnen Antigene errechnet werden, selbst wenn diese unmittelbar nebeneinander liegen.

"Konfokal" bedeutet, dass nur emittiertes Licht aus einer einzelnen Ebene der Zelle oder des Gewebes erfasst wird. Beispielsweise können Strukturen in einem 10  $\mu\text{m}$  "hohen" Lymphozyten ausschließlich auf der Höhe "5  $\mu\text{m}$ " dargestellt werden; die weiter unten oder weiter oben gelegenen Strukturen werden ausgeblendet. Dies wird durch die Lochblende erreicht, die am Ende des optischen Systems Lichtstrahlen abfängt, die nicht aus der gewünschten Ebene stammen (Abbildung 3.3). Zur Darstellung der genauen Lokalisation intrazellulärer Strukturen in allen drei Dimensionen ist die konfokale Mikroskopie somit die geeignete Methode.



**Abbildung 3.3: Funktion der Lochblende im konfokalen Mikroskop**

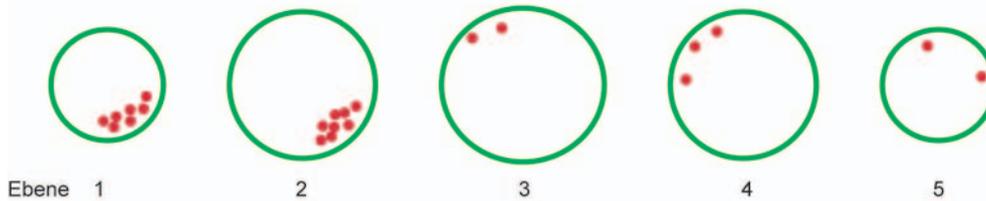
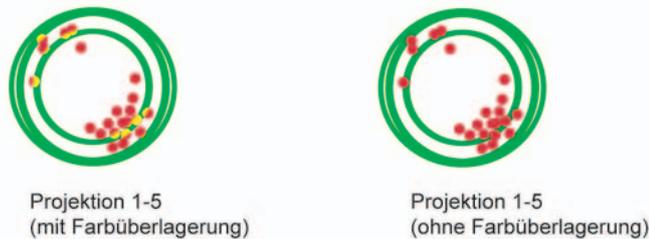
Die Emission von Lichtstrahlen aus unterschiedlichen Ebenen eines Objektes (Lymphozyt) ist beispielhaft und schematisch dargestellt. Auch im konfokalen Mikroskop werden alle Bereiche und Ebenen des Objekts beleuchtet und emittieren somit Licht. Erst die am Ende des optischen Systems befindliche Lochblende fängt Lichtstrahlen ab (schwarz dargestellte Strahlengänge), die aus unerwünschten Ebenen (schwarz) stammen. Nur die aus der interessierenden Ebene (rot) stammenden Lichtstrahlen (rot dargestellte Strahlengänge) gelangen durch die Lochblende hindurch zum Detektor.

### 3.2.9. Digitale Bildbearbeitung

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Darstellung von mittels konfokaler Mikroskopie erstelltem Bildmaterial (Abbildung 3.4). Zur Erfassung der räumlichen Verteilung von Strukturen (in Abbildung 3.4 "rote Punkte") innerhalb einer Zelle wurden Bilder von fünf bis zwölf unterschiedlichen Ebenen aufgenommen. Diese können entweder nebeneinander aufgereiht (Galeriedarstellung, Abbildung 3.4 A) oder durch eine digitale Projektion auf ein einzelnes Bild (Projektionsdarstellung, Abbildung 3.4 B) dargestellt werden. Die Projektionsdarstellung ist kompakter und das Verteilungsmuster der intrazellulären Strukturen kann durch den Betrachter schnell erfasst werden; dies gilt insbesondere, wenn größere Mengen von Schnittebenen angefertigt wurden. Durch die Projektion aller Ebenen auf ein einzelnes Bild ist die räumliche Zuordnung einer Struktur allerdings nicht mehr möglich. Diese vereinfachte Darstellungsform verbietet sich deshalb bei Fragestellungen nach der genauen Lokalisation von Strukturen. Insbesondere zum Nachweis von Co-Lokalisation (zwei Strukturen befinden sich am selben Ort) muss die Galeriedarstellung oder die Abbildung einer relevanten Einzelebene gewählt werden.

Signale einzelner Wellenlängenbereiche (z.B. Fitc, Cy3 oder Cy5) können in der digitalen Fluoreszenzmikroskopie durch unterschiedliche Farben dargestellt werden, die durch den Anwender definiert sind (z.B. Fitc durch die Farbe grün). Wenn zwei Strukturen, die durch unterschiedliche Fluorochrome angefärbt wurden, räumlich eng beieinander liegen, kommt es zur Überlagerung von Farbsignalen, die durch eine Mischfarbe dargestellt wird. Grüne und rote Strukturen stellen sich beispielsweise gelb dar.

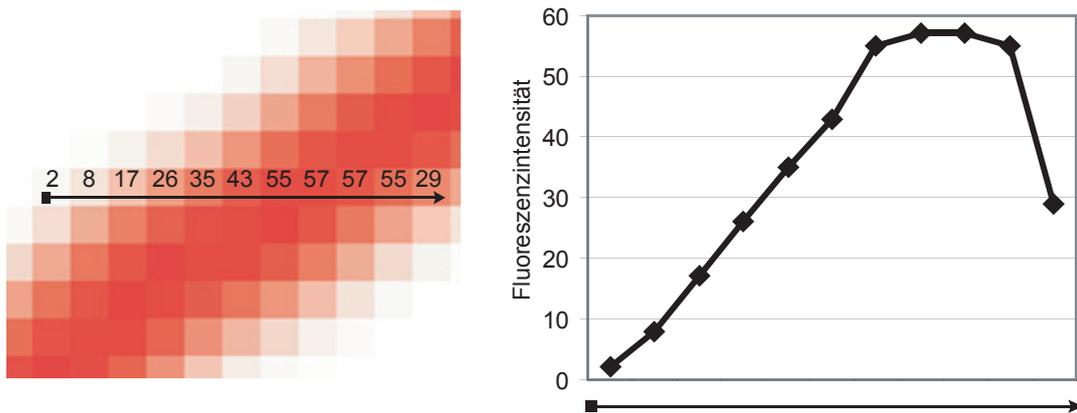
Im Falle der Projektionsdarstellung von Schnittebenen kann es auch dann zu Farbüberlagerungen kommen, wenn zwei Strukturen nicht am selben Ort, sondern vor- oder hintereinander liegen. (Abbildung 3.4 B links). Die resultierende Mischfarbe, die in diesem Fall eine in Wirklichkeit nicht vorhandene Co-Lokalisation suggeriert, kann durch die deckende Darstellung eines Farbsignals vermieden werden (in Abbildung 3.4 B ist rechts "rot" gegenüber "grün" deckend dargestellt).

**A** Galeriedarstellung der Schnittebenen**B** Projektionsdarstellung der Schnittebenen**Abbildung 3.4: Darstellung von Bildmaterial räumlicher Strukturen**

Gezeigt ist eine schematische Darstellung von Schnitten durch fünf verschiedene Ebenen einer Zelle. Die Plasmamembran ist grün und ein intrazelluläres Protein ist in Form von roten Punkten dargestellt; an keiner Stelle kommt es zur Überlappung des intrazellulären Proteins mit der Plasmamembran. **A:** In der Galeriedarstellung sind die fünf Schnittebenen einzeln nebeneinander abgebildet. **B:** In der Projektionsdarstellung sind alle fünf Schnittebenen übereinander projiziert und es kommt zur scheinbaren Überlappung von roten und grünen Strukturen, die sich daraufhin gelb darstellen (links). Zur Vermeidung dieses Darstellungsfehlers – aus der Galeriedarstellung ist ja bekannt, dass keine Überlagerung vorkommt – können die roten Strukturen gegenüber den grünen Strukturen deckend dargestellt werden (rechts).

**3.2.10. Erstellung von Fluoreszenzintensitätsprofilen**

Durch digitale Berechnung kann die Intensität der Fluoreszenz an einer definierten Stelle des Präparats bestimmt werden (beispielhaft dargestellt in Abbildung 3.5 linke Seite). Dieser Stelle wird dabei eine Einheit zugewiesen, die in linearer Weise die relative Fluoreszenzintensität angibt. Soll diese an verschiedenen Stellen auf mehreren Punkten entlang einer Linie bestimmt werden, können die einzelnen Werte anschließend in einem Diagramm als Fluoreszenzintensitätsprofil dargestellt werden (Abbildung 3.5 rechte Seite). Durch diese Darstellungsform können auch Intensitätsprofile verschiedener Farbkanäle entlang derselben Linie verglichen werden. Die Anordnung der Fluoreszenzintensitätsprofile beider Farbkanäle gibt Auskunft über die Lokalisation der beiden unterschiedlich gefärbten Strukturen zueinander (siehe auch Ergebnisteil Abschnitt 4.3.1.4).



**Abbildung 3.5: Fluoreszenzintensitätsprofil**

Schematische Darstellung von verschiedenen Intensitäten der Farbe Rot. Die Farbintensität für jedes einzelne Quadrat entlang der dargestellten Linie ist numerisch zugeordnet und rechts durch einen Graphen dargestellt. In der Abszisse sind die Lokalisationen der entlang des Pfeiles (■→) zu bestimmenden Farbpunkte aufgetragen, während sich in der Ordinate die zugehörigen Werte der Farbintensität befinden.

### 3.3. Durchflusszytometrie

#### 3.3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. "*flow cytometry*" oder „*fluorescence activated cell sorting*, FACS“) bietet die Möglichkeit, Oberflächenantigene oder auch intrazellulär gelegene Strukturen von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Dabei werden die Zellen mit Antikörpern, die mit Fluorochromen konjugiert und gegen das entsprechende Antigen gerichtet sind, markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl geführt. Abhängig von der Zellgröße und der Menge an intrazellulären granulären Bestandteilen kommt es hierbei zu einer Lichtstreuung in unterschiedliche Richtungen, die von Detektoren erfasst wird. Das Licht, welches in der Verlaufsrichtung des Laserstrahls streut, wird als Vorwärtsstreulicht (englisch "*forward scatter*", deshalb FSC abgekürzt) bezeichnet und wird durch die Größe der beleuchteten Zelle bestimmt. Das seitlich abgelenkte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (englisch "*side scatter*", deshalb SSC abgekürzt) bezeichnet und ergibt sich aus der intrazellulären Granularität der Zelle. Bereits anhand dieser Eigenschaften können Populationen verschiedener Zellen im FACS voneinander unterschieden werden. Der Laserstrahl regt das auf der Zelle befindliche Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge an und dieses leuchtet in einem

charakteristisches Spektrum. Da verschiedene Fluorochrome in unterschiedlichen Farben leuchten, kann eine Zelle mit verschiedenen Fluorochromen markiert sein, die von unterschiedlichen Detektoren des FACS-Gerätes erkannt werden. Die Intensität des gemessenen Lichts ist dabei proportional zur Anzahl der je Zelle gebundenen Antikörper und somit zur Anzahl der markierten Antigene.

### **3.3.2. Färbung von Antigenen auf der Oberfläche der Zelle**

Zur FACS-Analyse wurden 50.000 bis 200.000 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert und im Überstand (ca. 50 µl) resuspendiert. Daraufhin wurden bis zu vier verschiedene Antikörper in vorher ausgetesteter Konzentration zugegeben und für 15 Minuten bei Dunkelheit auf Eis inkubiert, anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 1 % PFA in PBS fixiert, so dass sie bis zur Analyse aufbewahrt werden konnten. Bei der Durchführung von Stimulationsexperimenten mit T-Zellen und Zielzellen mit anschließender FACS-Analyse wurden die Zellen bereits vor Durchführung der CCL5-Oberflächenfärbung 20 Minuten lang in 1 % PFA fixiert. Zur Färbung von Oberflächenstrukturen bestand weiterhin die Möglichkeit der Verwendung von unmarkierten Primärantikörpern. Nach Inkubation mit diesen, wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen und es wurde ein fluoreszenzmarkierter oder biotinylierter Antikörper zugegeben, der gegen den unmarkierten Primärantikörper gerichtet war. Biotinylierte Sekundärantikörper mussten nach wiederholtem Waschen in einem dritten Inkubationsschritt durch Fluoreszenz-markiertes Streptavidin abgegriffen werden.

### **3.3.3. Färbung von Antigenen im Zellinneren**

Während der Inkubation von Zellen mit Antikörpern zur FACS-Analyse können diese nur an oberflächliche und nicht an intrazelluläre Strukturen der Zelle binden, da die Plasmamembran eine Barriere für die Antikörper darstellt. Zur Färbung von intrazellulären Strukturen muss die Plasmamembran durch Detergenzien porös und somit für Antikörper permeabel gemacht werden. Hierzu wurden die Zellen zuerst in 1 % PFA fixiert und daraufhin mehrmals gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in zwei Schritten in Saponin-Lösungen aufsteigender Konzentration (erst 0,1 % Saponin in PBS, dann 0,35 % Saponin in PBS) gewaschen und daraufhin die entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Antikörper zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation wurde zweimal mit Saponin-Lösung gewaschen und die Zellen wurden in dieser Lösung im Durchflusszytometer analysiert.

Wie zur Färbung von Oberflächenstrukturen, bestand auch für die intrazelluläre Färbung die Möglichkeit der Verwendung von unmarkierten Primärantikörpern.

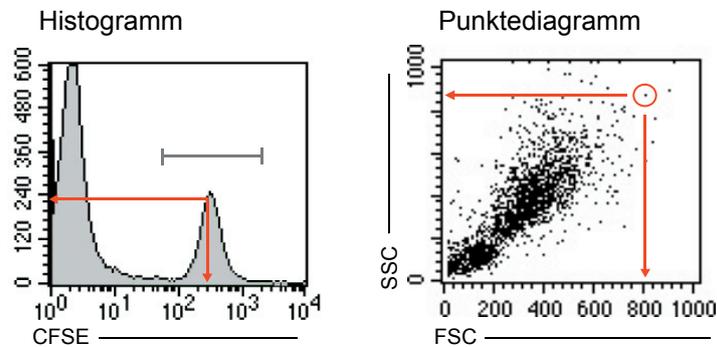
Nach Inkubation mit diesen, wurden die Zellen zweimal in Saponin-Lösung gewaschen und es wurde ein Fluoreszenz-markierter oder biotinylierter Antikörper zugegeben, der gegen den unmarkierten Primärantikörper gerichtet war. Biotinylierte Sekundärantikörper mussten nach wiederholtem Waschen in Saponin-Lösung durch Fluoreszenz-markiertes Streptavidin abgegriffen werden.

### 3.3.4. Darstellung und Auswertung in der Durchflusszytometrie

Informationen über Zellgröße, Granularität oder Fluoreszenzintensität können graphisch entweder einzeln oder in Relation zueinander dargestellt werden. Einzeln wird die entsprechende Eigenschaft sinnvoll in einem Histogramm dargestellt, wobei jedem Wert die Anzahl der Zellen, die diesen Wert aufweisen, zugeordnet wird. Im linken Teil von Abbildung 3.6 ist beispielhaft die Fluoreszenzintensität von Zellen, die mit dem Fluorochrom CFSE markiert wurden, in Form eines Histogramms dargestellt. Die Fluoreszenzintensität ist logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen, während die Anzahl der Zellen mit der jeweiligen Intensität auf der Ordinate liegt. Als Lesebeispiel mit roten Pfeilen markiert ist die Menge der Zellen, welche die Fluoreszenzintensität  $3 \times 10^2$  aufweisen (hier in etwa 220 Stück).

In einem Punktediagramm (Abbildung 3.6 rechts) können zwei verschiedene Eigenschaften von Zellen auf einmal dargestellt werden. Jede Zelle der analysierten Population ist dabei als Punkt eingezeichnet, dem in der Abszisse und der Ordinate die Intensität der entsprechenden Eigenschaft zugeordnet ist. Der in Abbildung 3.6 rot umrandete Punkt entspricht beispielsweise einer Zelle mit einer Größe (FSC) von etwa "820" und einer Granularität (SSC) von etwa "880".

Häufig soll in der Durchflusszytometrie eine definierte Zellpopulation (z.B. nur CFSE<sup>+</sup> Zellen) auf bestimmte Eigenschaften (z.B. Fluoreszenzintensität des Fluorochroms Cy5) hin untersucht werden. Dies wird durch das Setzen von Analysefenstern (engl. "gates") ermöglicht, die den jeweils gewünschten Bereich definieren. Ein mögliches Analysefenster für CFSE<sup>+</sup> Zellen ist in Abbildung 3.6 als grauer Balken dargestellt. In ähnlicher Weise können auch Zellen einer bestimmten Größe und Granularität selektiv analysiert werden (siehe Ergebnisteil Abschnitt 4.4).

**Abbildung 3.6: Darstellungsfornen durchflusszytometrischer Daten**

Im Histogramm (links) befindet sich die Fluoreszenzintensität eines Fluorchroms (hier CFSE) in der Abszisse, während die Anzahl der Zellen der jeweiligen Fluoreszenzintensität in der Ordinate aufgetragen ist. Im Punktediagramm (rechts) sind die analysierten Zellen als Punktwolke dargestellt und jeder Zelle sind dabei zwei Eigenschaften (FSC = Zellgröße, SSC = Zellgranularität) zugeordnet. Die roten Pfeile stellen jeweils Lesebeispiele dar (siehe Text). Der graue Balken im Histogramm bezeichnet den Bereich, in welchem CFSE<sup>+</sup> Zellen zu finden sind.

## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit umfassen eine Charakterisierung von Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom im Hinblick auf ihre Effektorfunktion und ihren Funktionsstatus. Dabei wurde der Ablauf der Effektorphase zytotoxischer T-Zellen in Zellkulturmodellen simuliert und mit den Gegebenheiten *in situ* verglichen. Weiterhin wurde eine Analyse zum Differenzierungsstatus von Tumor infiltrierenden Makrophagen und dendritischen Zellen im Nierenzellkarzinom durchgeführt. Durch immunhistologische Darstellungen wurden diese auf ihre Lokalisation im Tumorgewebe und auf Interaktionen mit T-Zellen hin untersucht. Ferner wurde gezeigt, dass das als Chemokin bekannte Protein CCL5 eine bisher unbekannt Rolle bei der zytotoxischen Effektorfunktion von T-Zellen spielt.

### 4.1. Beschreibung der Morphologie Tumor infiltrierender Leukozyten nach immunhistochemischer Färbung

Im leukozytären Infiltrat von Nierenzellkarzinomen wurden Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen durch immunhistochemische Färbung und Verwendung spezifischer Antikörper dargestellt. Des Weiteren wurde mit dieser Methode auch das intrazelluläre Effektormolekül Perforin nachgewiesen. Jeder Zelltyp weist nach entsprechender Färbung typische morphologische Merkmale auf, welche im Folgenden beschrieben werden.

Zum Nachweis von Makrophagen wurde der Antikörper „Maus-anti-humanes CD68“ verwendet; dieser färbt ein in intrazellulären Vesikeln vorkommendes Protein, welches in Gewebsmakrophagen exprimiert wird [Holness, 1993] (Abbildung 4.1 A). Makrophagen sind relativ große Zellen, welche durch ein breites Zytoplasma und eine meist runde bis ovale Zellkonfiguration charakterisiert sind. Bei starker Vergrößerung kann das intrazytoplasmatisch-granuläre Färbemuster gut nachvollzogen werden.

Der Antikörper „Maus-anti-humanes MRP14“ ermöglicht eine weitere Differenzierung von Makrophagen und färbt ein Antigen, welches von diesen Zellen in einem frühen Stadium der Entzündung exprimiert wird [Hemmerlein, 2000; O'Laughlin, 1992]. Typisch für die Färbung von MRP14 (Abbildung 4.1 B) ist ein Farbverlauf über die Zelle hinaus, welcher mit vermehrtem Abstand zur Zelle an Intensität abnimmt. Womöglich handelt es sich dabei um eine immunhistologisch darstellbare Sekretion des Proteins.

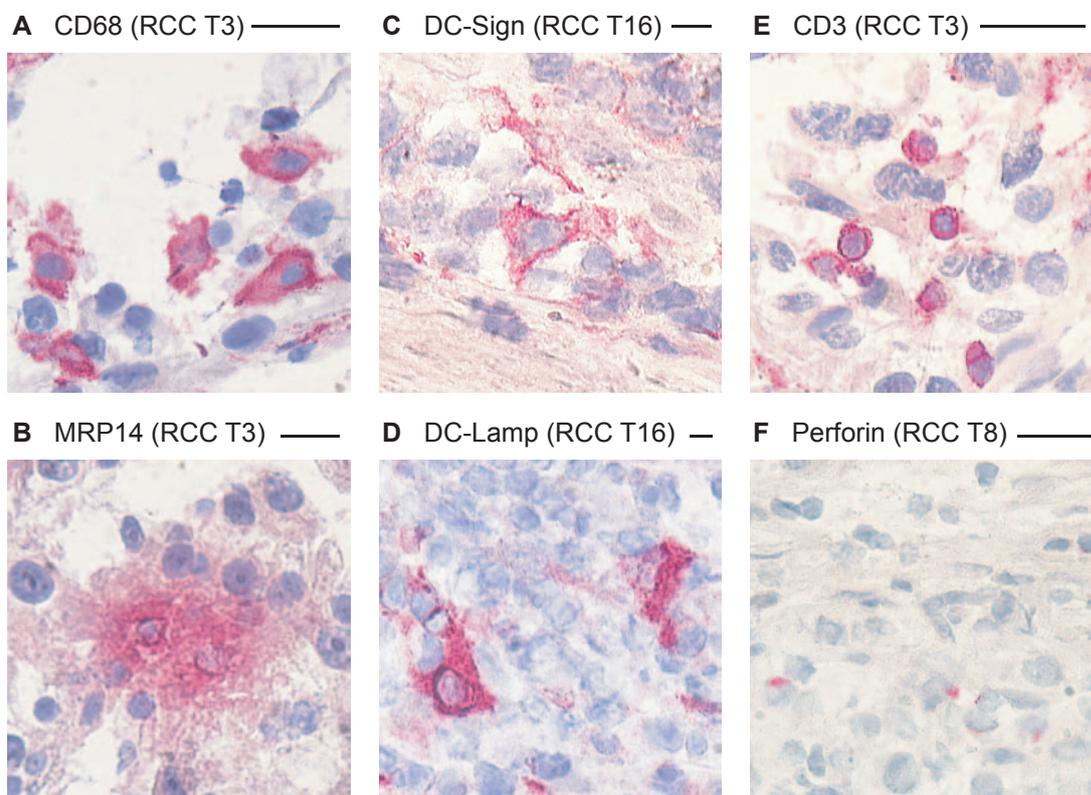
Dendritische Zellen wurden mit dem Antikörper „Maus-anti-humanes DC-Sign“ nachgewiesen. DC-Sign ist ein Protein, welches von unreifen dendritischen Zellen exprimiert wird und sowohl auf der Plasmamembran als auch intrazellulär lokalisiert ist. Die Morphologie der dendritischen Zelle lässt sich von ihrem Namen ableiten; der griechische Begriff „*dendrites*“ bedeutet „zum Baum gehörig“ und steht für die

zahlreichen Verästelungen des Zytoplasmas dieser Zellen (Abbildung 4.1 C).

Ein weiterer Antikörper zur Darstellung von dendritischen Zellen ist „Maus-anti-humanes DC-Lamp“. DC-Lamp ist ein intrazelluläres Protein, welches von reifen dendritischen Zellen exprimiert wird. Charakteristisch ist ein intrazytoplasmatisch-granuläres Färbemuster in großen Zellen, welche wiederum häufig Ausläufer ihres Zytoplasmas aufweisen (Abbildung 4.1 D).

Zum Nachweis von T-Zellen wurde der Antikörper „Maus-anti-humanes CD3“ verwendet. Der Antikörper erkennt die  $\epsilon$ -Einheit des CD3-Komplexes auf T-Zellen; diese ist in der Plasmamembran lokalisiert und es handelt sich somit um eine Oberflächenfärbung. Das Zytoplasma von T-Zellen ist sehr schmal, so dass sich immunhistochemisch das charakteristische Bild einer den Zellkern umrundenden Färbung ergibt (Abbildung 4.1 E).

Zur Darstellung des Effektormoleküls Perforin wurde der Antikörper „Maus-anti-humanes Perforin“ verwendet. Perforin ist in intrazytoplasmatischen Vesikeln von Lymphozyten gespeichert. Die Perforinfärbung ist durch kleine gefärbte Areale charakterisiert, die wegen des geringen Zytoplasmavolumens von Lymphozyten eng an Zellkerne gebunden erscheinen (Abbildung 4.1 F). Die granuläre Struktur des Perforin kann immunhistochemisch wegen des zu geringen Auflösungsvermögens meist nicht ausreichend dargestellt werden.



**Abbildung 4.1: Legende siehe nachfolgende Seite**

**Legende zu Abbildung 4.1: Demonstration immunhistochemischer Färbungen im Nierenzellkarzinom**

Dargestellt sind repräsentative Beispiele immunhistochemischer Einzelfärbungen verschiedener Zelltypen und Strukturen in Nierenzellkarzinomen (Gewebeidentifikationsnummer in Klammern). Durch Verwendung des Farbreagens Neufuchsin sind diese rot dargestellt; das Gewebe ist mit Hämalun (blau) gegengefärbt. Alle Aufnahmen entstanden mit 630-facher Vergrößerung. **A:** CD68<sup>+</sup> Makrophagen. **B:** MRP14<sup>+</sup> Makrophagen. **C:** DC-Sign<sup>+</sup> dendritische Zellen. **D:** DC-Lamp<sup>+</sup> dendritische Zellen. **E:** CD3<sup>+</sup> T-Zellen. **F:** Das Effektormolekül Perforin.

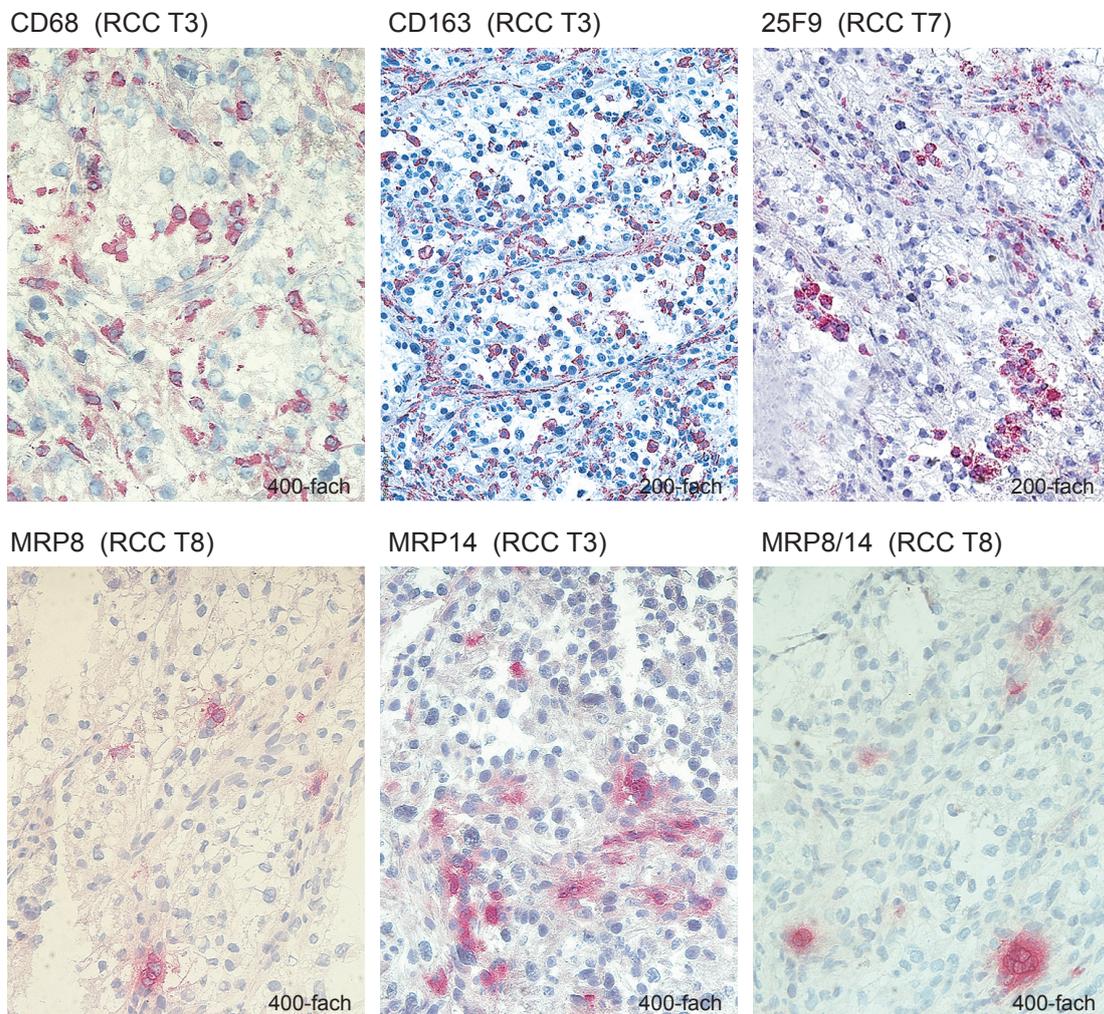
**4.2. Charakterisierung des monozytären Infiltrats im Nierenzellkarzinom****4.2.1. Phänotypische Charakterisierung von infiltrierenden Makrophagen *in situ***

Ein typisches Merkmal des Nierenzellkarzinoms ist dessen massive Infiltration mit Makrophagen [Hemmerlein, 2000]. Anhand der Expression verschiedener Proteine in Makrophagen können Rückschlüsse auf deren Differenzierungsstatus und auf Gegebenheiten des infiltrierten Gewebes gezogen werden. Gefrierschnitte von Nierenzellkarzinomen wurden immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD68, CD163, 25F9, MRP8, MRP14 und MRP8/14 gefärbt. CD68 wird von allen Makrophagen exprimiert und dient somit zur Feststellung der Gesamtzahl an infiltrierenden Makrophagen [Holness, 1993]. CD163 ist ein Protein, welches *in vitro* durch IL-6, IL-10 oder Glukokortikoide induziert wird und von aktivierten Makrophagen exprimiert wird [Buechler, 2000; Ritter, 2001]. Die Proteine MRP14 und MRP8/14 werden nur von Makrophagen exprimiert, die sich in einem Gewebe der frühen Entzündungsphase befinden [Hemmerlein, 2000; O'Laughlin, 1992]. MRP8 und 25F9 hingegen sind auf Makrophagen zu finden, die sich im Gewebe mit später oder chronischer Entzündung aufhalten, wobei 25F9 auch von ruhenden Makrophagen exprimiert wird [Hemmerlein, 2000; Zwadlo, 1985]. Abbildung 4.2 zeigt eine repräsentative Darstellung der immunhistologischen Färbung der einzelnen Makrophagentypen. Alle nachgewiesenen Subtypen waren in unterschiedlicher Menge diffus im Gewebe der Nierenzellkarzinome verteilt.

Die Infiltrationsdichte der verschiedenen Populationen im Tumorgewebe unterschiedlicher Patienten wurde durch Auszählung von je zehn verschiedenen nicht überlappenden Gesichtsfeldern quantifiziert (Abbildung 4.3). CD68<sup>+</sup> Zellen wurden in allen Tumoren in großer Anzahl gefunden. CD163<sup>+</sup> und somit aktivierte Makrophagen waren in ähnlicher Häufigkeit wie CD68<sup>+</sup> Zellen in sechs von zehn Tumoren (RCC T2, RCC T3, RCC T4, RCC T5, RCC T7 und RCC T8) zu finden. In den Tumoren RCC S67T, RCC T1, RCC T10 und RCC T11 war die Menge der aktivierten CD163<sup>+</sup> Makrophagen gegenüber der Gesamtzahl reduziert. Im entzündlichen Milieu des Nierenzellkarzinoms wird dem Zytokin IL-6 eine lokal immunsuppressive

Funktion zugeschrieben [Alberti, 2005]; da CD163 durch IL-6 induziert wird, könnte eine reduzierte Menge an CD163<sup>+</sup> Makrophagen womöglich auf ein geringeres Vorkommen von IL-6 in den entsprechenden Geweben sprechen.

25F9<sup>+</sup> Zellen konnten in sieben von acht (RCC T2 und RCC T4 wurden nicht auf 25F9<sup>+</sup> Zellen hin überprüft) analysierten Tumoren beschrieben werden, wobei die Expression in fünf Tumoren (RCC S67, RCC T1, RCC T7, RCC T8 und RCC T11) besonders hoch war. In drei dieser fünf Tumore (RCC S67, RCC T1 und RCC T11) war gleichzeitig die Menge an CD163<sup>+</sup> Makrophagen deutlich vermindert, was womöglich auf eine umgekehrte Korrelation zwischen der Infiltrationsdichte von CD163<sup>+</sup> und 25F9<sup>+</sup> Makrophagen hindeutet.



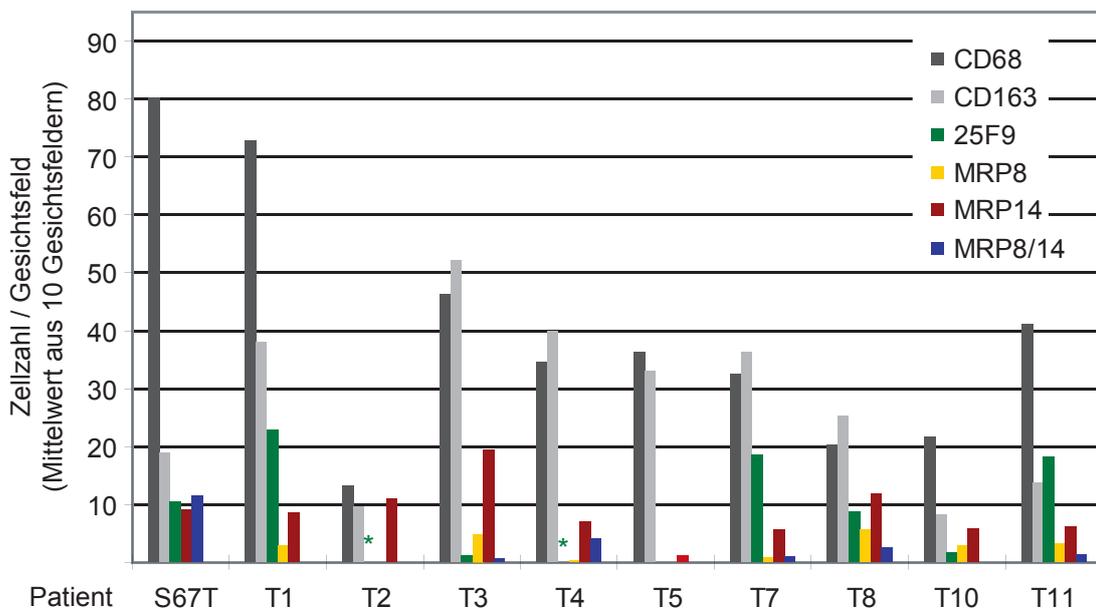
**Abbildung 4.2: Darstellung verschiedener Subtypen von Makrophagen im Nierenzellkarzinom**

Gefrierschnitte von Gewebe verschiedener Nierenzellkarzinome (Gewebeidentifikationsnummer in Klammern) wurden immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD68, CD163, 25F9, MRP8, MRP14 und MRP8/14 gefärbt. Durch Farbreaktion mit Neufuchsin stellen sich die einzelnen Strukturen rot dar; das Gewebe ist mit Hämalaun (blau) gegengefärbt.

MRP8<sup>+</sup> Zellen wurden in acht von zehn Geweben identifiziert, während MRP14<sup>+</sup> Zellen in allen Geweben gefunden wurden. MRP8/14<sup>+</sup> Zellen waren in fünf der zehn Nierenzellkarzinome vorhanden. In allen Geweben lagen 25F9<sup>+</sup>, MRP8<sup>+</sup>, MRP14<sup>+</sup> und MRP8/14<sup>+</sup> Zellen in deutlich geringerer Menge als CD68<sup>+</sup> Zellen vor.

Der Tumor RCC T2 ist das einzige hier analysierte Nierenzellkarzinom vom chromophilen Typ und weist eine im Verhältnis deutlich reduzierte Anzahl an Makrophagen auf; insbesondere ist das Verhältnis von MRP14<sup>+</sup> Makrophagen der akuten und frühen Entzündungsphase zur Gesamtmenge an Makrophagen in diesem Tumor das höchste aller analysierten Tumorgewebe.

Bezüglich Differenzierungsgrad und Tumorstadium (siehe Tabelle 2.3) konnte keine Korrelation zur Menge an Makrophagen eines bestimmten Subtyps festgestellt werden.



**Abbildung 4.3: Quantifizierung von Makrophagen-Subtypen in Nierenzellkarzinomen verschiedener Patienten**

Dargestellt ist die durchschnittlich in einem Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung gefundene Anzahl an positiven Zellen. Ausgezählt wurden jeweils zehn Gesichtsfelder. \*Für die Gewebe der Patienten T2 und T4 liegen keine Ergebnisse über die Menge an 25F9<sup>+</sup> Zellen vor.

#### 4.2.2. Charakterisierung von dendritischen Zellen und deren räumlicher Beziehung zu T-Zellen im Gewebe

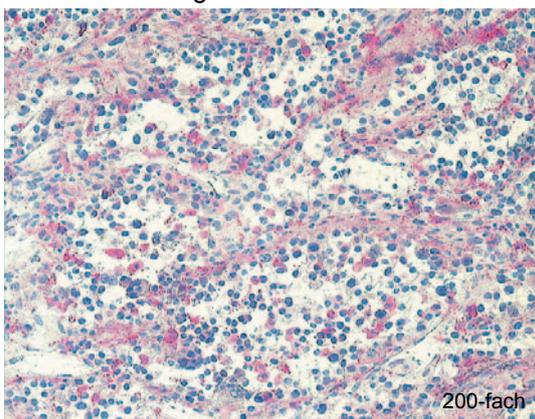
Die Beschreibung neuer Antigene (DC-Sign und DC-Lamp) auf dendritischen Zellen und die Entwicklung entsprechender Antikörper ermöglichen genauere

Untersuchungen zum Differenzierungsstatus dendritischer Zellen *in vivo*. Nierenzellkarzinome verschiedener Patienten wurden nun immunhistologisch mit Antikörpern gegen DC-Sign und DC-Lamp gefärbt.

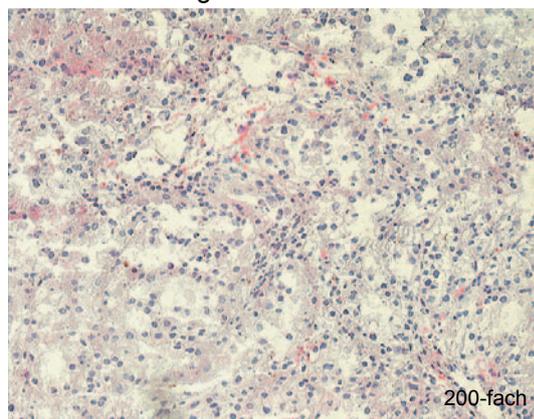
#### 4.2.2.1. Nachweis von dendritischen Zellen durch den Antikörper DC-Sign

Das kürzlich beschriebene Protein DC-Sign ("*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*") [Geijtenbeek, 2000] dient als sehr spezifisches Erkennungsmerkmal für insbesondere unreife dendritische Zellen [Soilleux, 2003; Soilleux, 2002] und ist funktionell primär für die Adhäsion von naiven T-Zellen an dendritische Zellen von Relevanz [Soilleux, 2003]. Neun verschiedene Nierenzellkarzinome wurden immunhistologisch mit einem Antikörper gegen DC-Sign gefärbt und in allen Fällen wurden DC-Sign<sup>+</sup> Zellen in unterschiedlicher Menge nachgewiesen (Übersicht in Abbildung 4.4).

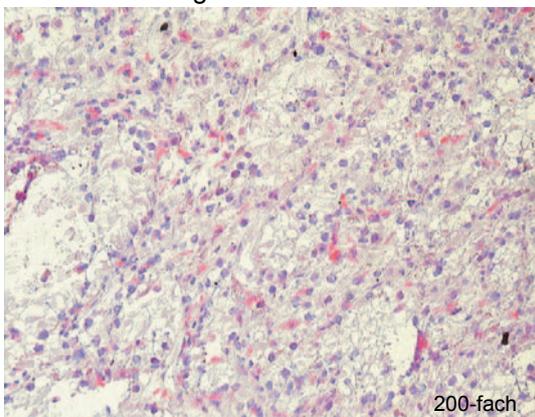
RCC T3 DC-Sign



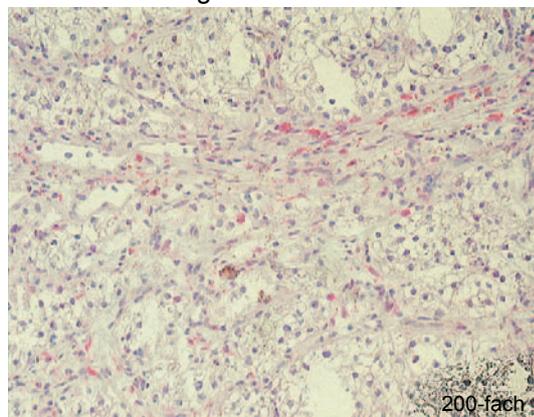
RCC T4 DC-Sign



RCC T7 DC-Sign



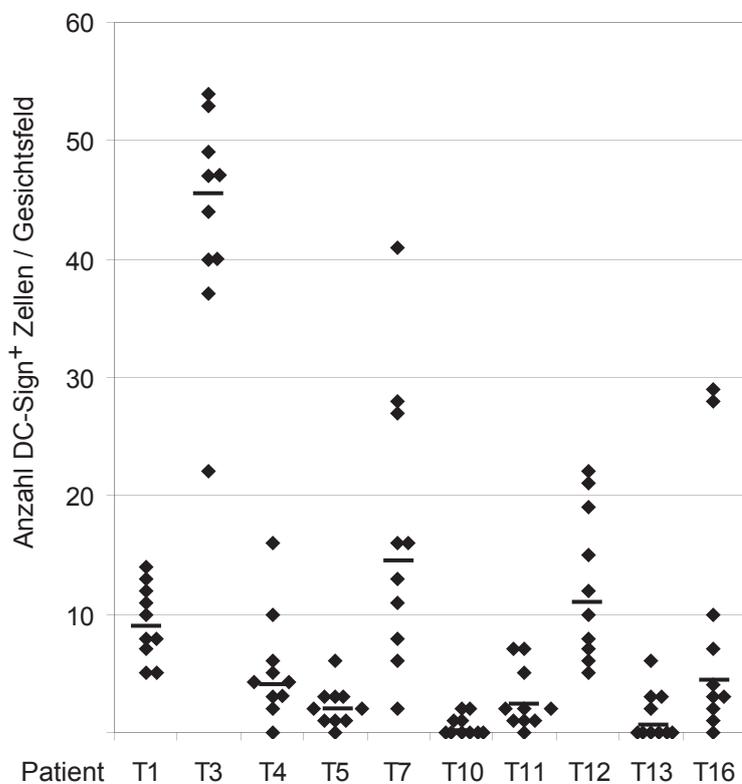
RCC T8 DC-Sign



#### Abbildung 4.4: Darstellung von DC-Sign<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom

In verschiedenen Nierenzellkarzinomgeweben wurden immunhistologisch DC-Sign<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen. Durch Farbreaktion mit Neufuchsin stellen sich diese rot dar. Auffällig ist die große Menge an DC-Sign<sup>+</sup> Zellen im Tumorgewebe RCC T3 (oben links).

Die Zellen hatten morphologisch das typische Erscheinungsbild dendritischer Zellen (Abbildung 4.1 C). Positiv gefärbte Zellen waren diffus im Gewebe verteilt und befanden sich sowohl im Tumorparenchym als auch im interstitiellen Bindegewebe des Tumors. Die morphometrische Auszählung der Tumorgewebe ist in Abbildung 4.5 graphisch dargestellt. Dabei fiel die massive Infiltration des Tumors RCC T3 mit DC-Sign<sup>+</sup> Zellen auf. Histopathologisch ist das Gewebe dieses Tumors durch eine geringe Differenzierung (G3) und einen sarkomatoiden Aspekt gekennzeichnet (vgl. Tabelle 2.3).



**Abbildung 4.5: Quantifizierung von DC-Sign<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom**

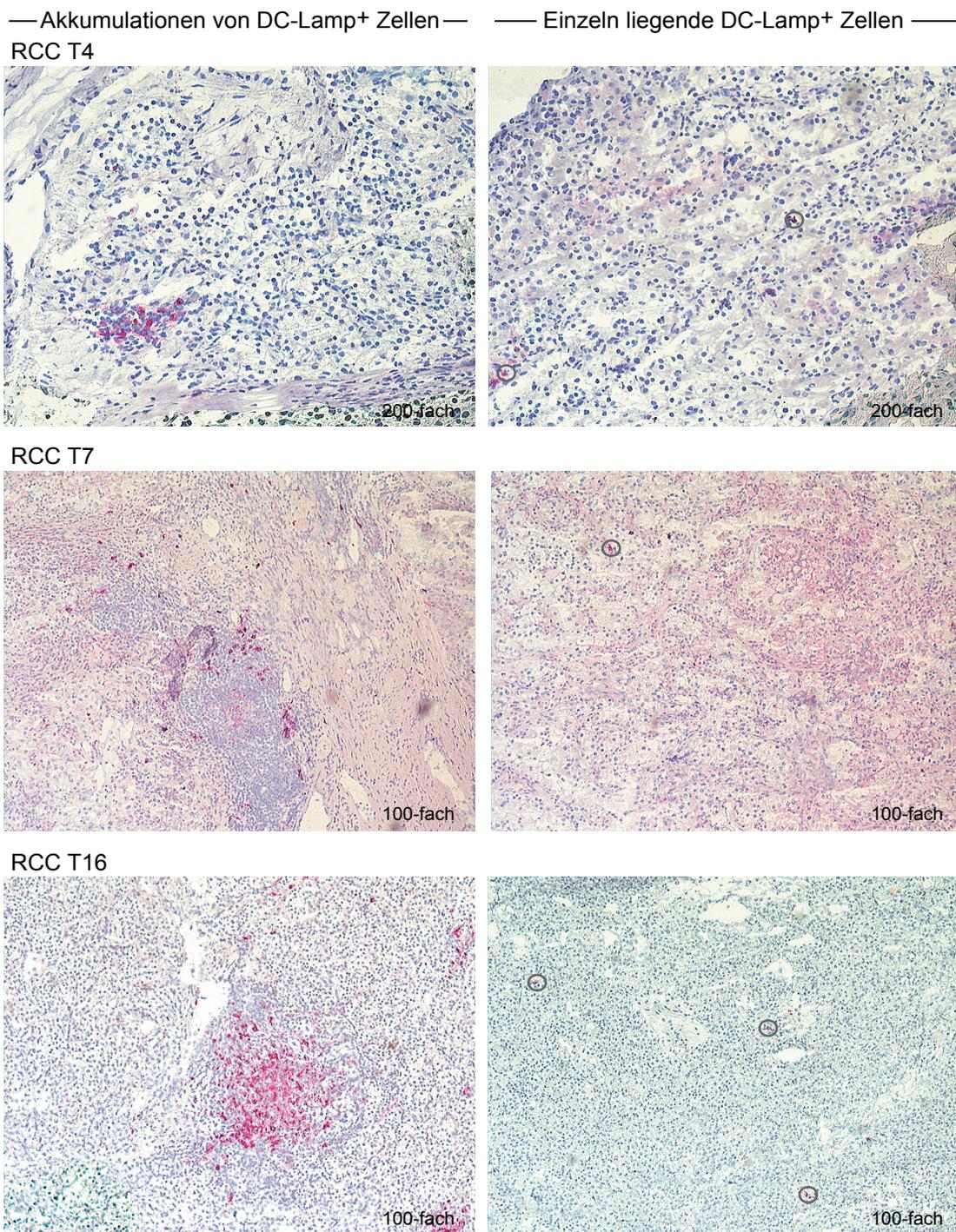
Dargestellt ist die Anzahl DC-Sign<sup>+</sup> Zellen pro Gesichtsfeld. Jedes Symbol (◆) entspricht einem Gesichtsfeld. Die mediane Anzahl pro Gesichtsfeld ist als horizontaler Balken (—) abgebildet.

#### 4.2.2.2. Nachweis von dendritischen Zellen durch den Antikörper DC-Lamp

DC-Lamp ist ein intrazelluläres lysosomales Membranprotein und wird deshalb im englischen als „dendritic cell lysosome associated membrane proteine“ (DC-Lamp) bezeichnet. In gesunden Geweben wird es ausschließlich von aktivierten,

reifen dendritischen Zellen in T-Zellarealen sekundärer lymphatischer Organe exprimiert [de Saint-Vis, 1998]. Zwölf verschiedene Nierenzellkarzinome wurden immunhistologisch mit dem Antikörper gegen DC-Lamp gefärbt. In allen Präparaten wurden DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen gefunden, welche den DC-Sign<sup>+</sup> Zellen morphologisch sehr ähnlich sind (Abbildung 4.1 C und D). DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen wurden allerdings fast ausschließlich in Form von Akkumulationen gefunden, die häufig in der Nähe von größeren Bindegewebsarealen oder der Pseudokapsel des Tumors und seltener im Tumorparenchym lokalisiert waren. Einzeln gelegene DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen wurden nur selten beobachtet. Abbildung 4.6 zeigt die Akkumulationen DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen (linke Spalte) und vergleichend die Verteilung dieser Zellen außerhalb der Anhäufungen (rechte Spalte). Dabei sind Beispiele einer kleinen Akkumulation (RCC T4 in Abbildung 4.6 oben), einer Akkumulation mit Assoziation zum Bindegewebe des Tumors (RCC T7 in Abbildung 4.6 Mitte) und einer großen Akkumulation im Tumorparenchym (RCC T16 in Abbildung 4.6 unten) dargestellt.

Die Areale, in denen sich die Anhäufungen von DC Lamp<sup>+</sup> dendritischen Zellen befanden, ähnelten morphologisch Ansammlungen von Lymphozyten (Abbildung 4.6). Die Färbung von Serienschnitten mit Antikörpern gegen DC-Lamp und CD3 bestätigen diese Co-Lokalisation in sämtlichen Fällen. Die enge Nachbarschaft beider Zelltypen konnte durch konventionelle immunhistologische Doppelfärbung und Doppelimmunfluoreszenz demonstriert werden (Abbildung 4.7). Mittels konfokaler Mikroskopie konnten des Weiteren enge Kontakte zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.7).

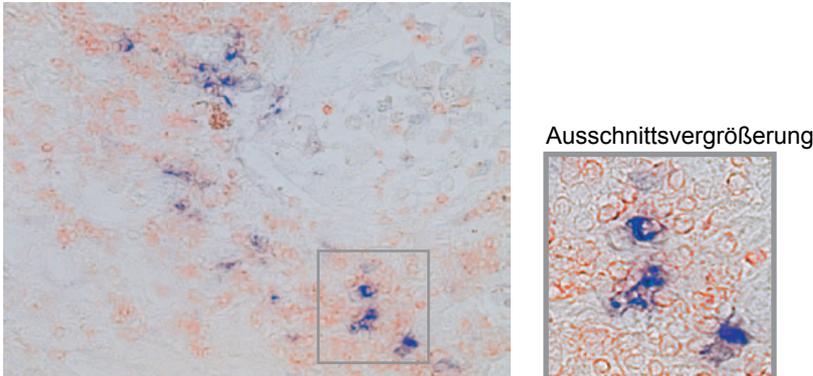


**Abbildung 4.6: Immunhistologische Darstellung von DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom**

Dargestellt sind repräsentative Färbung von DC-Lamp in drei verschiedenen Nierenzellkarzinomen. Durch Farbreaktion mit Neufuchsin stellt sich das Protein rot dar; das Gewebe ist mit Hämalaun gegengefärbt. DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom liegen fast ausschließlich in Form von Akkumulationen eng beieinander (linke Spalte). Außerhalb solcher Akkumulationen befinden sich im Tumorgewebe nur sehr selten DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen (rechte Spalte). Zur Verdeutlichung dieser Tatsache sind vorrangig Übersichtsvergrößerungen gewählt. Einzel liegende DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen (rechte Spalte) sind zur besseren Erkennlichkeit grau umrandet.

#### RCC T3 Immunhistochemische Doppelfärbung

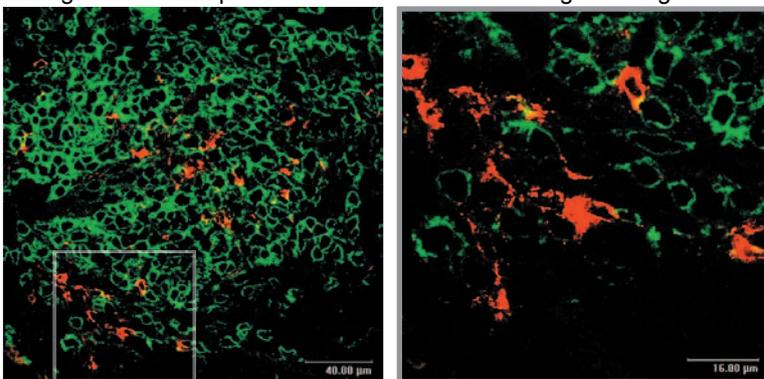
CD3 rot / DC-Lamp blau



#### RCC T8 Doppelimmunfluoreszenz

CD3 grün / DC-Lamp rot

Ausschnittsvergrößerung



#### Abbildung 4.7: Darstellung der Co-Lokalisation von CD3<sup>+</sup> und DC Lamp<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom

DC Lamp<sup>+</sup> Zellen wurden in den Tumoren RCC T3 (oben) und RCC T8 (unten) durch immunhistochemische Doppelfärbung (oben) und Doppelimmunfluoreszenz mit CD3 (unten) dargestellt. Verwendet wurden Antikörper aus verschiedenen Spezies (vgl. Färbeprotokoll „A“ im Abschnitt 3.2.6). Im Gewebe RCC T3 wurden CD3<sup>+</sup> und DC Lamp<sup>+</sup> Zellen durch Farbreaktion mit Peroxidase (rot) und Fast Blue (blau) abgebildet. In der Doppelimmunfluoreszenz sind CD3<sup>+</sup> Zellen grün und DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen rot dargestellt (unten). Die Aufnahmen entstanden durch Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie und Darstellung einer einzelnen Schnittebene. Es sollen die engen Kontakte zwischen T-Zellen und DC-Lamp<sup>+</sup> dendritischen Zellen demonstriert werden.

### 4.3. Effektorfunktion und Aktivierungsstatus von Tumor infiltrierenden Lymphozyten

Im Nierenzellkarzinom werden neben dem - für diesen Tumor typischen - Infiltrat an monozytären Zellen auch teils erhebliche Mengen an infiltrierenden Lymphozyten gefunden [Kolbeck, 1992; Nakano, 2001]. Im Folgenden werden funktionelle Aspekte Tumor infiltrierender Lymphozyten analysiert, um eventuell vorhandene Defekte der Immunantwort aufzudecken und Hinweise auf deren Ursache zu erhalten.

#### 4.3.1. Die zytotoxische Effektorfunktion Tumor infiltrierender Lymphozyten

Die bekannten Mechanismen der Zytotoxizität beruhen auf einer Induktion von Apoptose in der Zielzelle, die durch Interaktion von Fas mit Fas-Ligand oder durch zytotoxische Effektormoleküle der Lymphozyten herbeigeführt wird [Barry, 2002]. Neben den Proteinen Granzym A und Granzym B ist das Perforin essentiell für die Induktion von Apoptose in der Zielzelle.

##### 4.3.1.1. Quantitative Analyse der Perforinexpression in Tumor infiltrierenden T-Zellen *in situ*

Zur quantitativen Bestimmung des T-Zell-Anteils am Infiltrat und zur Bestimmung des Anteils an potentiell zytotoxischen Zellen, wurden Serienschritte von schockgefrorenen Nierenzellkarzinomen mit Antikörpern gegen CD3 und Perforin immunhistologisch gefärbt (Abbildung 4.8). In der Abbildung sind Perforin<sup>+</sup> Zellen zur besseren Erkennbarkeit grau umrandet. Die Menge der jeweilig positiven Zellen wurde durch Auszählen bestimmt und ist in Abbildung 4.9 graphisch dargestellt. Bei allen sieben analysierten Tumoren konnte eine im Vergleich zum Infiltrat an T-Zellen stark verminderte Anzahl an Perforin<sup>+</sup> Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.9). Der höchste Anteil an Perforin<sup>+</sup> Zellen konnte in den Tumoren RCC T1 (durchschnittlich 14 Perforin<sup>+</sup> Zellen/Gesichtsfeld bei 33 T-Zellen/Gesichtsfeld) und RCC T11 (4 Perforin<sup>+</sup> Zellen bei 12 T-Zellen) gefunden werden. Einige Perforin<sup>+</sup> Zellen wurden auch im Tumor RCC MKo gefunden (9 Perforin<sup>+</sup> Zellen bei 83 T-Zellen), wobei dieser auch ein überdurchschnittlich hohes Maß an T-Zell-Infiltration aufwies. In den Tumoren RCC T2 und RCC T3 konnten trotz vorhandenem T-Zell-Infiltrat keine Perforin<sup>+</sup> Zellen gefunden werden.

##### **Legende zu Abbildung 4.8: Vergleichende Darstellung der Expression von CD3 und Perforin in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom**

Dargestellt sind repräsentative Beispiele immunhistologischer Einzelfärbungen verschiedener Nierenzellkarzinome. CD3 und Perforin sind durch spezifische Antikörper und das Farbreagenz Neufuchsin rot dargestellt; das Gewebe ist mit Hämalaun gegengefärbt. Alle Aufnahmen entstanden mit 400-facher Vergrößerung und zeigen T-Zellen und Perforin<sup>+</sup> Zellen im Tumorparenchym. Perforin<sup>+</sup> Zellen zeichnen sich durch kleine intrazelluläre Granula mit roter Farbreaktion aus und sind zur besseren Erkennbarkeit grau umrandet. Demonstriert werden soll das quantitativ auffällig unterschiedliche Verhältnis von CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu Perforin<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom.

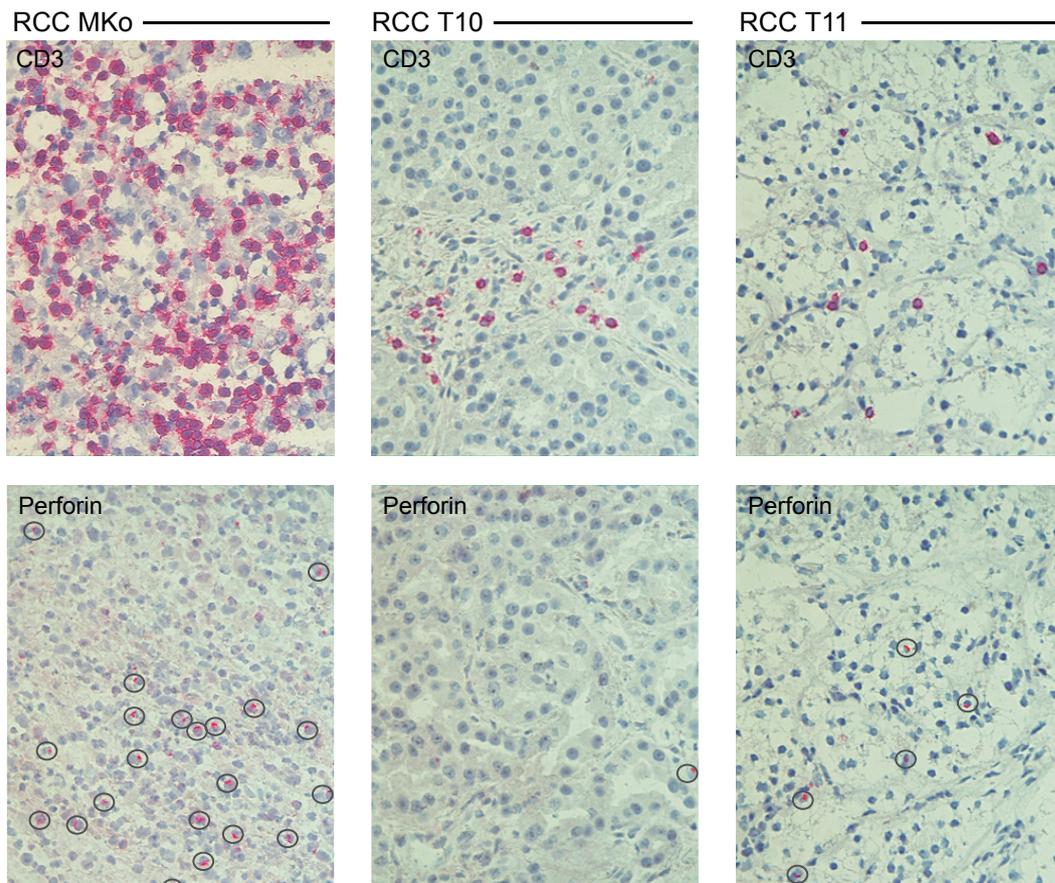


Abbildung 4.8: Legende siehe vorherige Seite

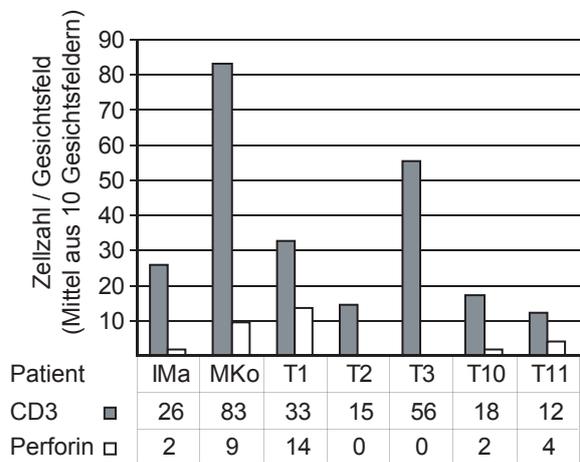
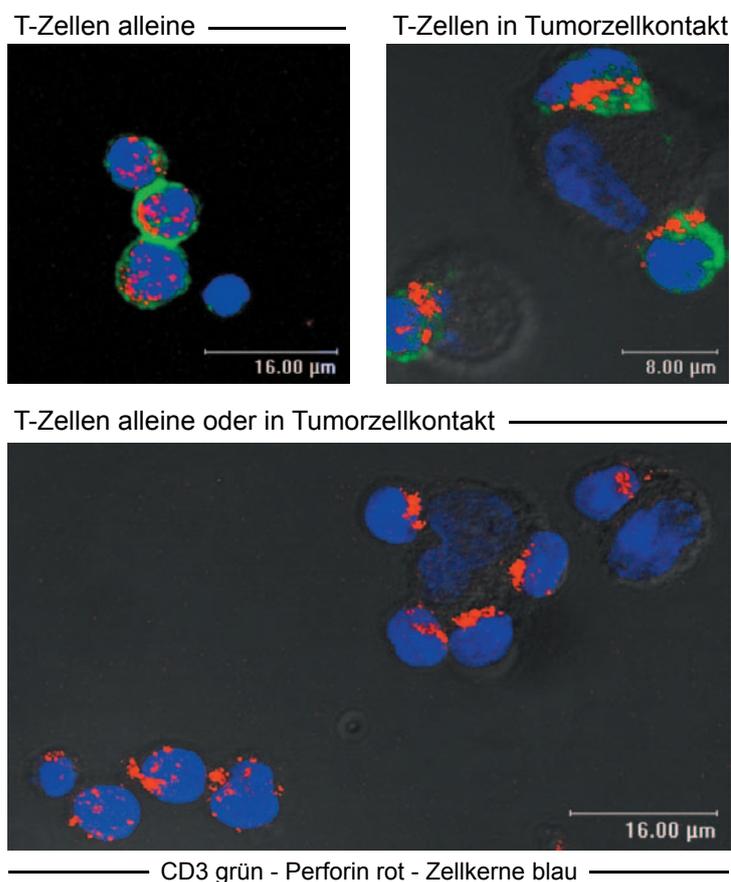


Abbildung 4.9: Quantitativer Vergleich von infiltrierenden CD3<sup>+</sup> und Perforin<sup>+</sup> Zellen in Nierenzellkarzinomen verschiedener Patienten

Die Mittelwerte aus der Anzahl positiver Zellen in zehn Gesichtsfeldern eines Gewebes sind als Balken (grau = CD3, weiß = Perforin) aufgetragen und zusätzlich in einer Wertetabelle dargestellt.

#### 4.3.1.2. Intrazelluläre Verteilung von Perforin in T-Zellklonen und Tumor infiltrierenden T-Zellen

Das Perforin ist in intrazellulären Granula gespeichert, welche ohne antigenspezifischen Kontakt der T-Zelle diffus im Zytoplasma verteilt sind. Nach spezifischer Antigenerkennung orientieren sich diese Granula zur Kontaktstelle mit der Zielzelle hin und werden ausgeschüttet. Dieser Prozess wurde an einem *in vitro*-Modell bildgebend gezeigt. Hierzu wurde als Zielzelle die Melanomzelllinie Mel IL2 verwendet, die den MHC-Klasse-I-Allotyp HLA-A2 exprimiert. Der zytotoxische T-Zellklon JB4 erkennt das HLA-A2-Molekül als Antigen und wurde deshalb als Effektorzelle gegen Mel IL2 gerichtet. Die Effektorzellen wurden mit den Zielzellen vereinigt und durch Zentrifugation wurden Zell-Zell-Kontakte (Konjugate) zwischen Effektor- und Zielzellen hergestellt. Diese wurden nach 30 Minuten Inkubation fixiert und immunzytologisch mit Antikörpern gegen CD3 $\epsilon$  und Perforin gemäß Färbeprotokoll „B“ (siehe Abschnitt 3.2.6) gefärbt. Die intrazelluläre Verteilung des Perforin wurde anschließend mittels konfokaler Lasermikroskopie räumlich dargestellt. Die diffuse Verteilung der Perforin enthaltenden Granula innerhalb der T-Zellen, die keinen Kontakt zu einer Zielzelle hatten, konnte sehr deutlich gezeigt werden (Abbildung 4.10 links). Ebenso konnte die Ausrichtung der Perforin granula zur Zielzelle hin überzeugend demonstriert werden (Abbildung 4.10 rechts).



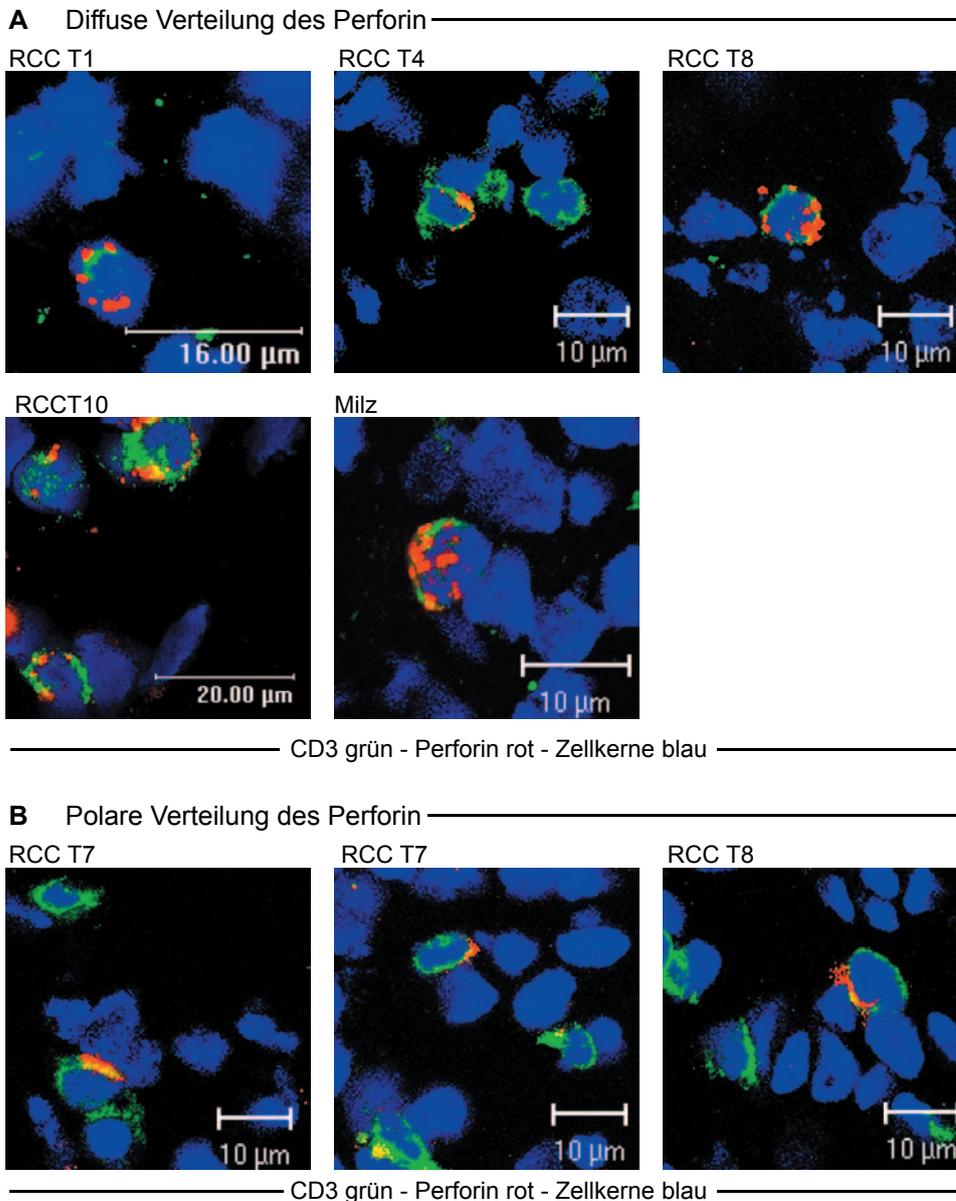
**Abbildung 4.10: Legende siehe nachfolgende Seite**

**Legende zu Abbildung 4.10: Verteilungsmuster von Perforin im T-Zellklon JB4 ohne und mit Kontakt zu Zielzellen**

Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und Perforin (rot) im T-Zellklon JB4. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Aufnahmen entstanden durch Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie; alle zur Erfassung der räumlichen Verteilung von Perforin relevanten Schnittebenen wurden übereinander projiziert und die Farbe rot gegenüber allen anderen Farben deckend dargestellt. In der unteren Abbildung ist der grüne Farbkanal der CD3-Färbung ausgeblendet. Die Zielzellen sind durch ihre Größe von den T-Zellen zu unterscheiden, ihre Plasmamembran ist ungefärbt. In T-Zellen ohne Kontakt zu Zielzellen ist Perforin als granuläre Struktur diffus im Zytoplasma verteilt (links oben und unten), während die Perforingranula nach Kontakt mit einer Zielzelle zu dieser hin orientiert werden (rechts oben und unten).

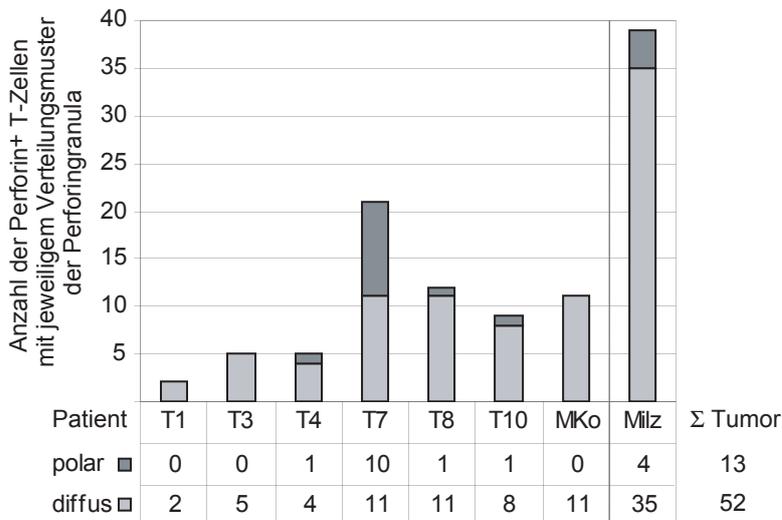
Tumor infiltrierende T-Zellen im Nierenzellkarzinomgewebe wurden nun hinsichtlich der räumlichen Verteilung von Perforin beurteilt. Dazu wurden Gefrierschnitte aus Tumorgewebe immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD3 $\epsilon$  und Perforin gefärbt und die Verteilung des Perforin mittels konfokaler Lasermikroskopie räumlich dargestellt. Insgesamt wurden 65 Perforin<sup>+</sup> T-Zellen aus sieben Nierenzellkarzinomgeweben analysiert und die Verteilung des Perforin als "diffus" bezeichnet, wenn die Granula über die Zellen verteilt waren (siehe Beispiele in Abbildung 4.11 A). Die Verteilung des Perforin wurde als "polar" gewertet, wenn alle Granula innerhalb einer Zelle in eine bestimmte Richtung hin orientiert waren (siehe Beispiele in Abbildung 4.11 B). 13 der 65 analysierten Perforin<sup>+</sup> T-Zellen (entspricht 20 %) zeigten eine polare Ausrichtung des intrazellulären Perforin (Abbildung 4.12), wobei zehn dieser 13 T-Zellen mit polarer Ausrichtung im Gewebe des Patienten RCC T7 beobachtet wurden. Würde man den Patienten RCC T7 nicht miteinbeziehen, zeigten nur drei von 43 analysierten Perforin<sup>+</sup> T-Zellen (entspricht 7 %) eine polare Ausrichtung ihres Perforin. Die meisten Tumor infiltrierenden Perforin<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine diffuse Verteilung ihres Perforin (52 von 65; entspricht 80 % der analysierten Perforin<sup>+</sup> T-Zellen) auf. Da T-Zellen bei antigenspezifischem Kontakt ihr Perforin zur Zielzelle hin ausrichten, deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die ohnehin wenigen Perforin<sup>+</sup> T-Zellen im Nierenzellkarzinom nicht in die Erkennung von Tumorzellen involviert sind oder womöglich Defekte im Mechanismus der Ausrichtung zytotoxischer Granula vorliegen.

Zum Vergleich wurde humanes Milzgewebe nach derselben Methode analysiert (Beispiel in Abbildung 4.11 A). Dabei wurden fast ausschließlich T-Zellen mit diffuser Verteilung von Perforin gefunden (35 von 39; entspricht 90 % der analysierten Perforin<sup>+</sup> Zellen) (Abbildung 4.12). Dies ist in Einklang mit der Annahme, dass in lymphatischen Geweben keine Vernichtung von Zielzellen durch zytotoxische Lymphozyten stattfindet.



**Abbildung 4.11: Verteilungsmuster von Perforin in T-Zellen im Nierenzellkarzinom und in der Milz**

Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und Perforin (rot) von verschiedenen Nierenzellkarzinomen und einer Milz. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Aufnahmen entstanden durch räumliche Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie und Projektion aller aufgezeichneten Schnittebenen. Grüne und rote Farbsignale sind gegenüber den blauen Farbsignalen der Zellkerne artifizuell deckend dargestellt. **A:** Beispiel einer diffusen Verteilung des Perforin in T-Zellen im Nierenzellkarzinom und der Milz. **B:** Beispiele einer polaren Verteilung des Perforin in Tumor infiltrierenden T-Zellen.



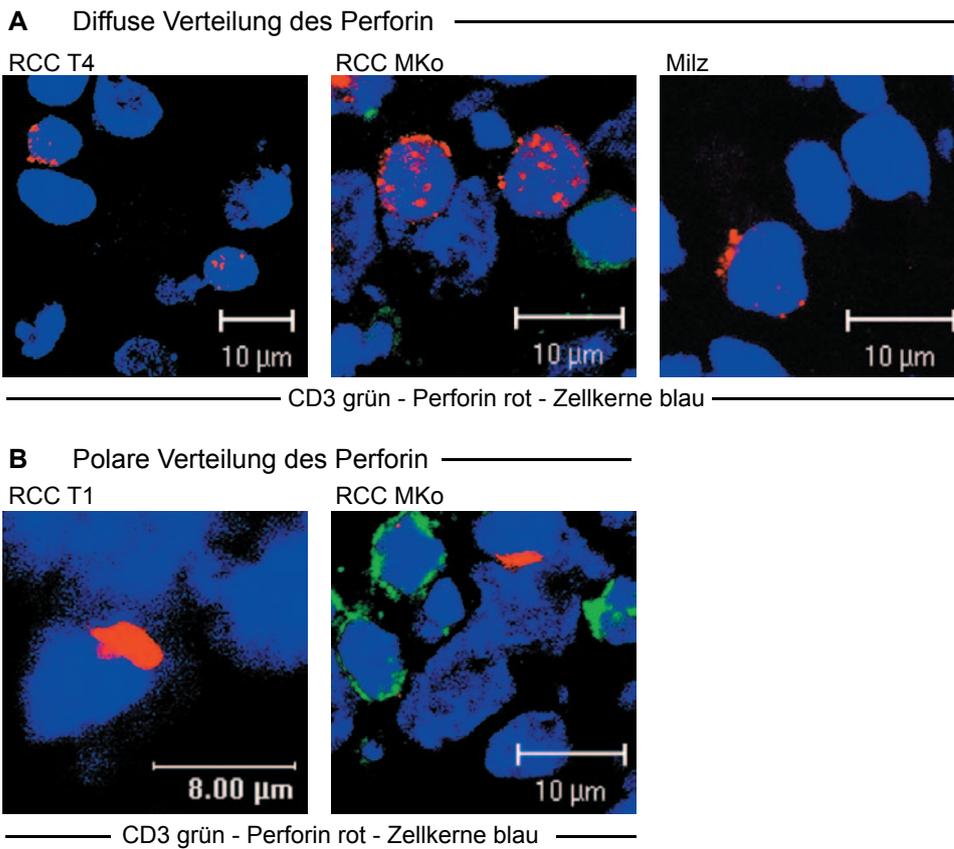
**Abbildung 4.12: Quantifizierung des Verteilungsmusters von Perforin in T-Zellen im Nierenzellkarzinom und in der Milz**

Die Anzahl der T-Zellen mit diffuser (hellgrau) und polarer (dunkelgrau) Verteilung des intrazellulären Perforin ist als Abschnitt eines Balkens aufgetragen und zusätzlich in einer Wertetabelle dargestellt. Die Summe der Zellen eines Verteilungsmusters ist rechts neben dem Diagramm abgebildet; dabei sind die analysierten T-Zellen aus der Milz nicht mit einbezogen. Lesebeispiel: Im Nierenzellkarzinom T4 wurden fünf Perforin<sup>+</sup> Zellen analysiert, wobei vier ein diffuses Verteilungsmuster des Perforin zeigten und eine ein polares Muster aufwies.

#### 4.3.1.3. Intrazelluläre Verteilung von Perforin in Tumor infiltrierenden NK-Zellen

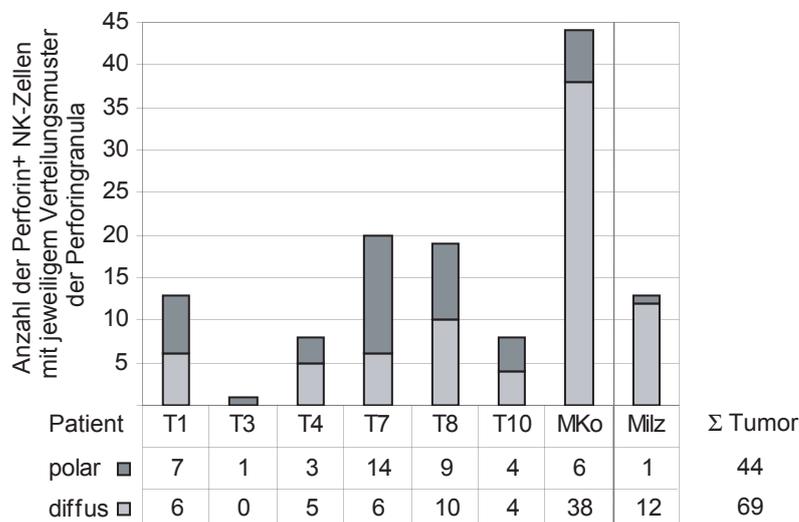
Die Doppelfärbung mit CD3 und Perforin zeigte, dass auch CD3<sup>-</sup> Zellen Perforin<sup>+</sup> waren; bei diesen Zellen handelt es sich um NK-Zellen. Auch bei diesen Zellen wurde nun die intrazelluläre Verteilung des Perforin analysiert. Insgesamt wurden 113 Perforin<sup>+</sup> NK-Zellen beurteilt, wobei 69 der 113 analysierten Perforin<sup>+</sup> NK-Zellen (das entspricht 61 %) eine diffuse Verteilung des Perforin zeigten (siehe Beispiele in Abbildung 4.13 A und Auswertung in Abbildung 4.14). Bei 44 von 113 analysierten Perforin<sup>+</sup> NK-Zellen (das entspricht 39 %) war das Perforin polar ausgerichtet (siehe Beispiele in Abbildung 4.13 B).

Im Milzgewebe (Beispiel in Abbildung 4.13 A) zeigten zwölf von 13 analysierten Perforin<sup>+</sup> NK-Zellen (entspricht 93 %) eine diffuse Verteilung (Abbildung 4.14). Im Gegensatz zu den Tumor infiltrierenden T-Zellen und den Perforin<sup>+</sup> NK-Zellen in der Milz, weisen offensichtlich fast die Hälfte der Perforin<sup>+</sup> NK-Zellen im Nierenzellkarzinom eine polare Ausrichtung ihres intrazellulären Perforin auf. Ob eine Polarisierung des Perforin bei NK-Zellen ebenso wie bei T-Zellen mit Zielzellerkennung und Ausschüttung der zytotoxischen Granula assoziiert ist, wird in der aktuellen Literatur allerdings hinterfragt [Davis, 2004] und sollte zukünftig ebenfalls anhand von Zellkulturmodellen überprüft werden.



**Abbildung 4.13: Verteilungsmuster von Perforin in NK-Zellen im Nierenzellkarzinom und in der Milz**

Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und Perforin (rot). Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Aufnahmen entstanden durch räumliche Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie und Projektion aller aufgezeichneten Schnittebenen. **A:** Beispiel einer diffusen Verteilung des Perforin in NK-Zellen im Nierenzellkarzinom und der Milz. **B:** Beispiele einer polaren Verteilung des Perforin in Tumor infiltrierenden NK-Zellen.



**Abbildung 4.14:**  
Legende siehe nachfolgende Seite

**Legende zu Abbildung 4.14: Quantifizierung der Verteilungsmuster von Perforin in NK-Zellen im Nierenzellkarzinom und in der Milz**

Die Anzahl der NK-Zellen mit diffuser (hellgrau) und polarer (dunkelgrau) Verteilung des intrazellulären Perforin ist als Abschnitt eines Balkens aufgetragen und zusätzlich in einer Wertetabelle dargestellt. Die Summe der Zellen eines Verteilungsmusters ist rechts neben dem Diagramm abgebildet; dabei sind die analysierten NK-Zellen in der Milz nicht mit einbezogen.

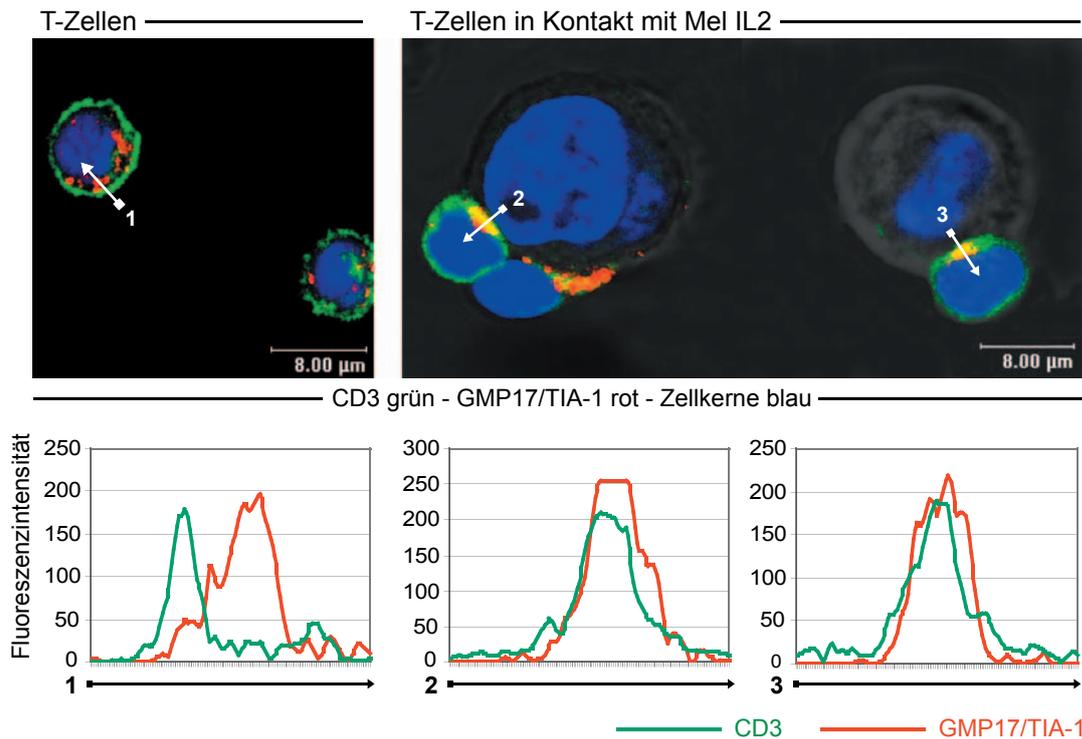
#### 4.3.1.4. Nachweis von Zielzellerkennung durch zytotoxische T-Zellen im Nierenzellkarzinom

Immunhistochemische Färbungen von Perforin im Nierenzellkarzinom zeigten, dass nur wenige Tumor infiltrierende T-Zellen Perforin exprimieren. Die mangelnde Perforinexpression könnte eine Ursache für die unzureichende Immunantwort gegen den Tumor sein. Daher ist eine Klärung der Ursache dieses Phänomens wichtig. T-Zellen sind Perforin<sup>-</sup>, wenn sie naiv sind, also noch kein ausreichendes Differenzierungsprogramm durchlaufen haben. Weiterhin könnten T-Zellen auch Perforin<sup>+</sup> sein, weil sie gerade aktiv Zielzellen erkannt und dabei ihr Perforin abgegeben haben. Zur Unterscheidung zwischen diesen Möglichkeiten ist es von Interesse, ob im Tumor eine Zielzellerkennung durch zytotoxische T-Zellen stattfindet. Um dies zu untersuchen wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD3 und GMP17/TIA-1 benutzt. GMP17/TIA-1 ist ein Protein, welches von Medley et al. 1996 in NK-Zellen erstmals beschrieben wurde [Medley, 1996]. Es handelt sich dabei um einen Membranbestandteil der intrazellulären Vesikel, die die zytotoxischen Moleküle enthalten. Die Vesikel werden im Prozess der Zielzellerkennung zur immunologischen Synapse hin polarisiert und verschmelzen mit der Plasmamembran der Effektorzelle, um die enthaltenen zytotoxischen Effektormoleküle auszuschütten. Als Ergebnis eines abgelaufenen Degranulationsprozesses sollte sich das Protein GMP17/TIA-1 folglich in der Plasmamembran der T-Zelle befinden und in Co-Lokalisation mit CD3 nachweisbar sein (siehe hierzu auch Schemazeichnung 5.1, Seite 92). Unter dieser Annahme wurde nun versucht, Zielzellerkennung und ein damit verbundenes abgelaufenes Degranulationsereignis *in situ* immunhistologisch nachweisbar zu machen.

Der Prozess der Zielzellerkennung wurde vorerst durch ein *in vitro* Modell nachvollzogen und bildgebend dargestellt. Analog zum Modell der Perforinpolarisierung wurde die Melanomzelllinie Mel IL2 mit dem T-Zellklon JB4 koinkubiert. Nachdem Zellkonjugate zwischen Effektor- und Zielzellen hergestellt worden waren, wurden diese nach 60 Minuten Inkubation immunzytologisch mit Antikörpern gegen CD3 $\epsilon$  und GMP17/TIA-1 gefärbt (gemäß Protokoll „B“, Abschnitt 3.2.6). Die intrazelluläre Lokalisation von GMP17/TIA-1 wurde anschließend mittels konfokaler Lasermikroskopie in einer Schnittebene der Zelle dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass GMP17/TIA-1 in T-Zellen ohne Kontakt zur Zielzelle

diffus im Zytoplasma der Zelle verteilt ist, ohne mit dem Oberflächensignal von CD3 $\epsilon$  zu überlagern (Abbildung 4.15 links). Eine Stunde nach Kontakt zur Zielzelle befand sich GMP17/TIA-1 an der Kontaktstelle zwischen Effektor- und Zielzelle in die Plasmamembran der T-Zelle integriert. Dies zeigte sich an der Farbüberlagerung mit dem membranständigen Oberflächenprotein CD3 $\epsilon$  (Abbildung 4.15 rechts). Zur präziseren Beurteilung der Lokalisation von CD3 und GMP17/TIA-1 zueinander wurden digitale Fluoreszenzintensitätsprofile (vgl. Kapitel 3.2.10) erstellt. Dabei wurden die Intensitäten der beiden Farbkanäle entlang einer Linie (diese ist in Abbildung 4.15 als Pfeil dargestellt) gemessen und in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 4.15 unten). Die Überlappung des roten und grünen Graphen entspricht einer Co-Lokalisation beider Strukturen (Abbildung 4.15 unten Mitte und rechts). Stellen sich beide Graphen gegeneinander versetzt dar, müssen räumlich getrennte Strukturen angenommen werden (Abbildung 4.15 unten links).

In analoger Weise wurden Gefrierschnitte aus Tumorgewebe und Tonsille immunhistologisch gefärbt und die subzelluläre Lokalisation von GMP17/TIA-1 in T-Zellen *in situ* zu bestimmen. In der Tonsille überlagerten die Signale von GMP17/TIA-1 nicht mit CD3, was für eine zytoplasmatische Lokalisation des GMP17/TIA-1 spricht (Abbildung 4.16 oben). In den Nierenzellkarzinomgeweben zeigten 30 % der GMP17/TIA-1<sup>+</sup> T-Zellen eine Konzentration des GMP17/TIA-1 auf einen engen Bereich der Zelloberfläche und gleichzeitig eine Überlagerung mit dem CD3-Signal (Abbildung 4.16 Mitte). Andere T-Zellen zeigten weder eine synaptische Anordnung noch eine Co-Lokalisation mit CD3 (Abbildung 4.16 unten). Die Beobachtungen sprechen dafür, dass zahlreiche Tumor infiltrierende T-Zellen im Nierenzellkarzinom ihre zytotoxische Granula enthaltenden Vesikel mit der T-Zelloberfläche fusioniert haben. Dieser Vorgang ist bekanntlich mit Zielzellerkennung und der Sekretion des Inhalts dieser Vesikel verbunden.



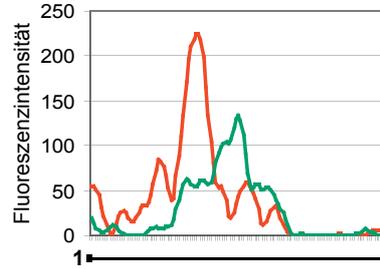
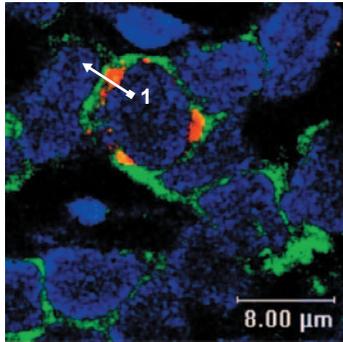
**Abbildung 4.15: Räumliche Verteilung von GMP17/TIA-1 in T-Zellklonen vor und nach Kontakt mit Zielzellen**

Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und GMP17/TIA-1 (rot) im T-Zellklon JB4. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Überlappungsbereiche von CD3 und GMP17/TIA-1 stellen sich gelb dar. Die Aufnahmen entstanden durch Auswertung mittels konfokaler Laser-mikroskopie und Darstellung einer einzelnen Schnittebene. GMP17/TIA-1 enthaltende Granula sind in T-Zellen diffus verteilt (links). Eine Stunde nach Kontakt mit spezifischen Zielzellen (große ungefärbte Zellen) ist GMP17/TIA-1 am Ort der immunologischen Synapse in die Plasmamembran der meisten T-Zellen integriert; dies wird durch die überlappenden Farbsignale mit CD3 erkennbar (rechts); intrazelluläres GMP17/TIA-1 kann zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden. Entlang den weißen Pfeilen wurden Fluoreszenzintensitätsprofile (vgl. Kapitel 3.2.10) für die Farbkanäle grün (CD3) und rot (GMP17/TIA-1) erstellt; die Linienfarbe entspricht dabei der Farbe des jeweiligen Kanals (grüne Linie = Intensitätsprofil von CD3; rote Linie = Intensitätsprofil von GMP17/TIA-1).

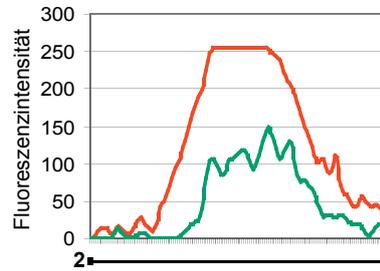
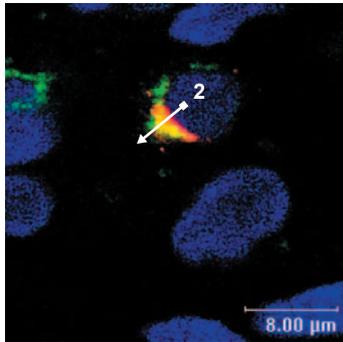
**Legende zu Abbildung 4.16: Räumliche Verteilung von GMP17/TIA-1 in Tumor infiltrierenden T-Zellen und in T-Zellen einer Tonsille**

Dargestellt sind Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und GMP17/TIA-1 (rot) in Gefrierschnitten verschiedener Gewebe. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Überlappungsbereiche von CD3 und GMP17/TIA-1 stellen sich gelb dar. Die Aufnahmen entstanden durch räumliche Auswertung mittels konfokaler Laser-mikroskopie und Darstellung einer einzelnen Schnittebene. In T-Zellen der Tonsille sind GMP17/TIA-1 enthaltende Granula diffus im Zytoplasma verteilt (oben). Die beiden Abbildungen in der Mitte zeigen Beispiele zweier T-Zellen, in denen GMP17/TIA-1 in einem definierten Areal in die Plasmamembran integriert ist. Unten ist ein Beispiel einer Tumor-infiltrierenden T-Zelle mit diffuser zytoplasmatischer Verteilung von GMP17/TIA-1 abgebildet. Entlang den weißen Pfeilen wurden Fluoreszenzintensitätsprofile für die Farbkanäle grün (CD3) und rot (GMP17/TIA-1) erstellt; die Linienfarbe entspricht dabei der Farbe des jeweiligen Kanals (grüne Linie = Intensitätsprofil von CD3; rote Linie = Intensitätsprofil von GMP17/TIA-1).

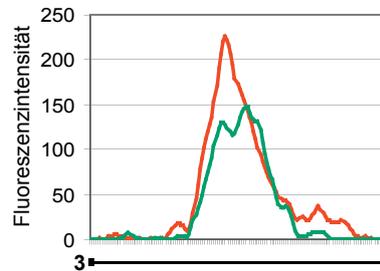
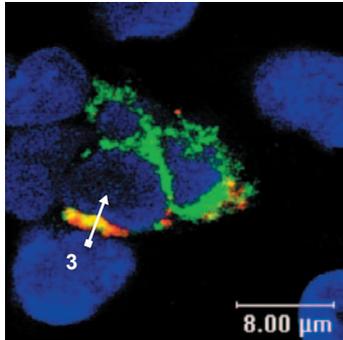
Tonsille GMP17/TIA-1 zytoplasmatisch granulär



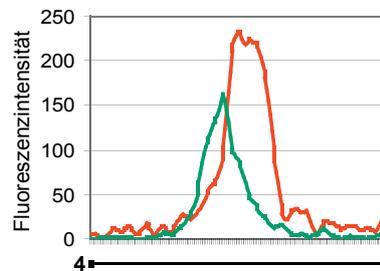
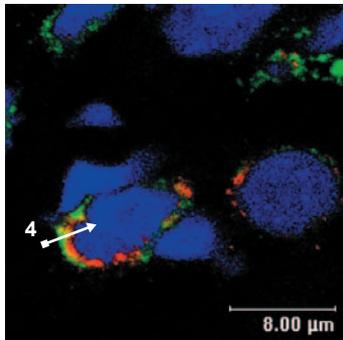
RCC T7 GMP17/TIA-1 membranständig synaptisch



RCC T8 GMP17/TIA-1 membranständig synaptisch



RCC T7 GMP17/TIA-1 zytoplasmatisch granulär



— CD3 grün - GMP17/TIA-1 rot —  
Zellkerne blau

— CD3  
— GMP17/TIA-1

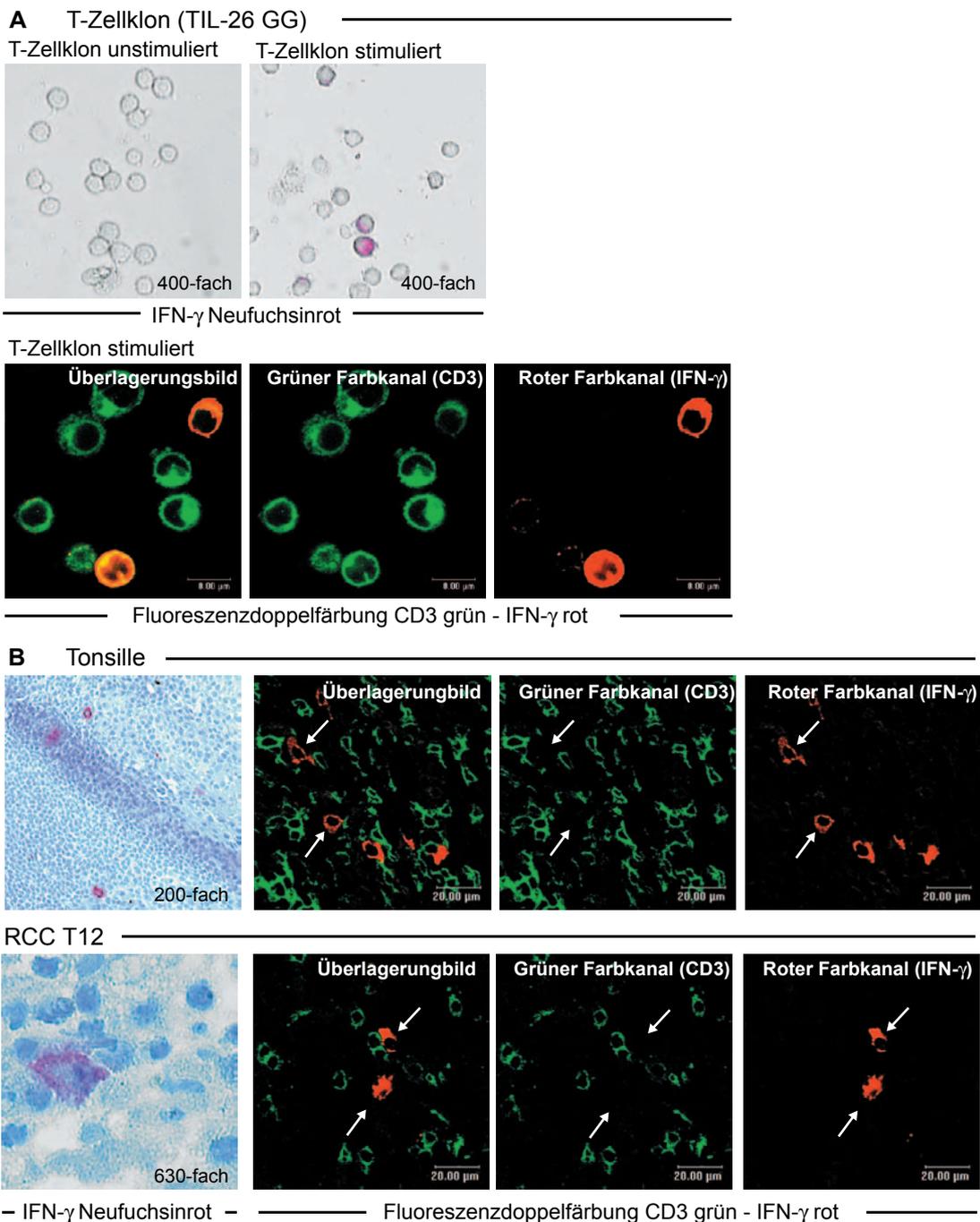
Abbildung 4.16: Legende siehe vorherige Seite

### 4.3.2. Aktivierungsstatus von Tumor infiltrierenden T-Zellen

#### 4.3.2.1. IFN- $\gamma$ Sekretion von Tumor infiltrierenden T-Zellen

Effektor-T-Zellen sezernieren nach Erkennung von spezifischem Antigen Zytokine, darunter auch das Zytokin IFN- $\gamma$ . Ein gegen humanes IFN- $\gamma$  gerichteter Antikörper (Klon B27) wurde zunächst *in vitro* getestet. Zur Initiierung einer IFN- $\gamma$  Sekretion wurde ein T-Zellklon (TIL-26 GG) chemisch mit den außerordentlich potenten Stimulantien PMA und Ionomycin inkubiert und nach sechs Stunden immunzytologisch gefärbt. Bei der Stimulation der T-Zellen wurde zusätzlich das Reagenz Brefeldin A zugegeben, welches durch Blockade des intrazellulären Vesikeltransports verhindert, dass die T-Zelle das produzierte IFN- $\gamma$  freisetzt und somit womöglich trotz Produktion von IFN- $\gamma$  keine positive Färbung zeigt. IFN- $\gamma^+$  Zellen wurden anschließend lichtmikroskopisch gezählt, wobei eine deutlich positive Färbung bei 30 % aller stimulierten Zellen beobachtet wurde (Abbildung 4.17 A oben). Weiterhin wurde eine Fluoreszenzdoppelfärbung mit CD3 durchgeführt, die quantitativ eine ähnliche Verteilung an positiven Zellen zeigte. Die IFN- $\gamma^+$  Zellen sind durch gelbe Farbüberlagerung von CD3 (grün) und IFN- $\gamma$  (rot) erkennbar. (Abbildung 4.17 A unten). Nachdem gezeigt war, dass IFN- $\gamma$  sowohl konventionell immunhistochemisch als auch mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung in T-Zellen nachweisbar ist, wurden Gefrierschnitte von zwölf verschiedenen Nierenzellkarzinomen und einer Tonsille mittels Einzelfärbung und Fluoreszenzdoppelfärbung mit CD3 immunhistologisch analysiert. In der Tonsille konnten einige IFN- $\gamma^+$  Zellen gefunden werden (Abbildung 4.17 B oben links), die in manchen Arealen auch dicht beieinander lagen (mehr als zwei Zellen/Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung). Die Fluoreszenzdoppelfärbung zeigte, dass alle IFN- $\gamma^+$  Zellen CD3 $^-$  und somit keine T-Zellen waren (Abbildung 4.17 B oben rechts).

In elf der zwölf analysierten Tumorgewebe konnten weder mit konventioneller Neufuchsin-Einzelfärbung noch mittels Fluoreszenzdoppelfärbung IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen gefunden werden. Nur im Tumorgewebe des Patienten T12 wurden mit beiden Methoden zwei IFN- $\gamma^+$  Zellen gefunden, die analog zur Tonsille CD3 $^-$  waren und auch wegen ihres breiten und teils sternförmig auslaufenden Zytoplasmas nicht der Morphologie von T-Zellen entsprachen (Abbildung 4.17 B unten). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass T-Zellen im Nierenzellkarzinom kein oder sehr geringe Mengen an IFN- $\gamma^+$  produzieren.



**Abbildung 4.17: Darstellung von IFN- $\gamma$  durch immunzytologische Färbung**

**A:** Der T-Zellklon TIL-26 GG wurde mit Ionomycin und PMA zur Produktion von IFN- $\gamma$  angeregt. Sechs Stunden später wurde IFN- $\gamma$  durch einen spezifischen Antikörper und Färbung mittels Neufuchsin (rot) in den Zellen nachgewiesen. Unstimulierte (links) und stimulierte (rechts daneben) T-Zellen sind bei 400-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch dargestellt. Darunter: Fluoreszenzdoppelfärbung stimulierter T-Zellen mit CD3 (grün) und IFN- $\gamma$  (rot); dargestellt sind sowohl das Überlagerungsbild als auch die einzelnen Farbkanäle.

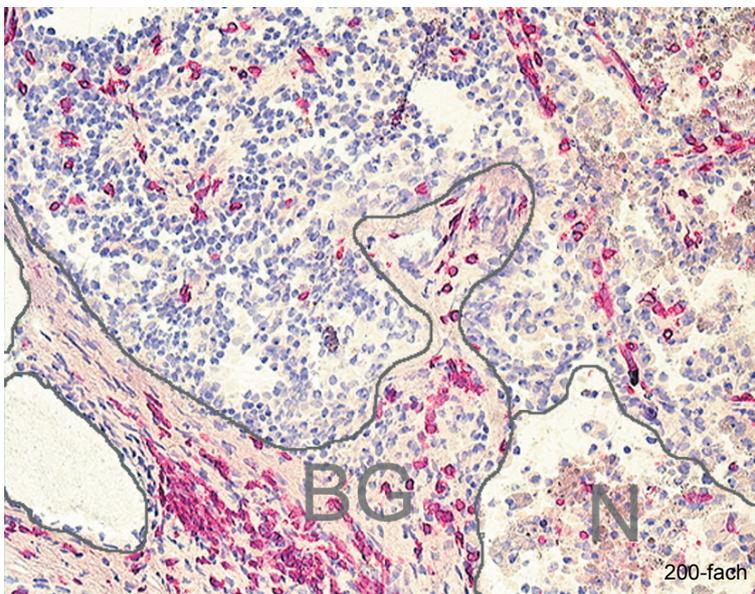
**B:** IFN- $\gamma$  produzierende Zellen wurden in Gefrierschnitten einer Tonsille (oben) und im Nierenzellkarzinom RCC T12 (unten) sowohl durch konventionelle immunhistologische Färbung (links) als auch mittels Doppelimmunfluoreszenz (rechts) dargestellt. In der Doppelfärbung sind T-Zellen grün und IFN- $\gamma$  produzierende Zellen rot dargestellt. Abgebildet sind sowohl das Überlagerungsbild als auch die einzelnen Farbkanäle. IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen (durch Pfeile gekennzeichnet) weisen durchweg kein grünes Farbsignal und somit kein CD3 auf.

#### 4.3.2.2. Expression der CD3 $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten

##### 4.3.2.2.1. Quantifizierung der Expression von CD3 $\zeta$

Die CD3 $\zeta$ -Kette ist ein Teil des CD3-Komplexes und essentieller Bestandteil der Signalkaskade in T-Zellen. Eine verminderte Expression der CD3 $\zeta$ -Kette wurde in zahlreichen Tumoren beschrieben und als eine Ursache für funktionelle Inaktivität von T-Zellen bei Tumorpatienten diskutiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob Tumor infiltrierende T-Zellen im Nierenzellkarzinom eine verminderte Expression der  $\zeta$ -Kette aufweisen. Hierzu wurden Serienschritte von Nierenzellkarzinomen von 14 verschiedenen Patienten immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD3 $\epsilon$  und die  $\zeta$ -Kette gefärbt und die Anzahl der jeweils positiven Zellen quantitativ durch Auszählung von zehn verschiedenen Gesichtsfeldern (bei 400-facher Vergrößerung) bestimmt. Es wurden hierbei nur Zellen gewertet, die im Tumorparenchym lokalisiert waren; nicht berücksichtigt wurden sämtliche Zellen, die sich im interstitiellen Bindegewebe, in nekrotischen Arealen sowie in Blutgefäßen befanden (Abbildung 4.18).

RCC S71T  
CD3 $\epsilon$ -Färbung

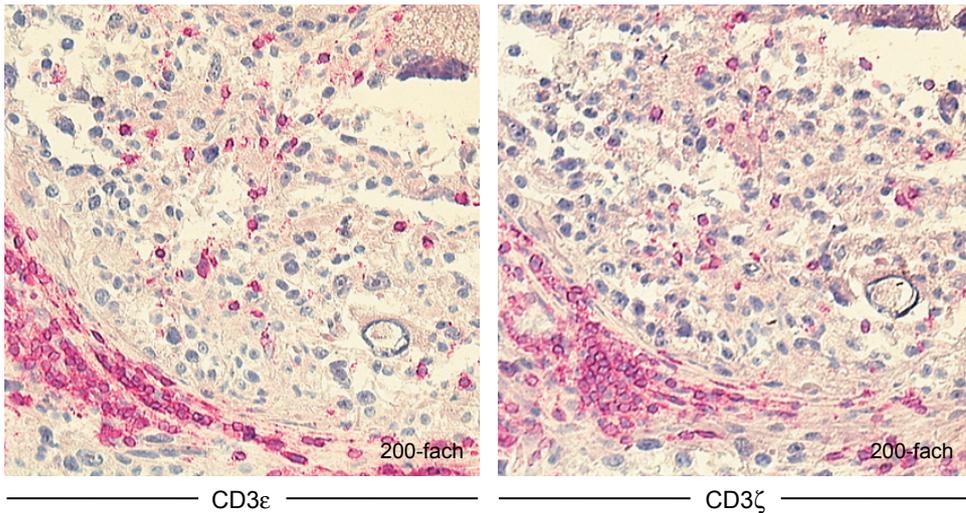


**Abbildung 4.18: T-Zellinfiltration in unterschiedlichen Arealen des Nierenzellkarzinomgewebes**

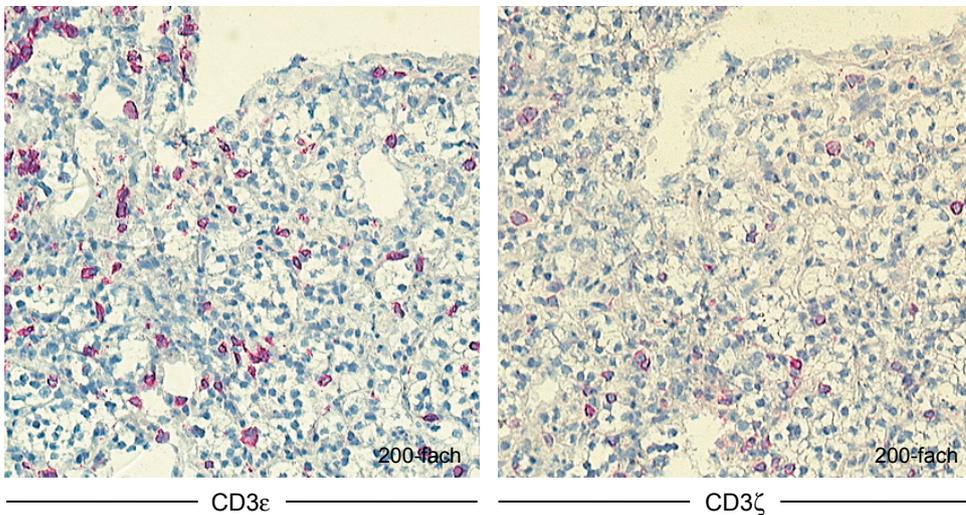
Dargestellt ist eine immunhistologische Färbung von CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> T-Zellen im Nierenzellkarzinom. Diese befinden sich im Tumorparenchym (obere Bildhälfte), im Bindegewebe des Tumors (BG, unten links) und in nekrotischen Arealen des Tumors (N, unten rechts).

Es wurde beobachtet, dass sich in manchen Nierenzellkarzinomen ebenso viele  $CD3\epsilon^+$  wie  $CD3\zeta^+$  Zellen befinden (repräsentatives Beispiel in Abbildung 4.19 oben), während in anderen Tumoren eine gegenüber  $CD3\epsilon$  deutlich reduzierte Menge an  $CD3\zeta^+$  Zellen vorliegt (repräsentatives Beispiel in Abbildung 4.19 unten).

#### RCC T3 Anzahl $CD3\zeta^+$ Zellen gegenüber $CD3\epsilon$ ausgeglichen



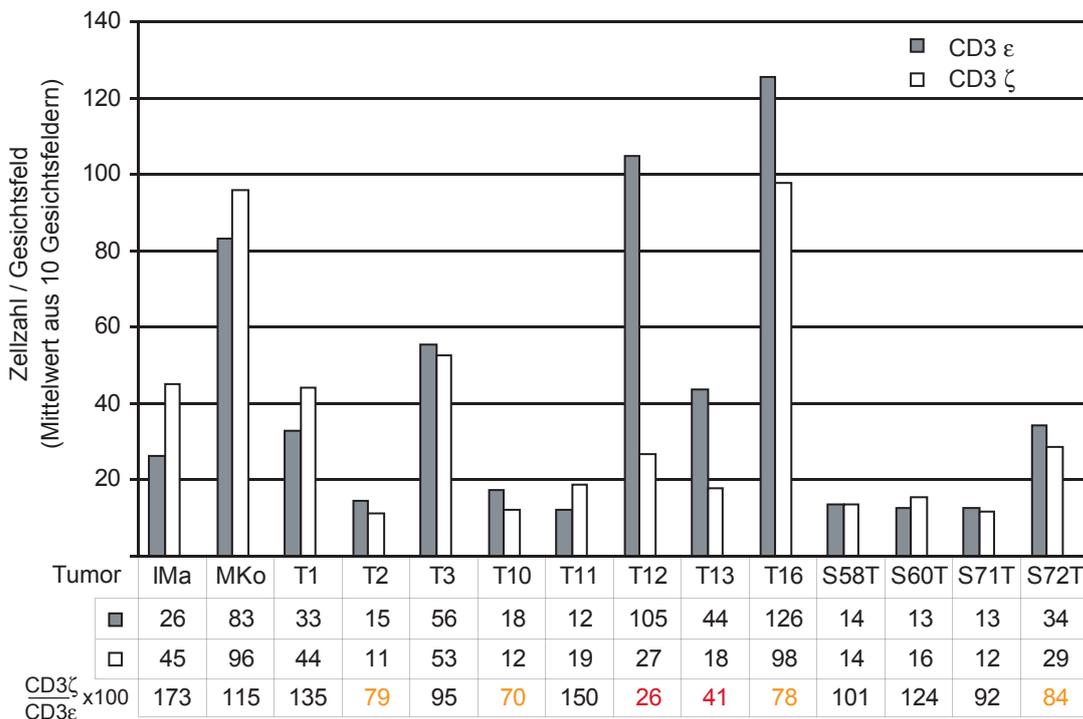
#### RCC T16 Anzahl $CD3\zeta^+$ Zellen gegenüber $CD3\epsilon$ vermindert



### Abbildung 4.19: Vergleichende Darstellung der Expression von $CD3\epsilon$ und $CD3\zeta$ in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom

Serienschnitte von Geweben verschiedener Nierenzellkarzinome wurden mit Antikörpern gegen  $CD3\epsilon$  und  $CD3\zeta$  gefärbt. Durch die Darstellung derselben Areale zweier Schnitte aus einer Serie kann die Anzahl der Zellen mit Expression des jeweiligen Proteins verglichen werden. Im dargestellten Ausschnitt des Tumors RCC T3 (oben) ist das Verhältnis der  $CD3\zeta^+$  Zellen gegenüber der Menge an  $CD3\epsilon^+$  Zellen ausgeglichen, während es im gezeigten Areal des Tumors RCC T16 (unten) vermindert ist.

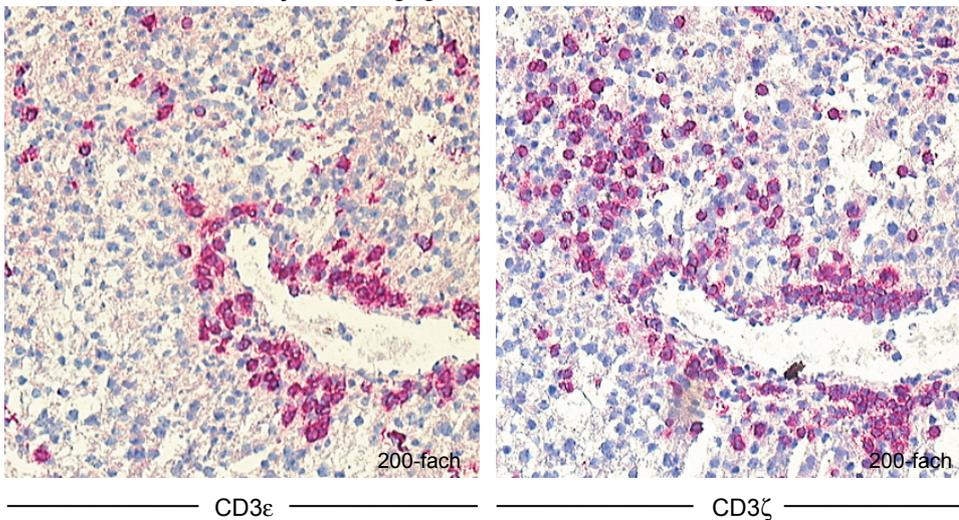
Die morphometrische Quantifizierung ergab, dass in acht der 14 analysierten Tumorpräparate mehr oder annähernd dieselbe Menge an  $CD3\epsilon^+$  und  $CD3\zeta^+$  Zellen existiert (RCC IMa, RCC MKo, RCC T1, RCC T3, RCC T11, S58T, S60T, S71T) (Abbildung 4.20). Eine moderate Verminderung der  $\zeta$ -Kette ergab sich in vier Tumoren (RCC T2, RCC T10, RCC T16 und RCC S72T) (orange Zahlen in Abbildung 4.20), wobei diese durch einen Anteil von  $CD3\zeta^+$  Zellen an der Menge der  $CD3\epsilon^+$  Zellen zwischen 70 und 90 % definiert wurde ( $70 \leq \frac{CD3\zeta}{CD3\epsilon} \times 100 \leq 90$ ). In zwei Tumoren (RCC T12, RCC T13) war die Anzahl der Zellen mit Expression der  $\zeta$ -Kette deutlich vermindert (definiert durch  $\frac{CD3\zeta}{CD3\epsilon} \times 100 < 70$ ) (rote Zahlen in Abbildung 4.20). In einigen Tumoren (RCC IMa, RCC T1 und RCC T11) wurden deutlich mehr  $CD3\zeta^+$  als  $CD3\epsilon^+$  Zellen beobachtet (Abbildung 4.21, jeweils im linken oberen Quadranten und Abbildung 4.20, weiße Balken höher als graue Balken). Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass diese Gewebe viele NK-Zellen enthalten, welche  $CD3\zeta$  exprimieren, aber  $CD3\epsilon^-$  sind.



**Abbildung 4.20 Quantifizierung von  $CD3\epsilon^+$  und  $CD3\zeta^+$  Zellen in verschiedenen Nierenzellkarzinomen**

Die Mittelwerte der Zellzahlen aus zehn Gesichtsfeldern eines Gewebes sind als Balken (grau= $CD3\epsilon$ , weiß= $CD3\zeta$ ) aufgetragen und zusätzlich in einer Wertetabelle dargestellt. In der untersten Zeile ist der prozentuale Anteil der  $CD3\zeta^+$  Zellen an der Menge der  $CD3\epsilon^+$  Zellen abgebildet. Orange Zahlen weisen dabei auf einen Anteil von weniger als 90% und rote Zahlen auf einen Anteil von weniger als 70% hin.

RCC IMA Anzahl CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> Zellen gegenüber CD3 $\epsilon$  vermehrt

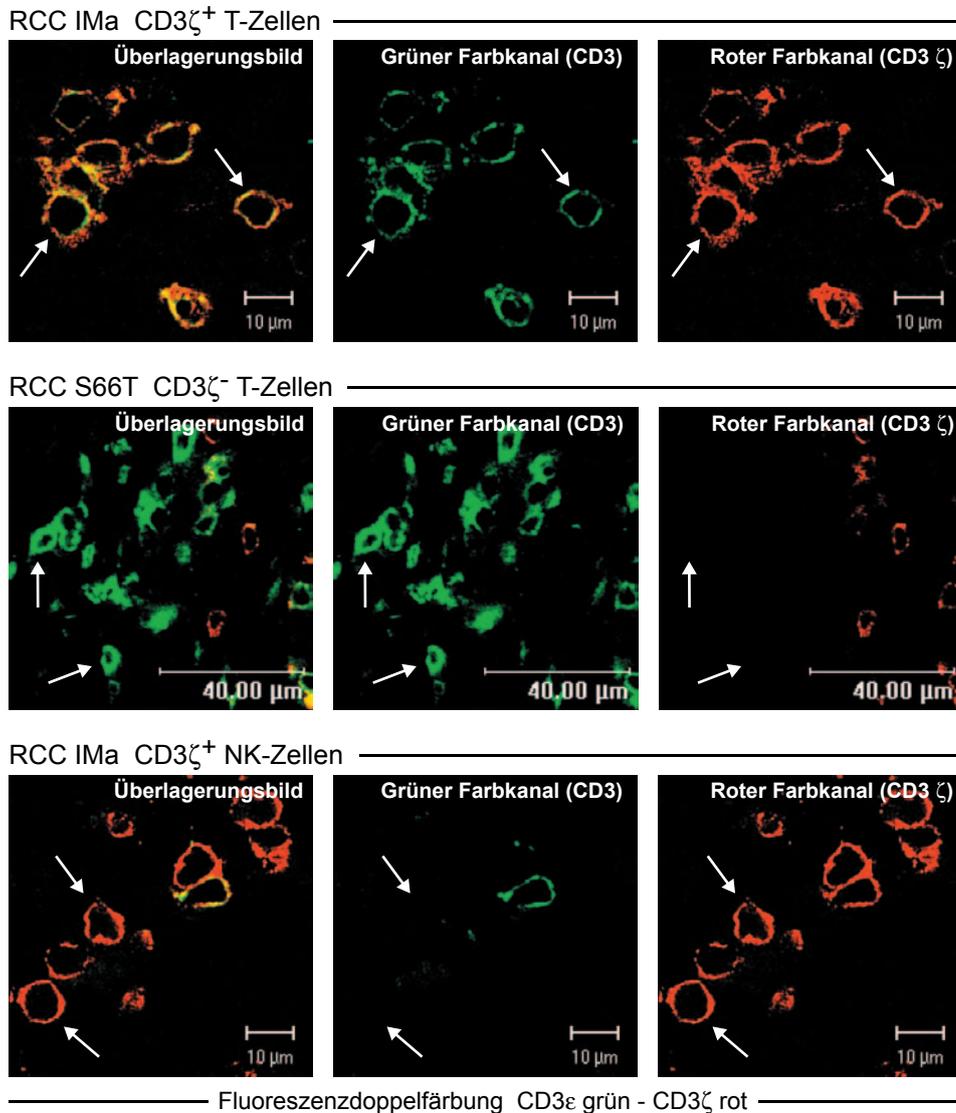


**Abbildung 4.21: Tumoreal mit einer gegenüber CD3 $\epsilon$  erhöhten Expression an CD3 $\zeta$**

Dargestellt sind Serienschritte eines Tumoreals im Nierenzellkarzinom RCC IMA, in dem eine gegenüber CD3 $\epsilon$  vermehrte Anzahl von CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> Zellen auffällt (links oben im Bild). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>/CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> NK-Zellen.

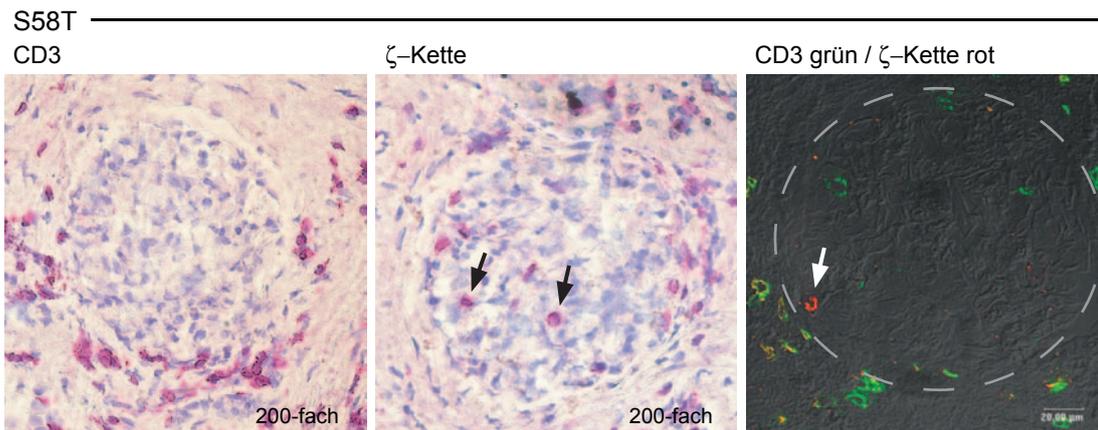
Die Anwesenheit von CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> NK-Zellen führt zu der Problematik, Einzelfärbungen und deren morphometrische Gegenüberstellung mit CD3 $\epsilon$  zur Bewertung einer möglichen Abregulation der  $\zeta$ -Kette in T-Zellen heranziehen zu wollen. In Geweben, die zahlreiche CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> NK-Zellen enthalten, kann auf diese Weise eine Abregulierung der  $\zeta$ -Kette in T-Zellen unerkannt bleiben, weil die Anzahl von CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>/CD3 $\zeta$ <sup>-</sup> T-Zellen durch CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup>/CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> NK-Zellen ersetzt sein kann.

Um die Frage eines Verlusts der CD3 $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden T-Zellen zufriedenstellender zu beantworten, wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung von CD3 $\epsilon$  und CD3 $\zeta$  durchgeführt. Diese erlaubt zwischen CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> T-Zellen, CD3 $\zeta$ <sup>-</sup> T-Zellen und CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> NK-Zellen zu unterscheiden. Abbildung 4.22 zeigt repräsentative Beispiele von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen, wobei CD3 $\epsilon$  dabei grün und CD3 $\zeta$  rot dargestellt ist (Färbung nach Protokoll „A“, siehe Abschnitt 3.2.6). CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> T-Zellen zeigen sowohl ein grünes (CD3) als auch ein rotes (CD3 $\zeta$ ) Farbsignal und stellen sich im Überlagerungsbild gelb dar (Abbildung 4.22 oben), während T-Zellen mit fehlender Expression der  $\zeta$ -Kette zwar grün (CD3), aber nicht rot (fehlende  $\zeta$ -Kette) sind (Abbildung 4.22 Mitte). CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> NK-Zellen weisen kein grünes (fehlende Expression von CD3 $\epsilon$ ), aber ein rotes Signal auf (CD3 $\zeta$ ) (Abbildung 4.22 unten). Abbildung 4.23 demonstriert die Präsenz von NK-Zellen durch eine parallele Färbung von Serienschritten mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz. In beiden Färbungen erkennt man ein rundes parenchymatöses Areal, in dem keine CD3<sup>+</sup> T-Zellen (links), aber vereinzelt CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> Zellen und somit wahrscheinlich NK-Zellen (Mitte) vorliegen. Die Doppelimmunfluoreszenzdarstellung bestätigt das Vorhandensein dieser CD3 $\zeta$ <sup>+</sup>/CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup> Zellen (Abbildung 4.23 rechts; rote Zelle im linken unteren Quadranten).



#### Abbildung 4.22: Doppelimmunfluoreszenz von CD3 $\epsilon$ und CD3 $\zeta$ in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom

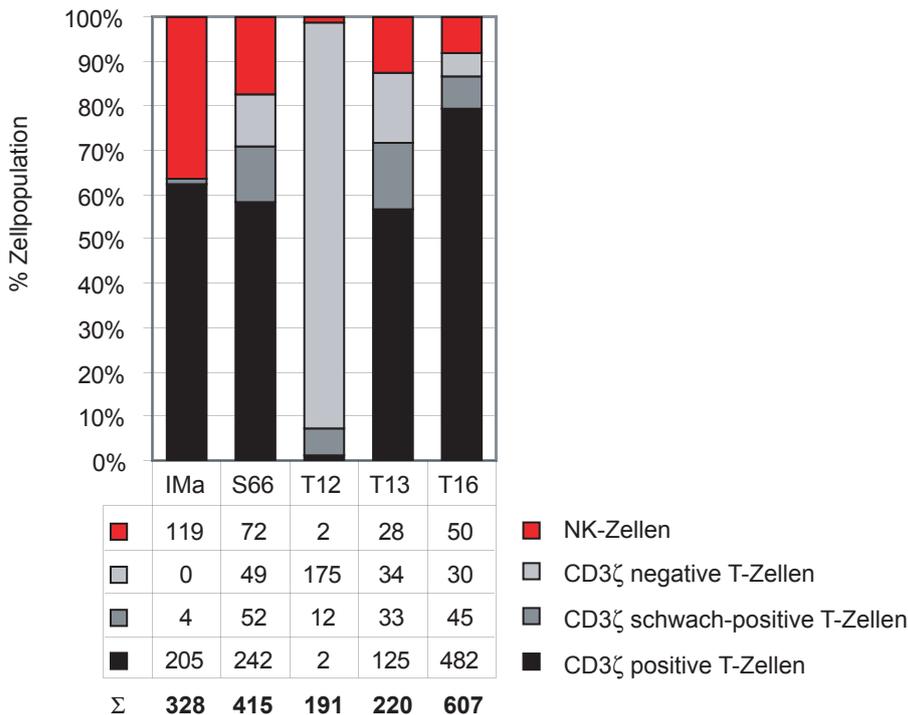
Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und der CD3 $\zeta$ -Kette (rot) in Gefrierschnitten verschiedener Nierenzellkarzinome. Überlappungsbereiche von CD3 und der CD3 $\zeta$ -Kette stellen sich gelb dar. Die Aufnahmen entstanden durch Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie und Darstellung einer einzelnen Schnittebene. Dargestellt sind jeweils ein Überlagerungsbild und Bilder der einzelnen Farbkanäle. Demonstriert werden sollen Beispiele von T-Zellen mit voller Expression der CD3-Kette (RCC IMa, oben), von T-Zellen ohne Expression von CD3 $\zeta$  (RCC S66T, Mitte) und von CD3 $\epsilon$ <sup>-</sup> NK-Zellen mit Expression der CD3 $\zeta$ -Kette (RCC IMa, unten).



**Abbildung 4.23: Darstellung von NK-Zellen durch immunhistochemische Färbung und Doppelimmunfluoreszenz in Serienschnitten**

Dargestellt sind Aufnahmen aus Serienschnitten eines markanten Gewebeareals, welches durch ein im Bindegewebe befindliches rundes Areal aus Tumorparenchym charakterisiert ist. Aus der immunhistochemischen Färbung ist zu ersehen, dass sich  $CD3\epsilon^+$  T-Zellen eher im Bindegewebe befinden (linkes Bild), während einige  $CD3\zeta^+$  Zellen insbesondere im Parenchym liegen (Mitte, schwarze Pfeile). Durch Darstellung mittels Phasenkontrast kann auch in der Fluoreszenzdoppelfärbung das parenchymatöse runde Areal dargestellt werden (zur besseren Erkennbarkeit grau umrandet) und es wird deutlich, dass es sich bei der  $CD3\zeta^+$  Zelle aufgrund der Negativität für CD3 um eine NK-Zelle handelt (weißer Pfeil). Durch die Abbildung soll demonstriert werden, dass bereits anhand von immunhistochemisch gefärbten Serienschnitten zwischen T-Zellen und NK-Zellen unterschieden werden kann. Die Doppelimmunfluoreszenz zeigt sich als geeignete Methode zur sicheren Identifizierung zwischen beiden Zelltypen.

Fünf verschiedene Nierenzellkarzinomgewebe wurden nun mittels Doppelimmunfluoreszenz und Färbung von  $CD3\epsilon$  und  $CD3\zeta$  analysiert. Abbildung 4.24 zeigt den prozentualen Anteil von  $CD3\zeta^+$  T-Zellen,  $CD3\zeta^{\text{schwach}+}$  T-Zellen,  $CD3\zeta^-$  T-Zellen und  $CD3\zeta^+$  NK-Zellen zueinander, wobei die Gesamtheit der T-Zellen und  $CD3\zeta^+$  NK-Zellen als "100 %" definiert wurde. Die absolute Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen ist dabei für jeden analysierten Tumor unterhalb des Balkendiagramms dargestellt (Abbildung 4.24). Im Tumor des Patienten IMA wurde ein hoher Anteil von NK-Zellen (119 NK-Zellen von insgesamt 328 bewerteten Zellen) identifiziert. Bereits in der Einzelfärbung ließ sich dieser hohe NK-Zell-Anteil aufgrund der Tatsache, dass mehr  $CD3\zeta^+$  Zellen als T-Zellen gefunden wurden, vermuten (Abbildung 4.20). Auch die in der Einzelfärbung deutlich zu erkennende Abregulation von  $CD3\zeta$  in den T-Zellen der Tumore RCC T12 und RCC T13 (siehe Abbildung 4.20) konnte durch Doppelfärbung bestätigt werden (RCC T12: 175  $CD3\zeta^-$  und 12  $CD3\zeta^{\text{schwach}+}$  Zellen von insgesamt 191 bewerteten Zellen; RCC T13: 34  $CD3\zeta^-$  und 33  $CD3\zeta^{\text{schwach}+}$  Zellen von insgesamt 220 bewerteten Zellen) (Abbildung 4.24).

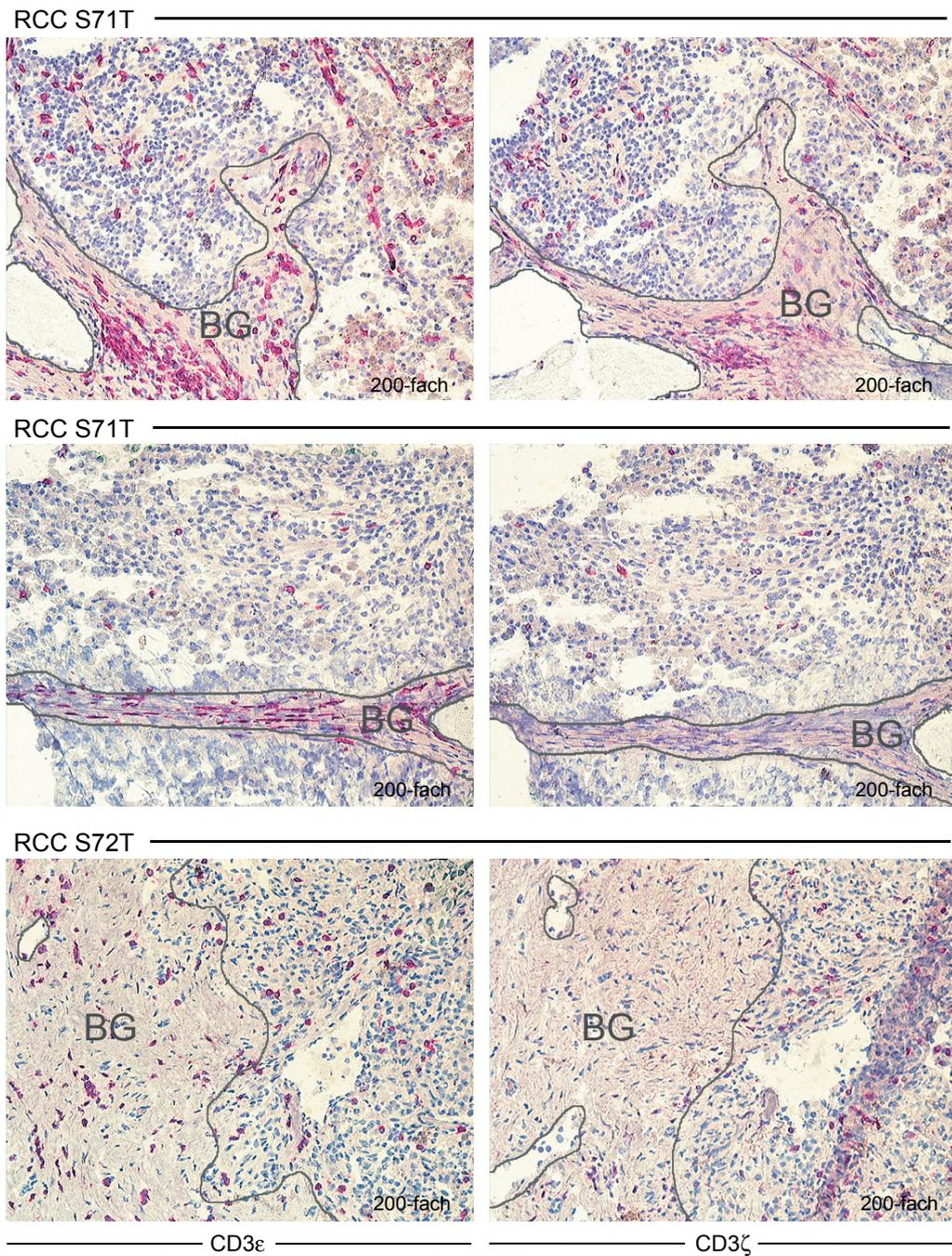


**Abbildung 4.24: Expression der CD3ζ-Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom**

Dargestellt ist die relative Menge an gefundenen CD3ζ<sup>+</sup> T-Zellen (schwarz), T-Zellen mit schwacher Expression von CD3ζ (grau), CD3ζ<sup>-</sup> T-Zellen (hellgrau) und CD3ζ<sup>+</sup> NK-Zellen (rot) untereinander. Die Menge aller T-Zellen zusammen mit den CD3ζ<sup>+</sup> NK-Zellen ist dabei als „100 %“ definiert. Die absoluten Mengen der jeweiligen Subpopulationen sind unten in einer Wertetabelle dargestellt.

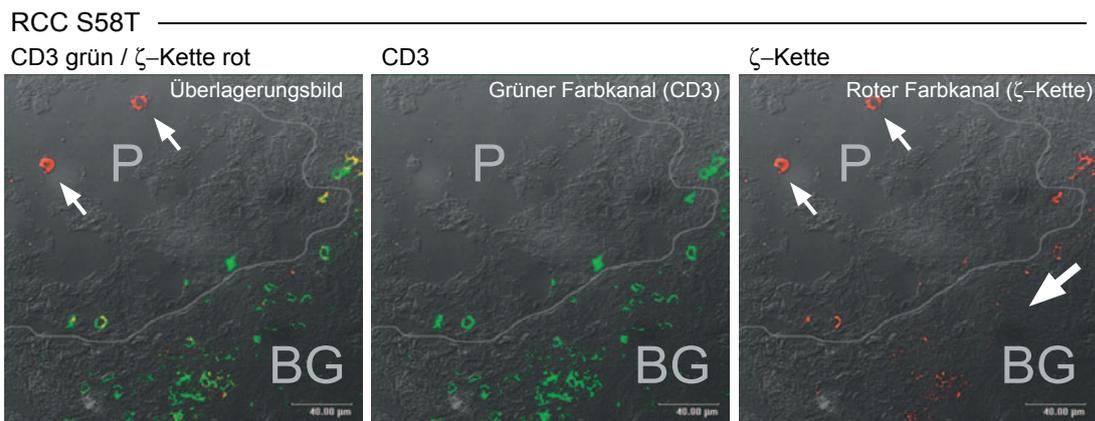
#### 4.3.2.2.2. Die CD3ζ-Expression im Tumorstroma

Bei der Bewertung der CD3ζ-Färbung fiel auf, dass Farbintensität und Expressionsdichte der CD3ζ-Kette in Bindegewebsarealen einiger Tumoren erheblich reduziert waren, während dies im unmittelbar benachbarten Tumorparenchym nicht der Fall war. Abbildung 4.25 zeigt dies beispielhaft für die Tumoren RCC S71T und RCC S72T. Auch mittels Doppelimmunfluoreszenz konnte eine Abregulation der ζ-Kette im Tumorstroma beobachtet werden (Abbildung 4.26). Durch Phasenkontrastdarstellung kann hier das dichter gerasterte Bindegewebe ("BG"; rechter unterer Teil der Abbildung) vom locker strukturierten Tumorparenchym ("P"; linker oberer Teil der Abbildung) abgegrenzt werden. Im Bindegewebe befinden sich zahlreiche T-Zellen (grün), welche zum größten Teil CD3ζ<sup>schwach+</sup> oder CD3ζ<sup>-</sup> sind (großer Pfeil in Abbildung 4.26). Der Nachweis einer technisch einwandfreien Färbung der ζ-Kette wird dabei durch zwei im Tumorparenchym liegende NK-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD3ζ<sup>+</sup>; folglich rot, aber nicht grün) erbracht (Abbildung 4.26, durch kleine Pfeile markierte Zellen).



**Abbildung 4.25: Vergleich der Expression von CD3 $\zeta$  und CD3 $\epsilon$  in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im interstitiellen Bindegewebe und Tumorparenchym**

Serienschnitte von Gewebe verschiedener Nierenzellkarzinome wurden mit Antikörpern gegen CD3 $\epsilon$  und die CD3 $\zeta$ -Kette gefärbt. Durch die Darstellung derselben Areale in zwei Schnitten aus einer Serie kann die Anzahl der Zellen mit Expression des jeweiligen Proteins verglichen werden. Anteile von interstitiellem Bindegewebe (BG) sind grau umrandet abgebildet. Die Anzahl der Zellen mit Expression der CD3 $\zeta$ -Kette ist in den Bindegewebsarealen des Tumors gegenüber der Menge an CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> Zellen deutlich reduziert. Im unmittelbar benachbarten Tumorparenchym hingegen ist das Verhältnis ausgeglichen.



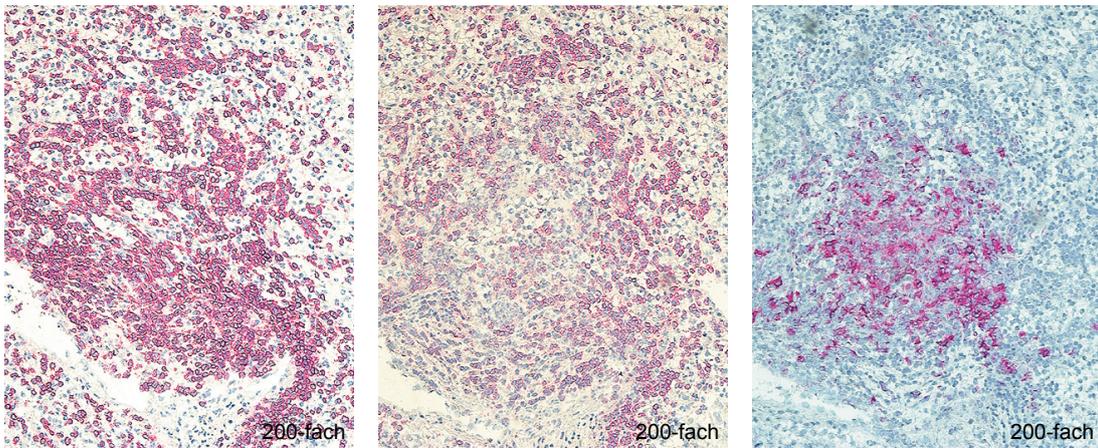
**Abbildung 4.26: Vergleich der Expression von CD3 $\zeta$  in T-Zellen im interstitiellen Bindegewebe und Tumorparenchym mittels Doppelimmunfluoreszenz und Phasenkontrastdarstellung**

Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und der  $\zeta$ -Kette (rot) im Nierenzellkarzinom RCC S58T. Die Aufnahmen entstanden durch Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie und Darstellung einer einzelnen Schnittebene. Die Durchlichtaufnahme unter Phasenkontrastanalyse ermöglicht die Erkennung der Gewebestruktur. Bindegewebige Anteile stellen sich im Phasenkontrast dichter dar als Tumorparenchym. Die Grenze zwischen interstitiellem Bindegewebe des Tumors (BG, rechte Bildhälfte) und dem Tumorparenchym (P, linke obere Bildhälfte) ist durch eine graue Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind ein Überlagerungsbild und Bilder der einzelnen Farbkanäle. Zahlreiche T-Zellen im Bindegewebe exprimieren keine CD3 $\zeta$ -Kette (großer Pfeil). Im oberen Bildbereich befinden sich zwei CD3 $\epsilon^-$ /CD3 $\zeta^+$  NK-Zellen (kleine Pfeile).

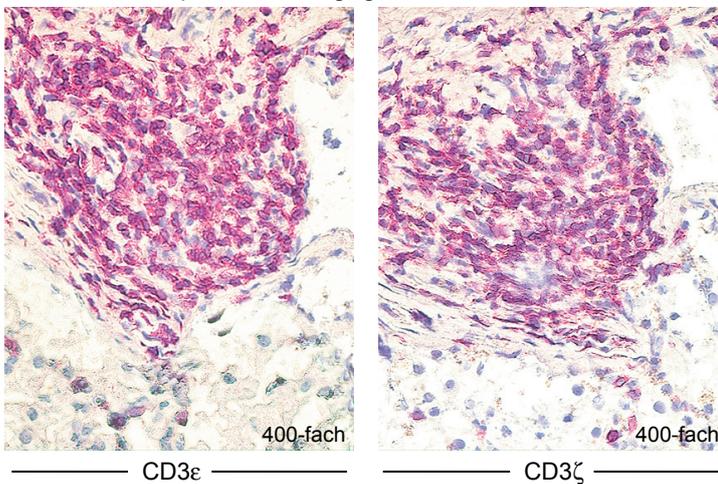
#### 4.3.2.2.3. Die CD3 $\zeta$ -Expression in Lymphozytenansammlungen

Bei der Beschreibung der Verteilung reifer dendritischer Zellen im Nierenzellkarzinom wurde bereits darauf hingewiesen, dass in diesem Gewebe häufig Formationen beobachtet werden, in denen zahlreiche T-Zellen gemeinsam mit reifen DC-Lamp<sup>+</sup> dendritischen Zellen in Akkumulationen liegen (Abbildung 4.7 und 4.27). Bei der Bewertung der  $\zeta$ -Kettenfärbung fiel auf, dass die Expression der  $\zeta$ -Kette im Vergleich zu CD3 $\epsilon$  in diesen Arealen in unterschiedlichem Ausmaß vermindert war. Die Quantifizierung ergab eine Mindereexpression von CD3 $\zeta$  in elf von 19 analysierten T-Zell-Anhäufungen in zehn verschiedenen Nierenzellkarzinomen. Abbildung 4.27 zeigt zwei repräsentative Beispiele von mit CD3 $\epsilon$  und CD3 $\zeta$  gefärbten Serienschnitten, wobei in einem Fall eine deutliche Abregulation der  $\zeta$ -Kette im Zentrum der T-Zellanhäufung erkennbar ist (RCC T16 oben), während die Expression von CD3 $\epsilon$  und CD3 $\zeta$  im anderen Beispiel ausgeglichen ist (RCC S58T unten). Für den Tumor RCC T16 existiert weiterhin ein Serienschnitt mit Färbung von DC-Lamp, wodurch die Lokalisation dieser dendritischen Zellen im Areal der  $\zeta$ -Kettenabregulation demonstriert werden kann. Bei genauer Betrachtung der Serienschnitte dieses Tumors fällt weiterhin auf, dass die Mindereexpression von CD3 $\zeta$  im Zentrum der Anhäufung ausgeprägter ist, als in den Randbereichen, in denen kaum DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen liegen.

## RCC T16 Expression vermindert



## RCC S58T Expression ausgeglichen



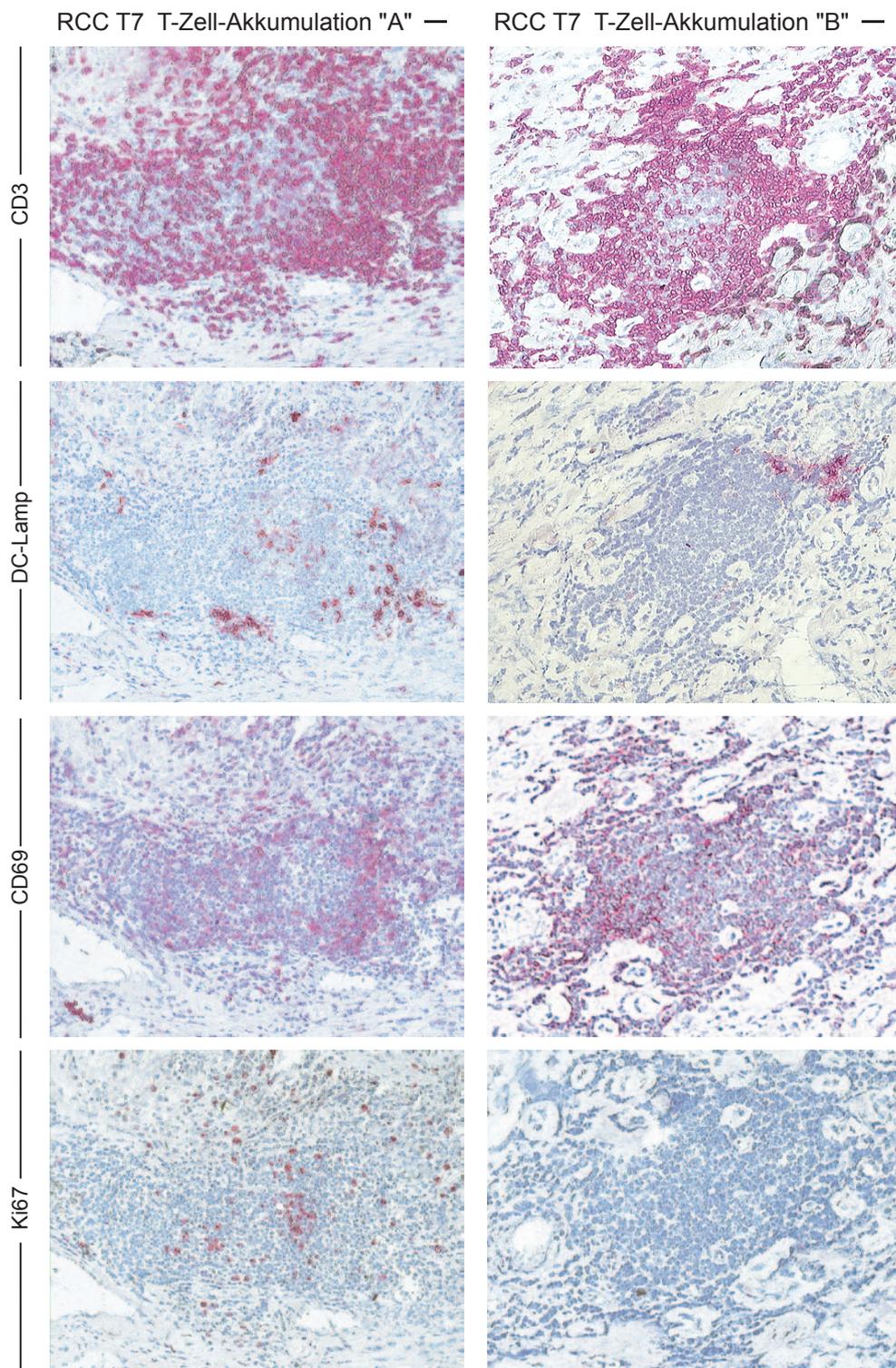
DC-Lamp

**Abbildung 4.27: Expression der ζ-Kette in T-Zell-Akkumulationen**

Serienschnitte von Gewebe verschiedener Nierenzellkarzinome wurden mit Antikörpern gegen CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$  und DC-Lamp gefärbt. Durch Farbreaktion mit Neufuchsin stellen sich diese rot dar; das Gewebe ist mit Hämalaun gegengefärbt. Im Gewebe RCC T16 (oben) ist die Expression von CD3 $\zeta$  (Mitte) im Zentrum der Akkumulation vermindert, während sie im Randbereich erhalten ist. Im Zentrum befinden sich auch DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen (rechts). In der dargestellten T-Zell-Akkumulation des Gewebes RCC S58T ist die Expression von CD3 $\zeta$  gegenüber CD3 $\epsilon$  ausgeglichen (unten).

## 4.3.2.3. Die Expression von CD69 in Tumor infiltrierenden Lymphozyten

Zur Bestimmung des Aktivierungsstatus der in Akkumulationen befindlichen T-Zellen wurden Serienschnitte von Nierenzellkarzinomen immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD3 $\epsilon$  und CD69 gefärbt. Das Oberflächenantigen CD69 wird von aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und NK-Zellen exprimiert. Im Nierenzellkarzinomgewebe wurden CD69<sup>+</sup> Zellen sowohl vereinzelt im Tumorparenchym als auch in T-Zellakkumulationen nachgewiesen (Abbildung 4.28). Ob es sich bei den nachgewiesenen CD69<sup>+</sup> Zellen allerdings tatsächlich um T-Zellen handelt, müsste durch Doppelfärbung gezeigt werden.



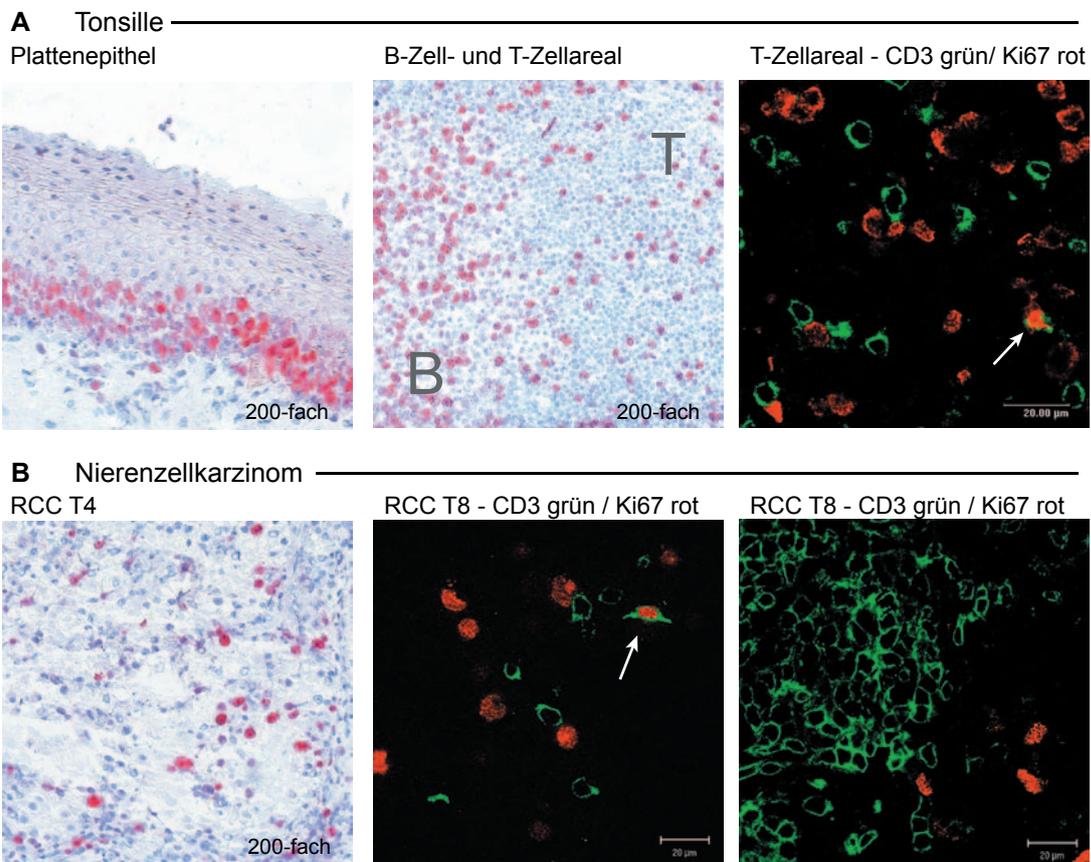
**Abbildung 4.28: Expression von CD3, DC-Lamp, CD69 und Ki67 in T-Zellanhäufungen**  
Dargestellt sind Serienschnitte zweier T-Zellanhäufungen („A“ linke Spalte und „B“ rechte Spalte) im Nierenzellkarzinom RCC T7, die mit Antikörpern gegen CD3, DC-Lamp, CD69 und Ki67 gefärbt wurden (200-fache Vergrößerung). CD69<sup>+</sup> Zellen befinden sich in beiden Anhäufungen, während Ki67<sup>+</sup> Zellen nur in der Anhäufung „A“ vorhanden sind.

#### 4.3.2.4. Proliferation von Tumor infiltrierenden T-Zellen

Proliferierende Zellen können durch Expression von Ki67 erkannt werden [Gedes, 1984]. Ki67 ist ein Protein, welches nur in der Phase aktiver Zellteilung im Zellkern der proliferierenden Zellen gefunden wird [Endl, 2000].

Durch immunhistologische Färbung einer Tonsille wurde gezeigt, dass Ki67 als Marker für proliferierende Zellen geeignet ist; so wurden Ki67<sup>+</sup> Zellen in der Proliferationszone des Plattenepithels der Tonsille (Abbildung 4.29 A links) und in den B-Zell- und T-Zellarealen identifiziert, wobei in den B-Zellarealen stärkere proliferative Aktivität nachgewiesen wurde (Abbildung 4.29 A Mitte). Die Immunfluoreszenz-doppelfärbung mit CD3 (grün) ermöglicht den Nachweis von Ki67<sup>+</sup> T-Zellen (mit Pfeil markierte Zelle in Abbildung 4.29 A rechts).

Zur Klärung der Frage, ob T-Zellen im Nierenzellkarzinom – und dort insbesondere in den oben beschriebenen T-Zell-Akkumulationen – proliferative Aktivität zeigen, wurden exemplarisch drei Tumorgewebe (RCC T4, RCC T7 und RCC T8) immunhistologisch untersucht. Dabei wurden vereinzelt Ki67<sup>+</sup> Zellen gefunden (Abbildung 4.29 B links) und durch Doppelimmunfluoreszenz wurde gezeigt, dass sich darunter auch wenige Ki67<sup>+</sup> T-Zellen befanden (Abbildung 4.29 B Mitte). In den T-Zellanhäufungen des Tumors RCC T8 konnten keine Ki67<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.29 B rechts). Eine immunhistochemische Färbung von Serienschnitten des Tumors RCC T7 zeigte in einer T-Zell-Akkumulation ("A") reichlich Ki67<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 4.28 linke Spalte), wobei in dieser T-Zellanhäufung auch DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen lagen. Da es sich bei der vorliegenden Darstellung um eine Einzelfärbung handelt, kann allerdings nicht entschieden werden, ob es sich bei den Ki67<sup>+</sup> Zellen um T-Zellen handelt. In einer weiteren T-Zellansammlung ("B") des gleichen Tumorgewebes, in der sich nur wenige DC-Lamp<sup>+</sup> dendritische Zellen im Randbereich befanden (Abbildung 4.28 rechte Spalte), konnten keine proliferierenden Zellen identifiziert werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Präsenz reifer dendritischer Zellen im Nierenzellkarzinom und hiermit räumlich assoziierter Zellproliferation muss durch Analyse größerer Fallzahlen erfolgen.



**Abbildung 4.29: Expression von Ki67 in T-Zellen in Tonsille und Nierenzellkarzinom**

**A:** Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen von Ki67 in einer Tonsille sowie ein Beispiel einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit CD3. Links: In der basalen Zone des Plattenepithels der Tonsille befinden sich zahlreiche Ki67<sup>+</sup> Zellen. Mitte: In der B-Zellregion („B“) der Tonsille befinden sich mehr Ki67<sup>+</sup> Zellen als in der T-Zellregion („T“). Rechts: In der Fluoreszenzdoppelfärbung ist eine Ki67<sup>+</sup> T-Zelle dargestellt (Pfeil).

**B:** Links: Im Tumorgewebe RCC T4 befinden sich zahlreiche Ki67<sup>+</sup> Zellen. Mitte: Die Abbildung zeigt den Nachweis einer Ki67<sup>+</sup> T-Zelle (Pfeil) im Gewebe des Tumors RCC T8. Rechts: In einer Akkumulation von T-Zellen im Tumor RCC T8 befinden sich keine Ki67<sup>+</sup> T-Zellen. Die Aufnahme entstand durch Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie und Darstellung einer einzelnen Schnittebene.

#### 4.4. CCL5 als Effektormolekül zytotoxischer T-Zellen

Das Protein CCL5 war bislang insbesondere als Chemokin bekannt. Erst kürzlich wurden weitere Funktionen von CCL5 beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass CCL5 eine antiapoptotische Wirkung auf Virus-infizierte Makrophagen hat [Tyner, 2005] und bei der Interaktion von T-Zellen mit Antigen präsentierenden Zellen möglicherweise eine co-stimulatorische Wirkung auf T-Zellen besitzt [Molon, 2005]. Im Rahmen der Entwicklung einer reifen zytotoxischen T-Zelle wird CCL5 in etwa am fünften Tag der T-Zellreifung und zeitgleich mit den Effektormolekülen Perforin, Granzym A und B in der T-Zelle gebildet [Ortiz, 1997]. Trotz dieser Gemeinsamkeit von CCL5 mit den Apoptose induzierenden Zytotoxinen konnte bisher keine Verbindung des Proteins mit der zytotoxischen Effektorfunktion von T-Zellen hergestellt werden. Das Verhalten von CCL5 im Rahmen der Zielzellerkennung durch reife zytotoxische T-Zellen wurde hier anhand eines *in vitro* Modells, bestehend aus einer humanen Tumorzelllinie, die spezifisch durch einen zytotoxischen T-Zellklon erkannt wird, untersucht. Als Zielzelle wurde dabei die Melanomzelle MelG3.04A12IL2 (Mel IL2) verwendet, welche auf HLA-A2 das Peptid Tyrosinase präsentiert. Der zytotoxische T-Zellklon TyrF8 erkennt spezifisch das auf HLA-A2 gebundene Tyrosinase-Peptid und wurde daher als Effektorzelle gegen Mel IL2 eingesetzt. Zur Verstärkung der Präsentation von Tyrosinase wurden Mel IL2 zusätzlich in einer mit Tyrosinase-Peptid angereicherten Lösung vorinkubiert. Für negative Kontrollen wurde die Zielzelle Mel A375 verwendet; hierbei handelt es sich ebenfalls um eine HLA-A2<sup>+</sup> Melanomzelllinie, die aber kein Tyrosinase-Peptid präsentiert. Der T-Zellklon TyrF8 erkennt folglich nur die Zielzelle Mel IL2, während die Tumorzelle Mel A375 nicht erkannt wird. Beide Melanomzelllinien exprimieren kein eigenes CCL5.

##### 4.4.1. CCL5 wird bei Kontakt mit Zielzellen zusammen mit Perforin ausgeschüttet

Zuerst wurde getestet, ob durch Kontakt mit der Zielzelle CCL5 zeitgleich mit dem Effektormolekül Perforin von der T-Zelle ausgeschüttet wird. Hierzu wurden TyrF8 und Mel IL2 im Verhältnis 1:1 gemischt und die Präsenz dieser Proteine in TyrF8 nach verschiedenen Zeitpunkten (20, 40, 60 min und 6 h) mittels durchflusszytometrischer Untersuchung (FACS) gemessen. Die Zellen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten fixiert und für eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin und CCL5 mit Saponin-Lösung permeabilisiert. Die Tumorzellen wurden vorher mit dem Farbstoff CFSE markiert, um sie im Durchflusszytometer nicht nur anhand der unterschiedlichen Größe oder Granularität von den T-Zellen unterscheiden zu können. Das Analysefenster (engl. „gate“) für die T-Zellklone wurde durch die Schnittmenge aus CFSE<sup>-</sup> Zellen (Abbildung 4.30 A; roter Anteil) und Zellen mit T-Zell-ähnlicher

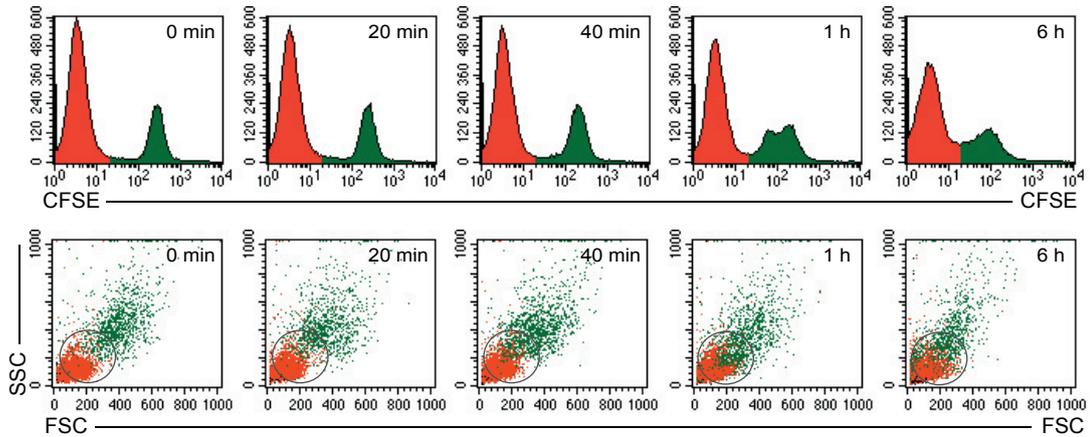
Größe (Abbildung 4.30 A; graue Kreise) definiert. Die Fluoreszenzintensität von Perforin und CCL5 in den T-Zellen wurde in einem Histogramm mit logarithmischer Skala aufgetragen (Abbildung 4.30 B). Die Färbung mit einem nicht bindenden Kontrollantikörper des gleichen Isotyps ist darin gestrichelt dargestellt. Die mediane Fluoreszenzintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde in einem Balkendiagramm relativ zur Anfangsintensität (0 min = 100 %) dargestellt (Abbildung 4.30 C). Die Degranulation von Perforin ist bereits 20 Minuten nach Zielzellkontakt nachweisbar (nur noch 87 % der initialen Fluoreszenzintensität) und schreitet bis zur einer Stunde danach fort (nach einer Stunde noch 52 % der initialen Fluoreszenzintensität) (Abbildung 4.30 C). Auch in der Histogrammdarstellung (Abbildung 4.30 B; untere Zeile) ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von Perforin erkennbar, erscheint allerdings wegen der logarithmischen Skala nicht sehr prominent. Nach sechs Stunden waren die Bestände an Perforin bereits zum größten Teil wieder nachsynthetisiert (91 % der initialen Fluoreszenzintensität).

Die Fluoreszenzintensität der Färbung von CCL5 in den T-Zellen nahm bereits 20 Minuten nach Kontakt mit Mel IL2 drastisch ab (61 % der initialen Fluoreszenzintensität) und verringerte sich nach weiteren 20 Minuten nochmals deutlich (29 % der initialen Fluoreszenzintensität) (Abbildung 4.30 B und C). Nach 60 Minuten und sechs Stunden reduzierte sich die Farbintensität weiterhin geringfügig (23 % bzw. 19 % der initialen Fluoreszenzintensität). Es konnte somit gezeigt werden, dass der T-Zellklon TyrF8 seine intrazellulären Vorräte an CCL5 nach einer durch den T-Zell-Rezeptor vermittelten antigenspezifischen Stimulation durch eine Zielzelle ausschüttet. Das Ausmaß dieser Ausschüttung ist dabei noch umfangreicher als beim Effektormolekül Perforin.

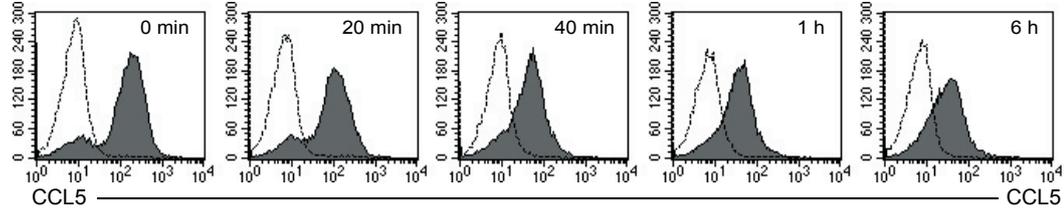
#### **Legende zu Abbildung 4.30: Ausschüttung von CCL5 und Perforin des T-Zellklons TyrF8 nach Kontakt mit der Tumorzelle Mel IL2**

TyrF8 und Mel IL2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und der Gehalt an CCL5 oder Perforin in TyrF8 nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im FACS gemessen. **A:** Die Tumorzellen wurden vorher mit CFSE markiert, um sie nicht nur anhand der unterschiedlichen Größe oder Granularität von den T-Zellen unterscheiden zu können. Das Analysefenster für die T-Zellen wurde durch die Schnittmenge aus CFSE<sup>-</sup> Zellen (roter Anteil, erste Zeile) und Zellen mit T-Zell-ähnlicher Größe (graue Kreise, zweite Zeile) definiert. Zur Veranschaulichung sind in den Punktdiagrammen der zweiten Zeile alle CFSE<sup>+</sup> Zellen grün dargestellt. **B:** Die CCL5- oder perforinspezifische Fluoreszenzintensität der T-Zellen ist zu den jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten grau bzw. hellgrau hinterlegt im Histogramm dargestellt; die gestrichelte Linie stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität von Perforin ist weniger stark ausgeprägt als die von CCL5 und kommt deshalb erst in der linearen Darstellung im Säulendiagramm (C) zur Geltung. Die Fluoreszenzintensität von CCL5 nimmt nach einer Stunde weiter ab, während die von Perforin nach sechs Stunden bereits fast wieder den initialen Wert erreicht hat. **C:** Die mediane Fluoreszenzintensität von CCL5 und Perforin in TyrF8 nach Kontakt mit Mel IL2 ist als Säule dargestellt, wobei der Anfangswert als 100 % definiert ist. Es ist weiterhin zu beachten, dass die Werte hier linear aufgetragen sind, während die Fluoreszenzintensität in den Messhistogrammen logarithmisch dargestellt ist.

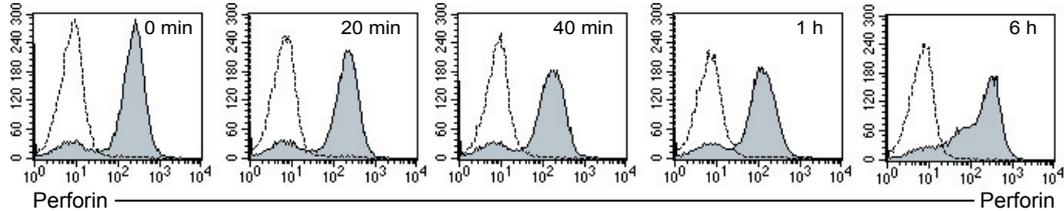
**A** Definition des Analysefensters



**B** Intrazelluläres CCL5 in TyrF8 nach Kontakt mit Mel IL2



Intrazelluläres Perforin in TyrF8 nach Kontakt mit Mel IL2



**C**

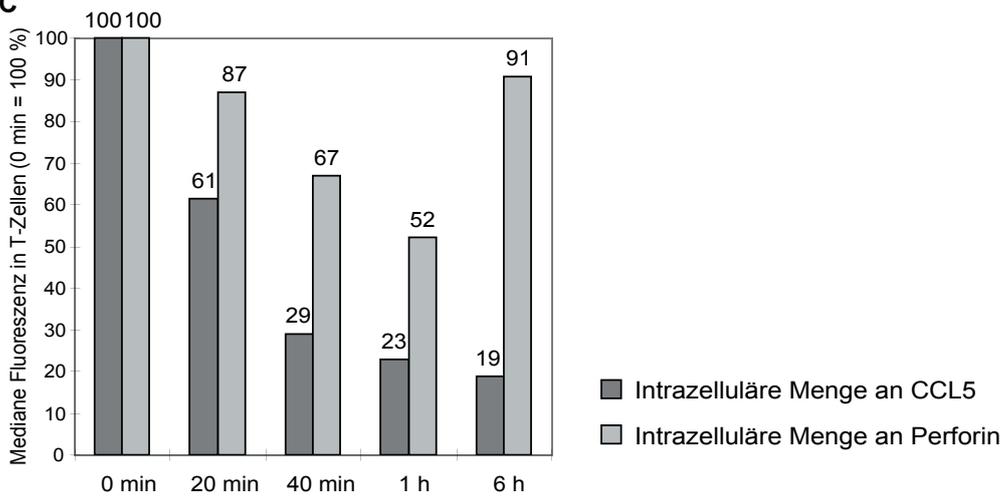
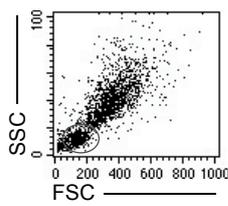
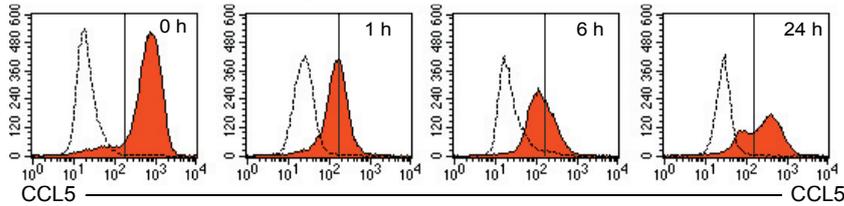


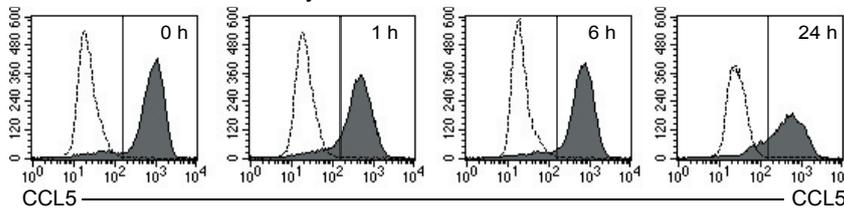
Abbildung 4.30: Legende siehe vorherige Seite



**B Intrazelluläres CCL5 in TyrF8 nach Kontakt mit Mel IL2**



**Intrazelluläres CCL5 in TyrF8 nach Kontakt mit Mel A375**



**Intrazelluläres CCL5 in TyrF8 ohne Kontakt zu Tumorzellen**

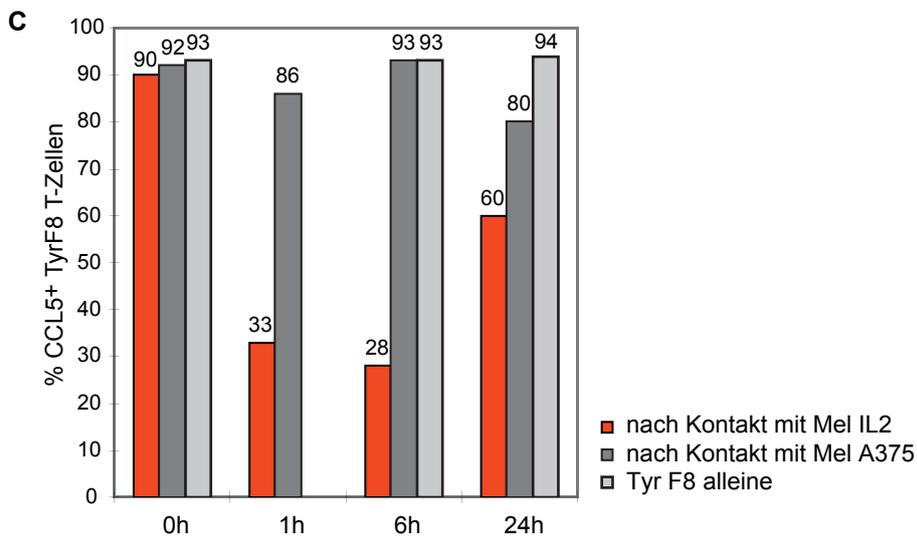
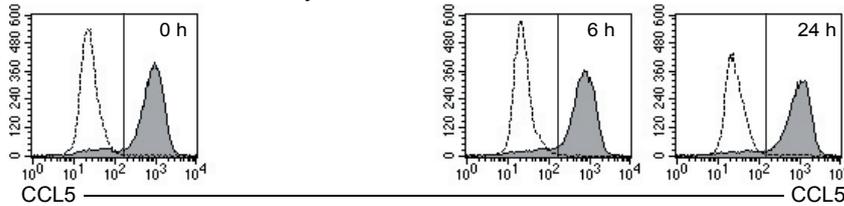


Abbildung 4.31: Legende siehe nachfolgende Seite

**Abbildung 4.31: Ausschüttung von CCL5 des T-Zellklons TyrF8 nach Kontakt mit den Tumorzellen Mel IL2 oder Mel A375**

TyrF8 und Mel IL2 oder Mel A375 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und der Gehalt an CCL5 in TyrF8 nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im FACS gemessen. **A:** Die T-Zellen wurden von den Tumorzellen anhand ihrer Größe und der unterschiedlichen Granularität im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht getrennt. Das auf die T-Zellen gesetzte Analysefenster ist als grauer Kreis abgebildet. **B:** Die CCL5-spezifische Fluoreszenzintensität der T-Zellen ist nachfolgend zu den jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten rot (Kontakt mit Mel IL2), grau (Kontakt mit Mel A375) oder hellgrau (ohne Zugabe von Tumorzellen) hinterlegt im Histogramm dargestellt; die gestrichelte Linie stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar. Durch die vertikale graue Linie in den Histogrammen sind die CCL5 positiven Zellen definiert; rechts davon werden die T-Zellen als positiv und links davon als negativ betrachtet. Nur in TyrF8 mit Kontakt zur spezifischen Zielzelle Mel IL2 fällt die Fluoreszenzintensität von CCL5 nach einer Stunde ab und erholt sich erst nach 24 Stunden wieder. **C:** Die Menge der als „CCL5 positiv“ definierten TyrF8 nach Kontakt mit Mel IL2 (rot), A375 (grau) oder ohne Kontakt zu Zielzellen (hellgrau) ist als Säule dargestellt.

In einem weiteren Experiment wurde die Ausschüttung von CCL5 über einen Zeitraum von 24 Stunden verfolgt. Als negative Kontrollen wurden hier zusätzlich eine Mischung der Tyrosinase<sup>-</sup> Tumorzelle (und somit "Nicht-Zielzelle") Mel A375 mit TyrF8 und der T-Zellklon TyrF8 ohne Beimischung von Tumorzellen analysiert. Die T-Zellen wurden anhand ihrer Größe und Granularität von den Tumorzellen (Abbildung 4.31 A) unterschieden und wiederum wurden die Fluoreszenzintensitäten als Histogramm dargestellt. Der Anteil der CCL5<sup>+</sup> Zellen wurde unter Beachtung der negativen Kontrollfärbung mit einem Antikörper des gleichen Isotyps festgelegt und ist durch die Menge der Zellen rechts von der im Histogramm eingezeichneten grauen Linie definiert (Abbildung 4.31 B). Bei den T-Zellklonen nach Kontakt mit Zielzellen (in Abbildung 4.31 B und C rot hinterlegt) kommt es, wie auch im vorigen Experiment, nach einer Stunde zu einer erheblichen Minderung der Menge an CCL5<sup>+</sup> Zellen (initial 90 % CCL5<sup>+</sup> Zellen; nach 1 h noch 33 % CCL5<sup>+</sup> Zellen). Erst nach 24 Stunden ist wieder eine vermehrte Menge an Zellen, welche CCL5 enthalten, nachweisbar und somit eine "Nachproduktion" des Proteins erfolgt. In den T-Zellen, welche mit der Tumorzelle Mel A375 gemischt wurden (in Abbildung 4.31 B und C dunkelgrau hinterlegt) konnte ebenso wie in den T-Zellen ohne Kontakt zu weiteren Zellen (in Abbildung 4.31 B und C hellgrau hinterlegt) keine relevante Abnahme von CCL5 beobachtet werden.

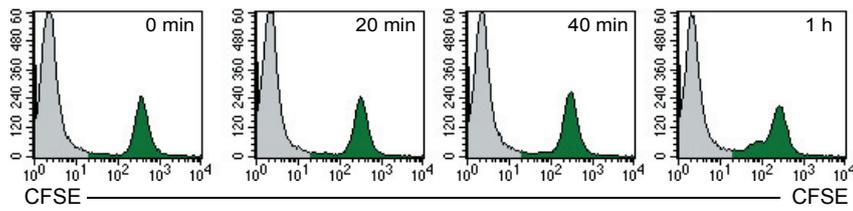
**4.4.2. Von T-Zellen sezerniertes CCL5 bindet an die Tumorzelloberfläche**

Die zytotoxischen Effektormoleküle werden nach erfolgter Degranulation in die Zielzelle aufgenommen und lösen dort Apoptose aus [Trapani, 2002]. Der Verbleib von CCL5 nach Ausschüttung durch die T-Zelle ist hingegen nicht geklärt. Zum Nachweis einer möglichen Aufnahme durch die Zielzelle, wurden die Tumorzellen im oben

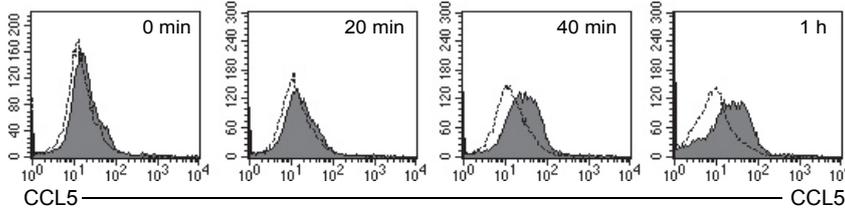
beschriebenen Experiment der CCL5-Ausschüttung nach Fixierung, Permeabilisierung und Färbung zu den entsprechenden Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnte CCL5 zu keinem Zeitpunkt in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Man weiß, dass CCL5 von Zellen als Aggregat zusammen mit Heparansulfat sezerniert wird [Swanson, 2002; Wagner, 1998]. Dieser Komplex ist in seinen physikalischen Eigenschaften als "klebrig" bekannt und adhärirt leicht an verschiedene Oberflächen. Es wurde deshalb speziell die Tumorzelloberfläche auf das Vorhandensein von CCL5 zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht. Hierzu wurde die Suspension aus T-Zellen und Tumorzellen im oben beschriebenen Experiment nach den entsprechenden Zeitpunkten geteilt und der eine Teil zwar fixiert, aber nicht permeabilisiert, um tatsächlich nur Strukturen auf der Oberfläche von Zellen nachzuweisen. Die Tumorzellen wurden vorher mit CFSE gefärbt und konnten auf diese Weise selektiv durchflusszytometrisch analysiert werden. Die als CFSE<sup>+</sup> definierten Zielzellen sind in Abbildung 4.32 A grün hinterlegt dargestellt. Die Histogrammdarstellung in Abbildung 4.32 B zeigt, dass 40 Minuten nach Mischung von Mel IL2 mit TyrF8 eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität von CCL5 auf der Oberfläche der Tumorzellen auftritt. Keine Veränderung konnte auf der Zelloberfläche von Mel A375, die in Kontakt mit TyrF8 standen, beobachtet werden (Abbildung 4.32 B). In Abbildung 4.32 C wurde die mediane Fluoreszenzintensität sowohl für die Oberflächenfärbung der Tumorzellen (schwarze Linien) als auch für die intrazellulären CCL5-Bestände in T-Zellen (Balken) graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Dabei kann der inverse Zusammenhang zwischen CCL5-Ausschüttung aus den T-Zellen und der Ablagerung auf den Tumorzellen verdeutlicht werden. Ein identisch angelegtes Experiment konnte die Beladung der Zielzellen mit CCL5 nachfolgend noch deutlicher darstellen. Hier waren bereits nach 20 Minuten erhebliche Mengen von CCL5 auf der Oberfläche der Zielzellen nachweisbar (Abbildung 4.33).

#### **Abbildung 4.32: Beladung der Tumorzellen mit CCL5 (Experiment 1)**

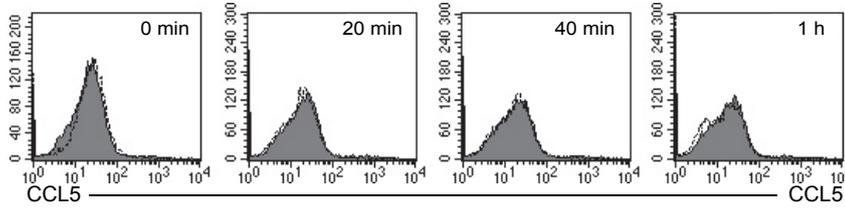
TyrF8 und Mel IL2 oder Mel A375 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Menge an CCL5 sowohl auf der Oberfläche der Tumorzellen als auch in den T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt. **A:** Die Tumorzellen wurden vorher mit CFSE markiert, um sie von den T-Zellen unterscheiden zu können; das Analysefenster für Tumorzellen wurde auf CFSE<sup>+</sup> Zellen gesetzt (grüner Bereich) während die T-Zellen anhand ihrer typischen Größe und Granularität sowie ihrer Negativität für CFSE erkannt werden konnten. **B:** Die CCL5-spezifische Fluoreszenzintensität auf den Tumorzellen ist nachfolgend zu den jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten grau hinterlegt im Histogramm dargestellt; die gestrichelte Linie stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar. Nach 40 Minuten ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität von CCL5 auf der Zelloberfläche von Mel IL2, nicht aber von Mel A375 zu beobachten. In der dritten Zeile ist die gleichzeitige Abnahme der intrazellulären CCL-Bestände der T-Zellen dargestellt. **C:** Die mediane Fluoreszenzintensität von intrazellulärem CCL5 in TyrF8 nach Kontakt mit Mel IL2 ist in Prozent des Initialwertes als Säule dargestellt. Die Werte von CCL5 auf der Oberfläche der Tumorzellen sind durch mit Linien verbundene Quadrate (■) dargestellt; diese errechnen sich aus der Differenz der medianen CCL5-spezifischen Fluoreszenzintensität und der des Isotypkontrollantikörpers.



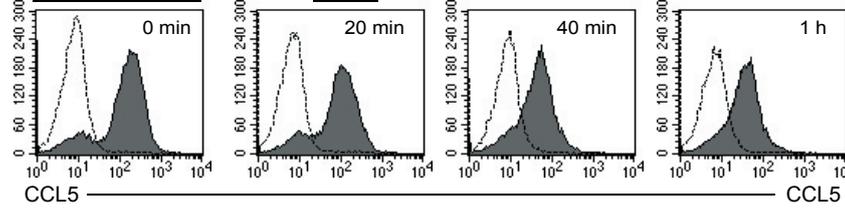
**B CCL5 auf der Oberfläche von Mel IL2 nach Kontakt mit TyrF8**



**CCL5 auf der Oberfläche von Mel A375 nach Kontakt mit TyrF8**



**Intrazelluläres CCL5 in TyrF8 nach Kontakt mit Mel IL2**



**C**

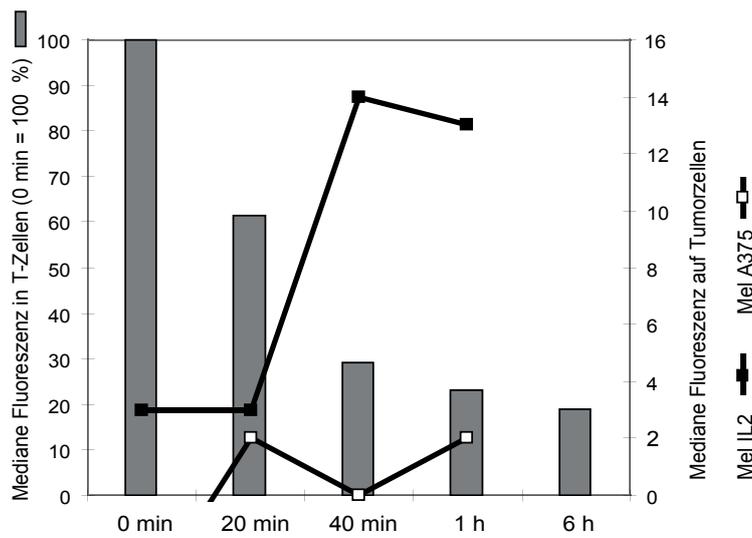
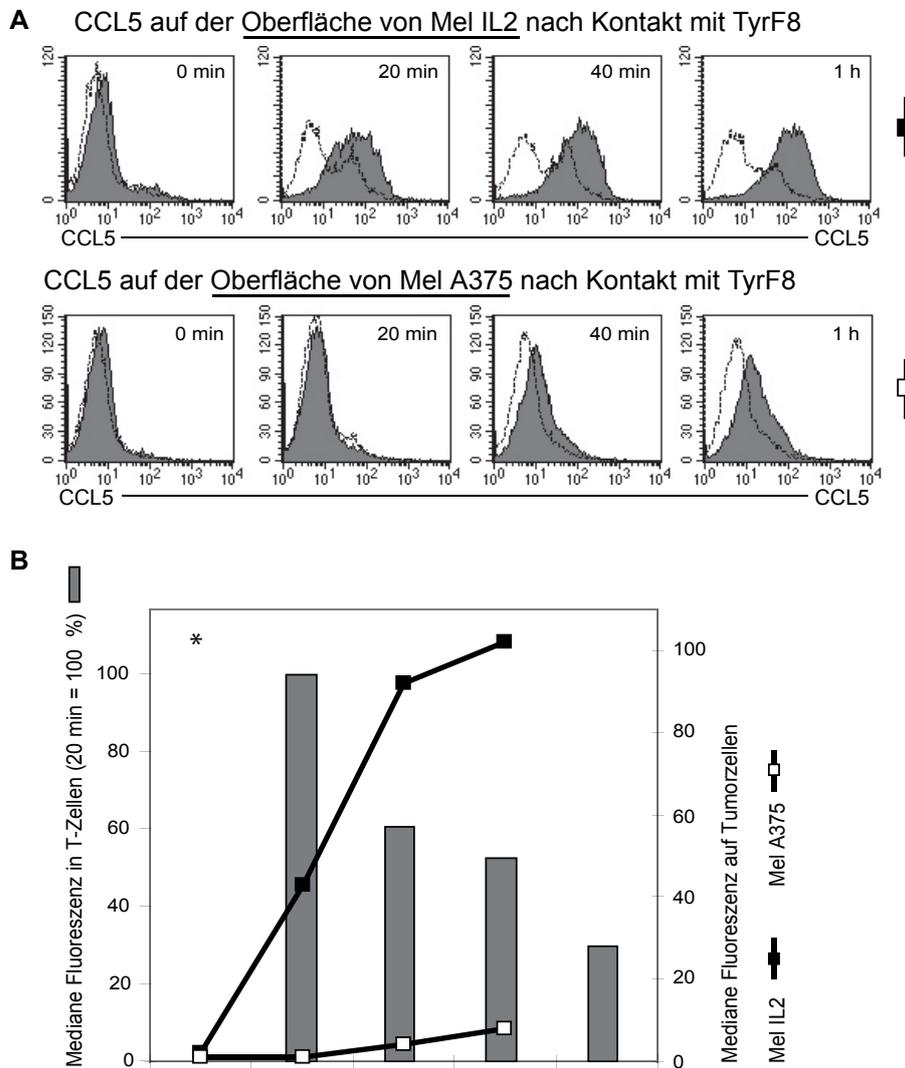


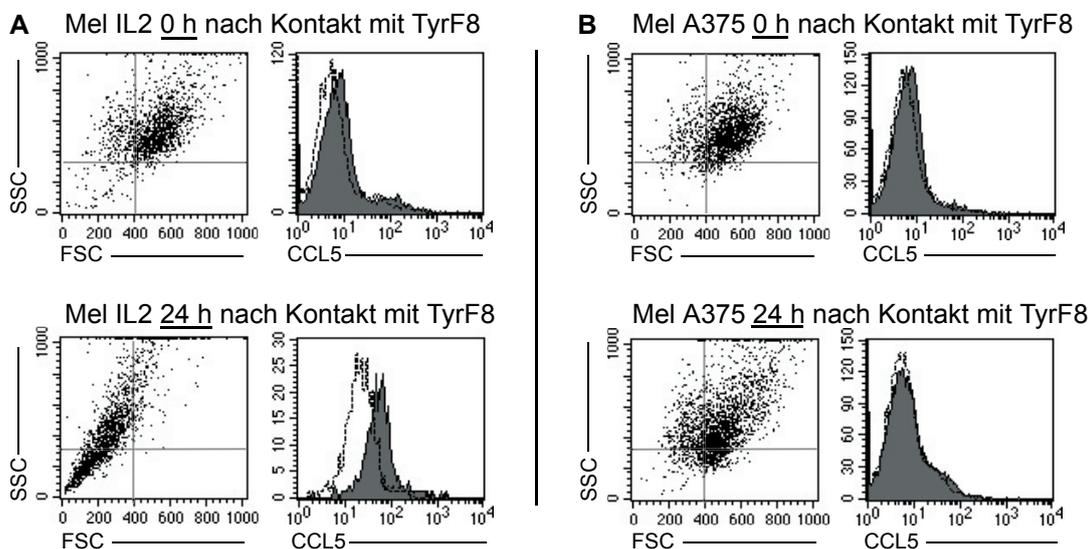
Abbildung 4.32: Legende siehe vorherige Seite



**Abbildung 4.33: Beladung der Tumorzellen mit CCL5 (Experiment 2)**

Die Darstellung entspricht der Abbildung 4.32. Auf die Definition der Analysefenster und die Histogrammdarstellung der T-Zellen ist verzichtet worden. **A:** Im Gegensatz zu „Experiment 1“ (vgl. Abbildung 4.32) ist bereits nach 20 Minuten eine sehr deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität von CCL5 auf Mel IL2 zu beobachten (erste Zeile, zweites Histogramm), die nach 40 Minuten immer noch wächst (erste Zeile, drittes Histogramm). **B:** Die rasche Beladung der Melanomzellen Mel IL2 mit CCL5 ist in der Diagrammdarstellung an der steil ansteigenden schwarzen Linie zu erkennen (ausgefüllte Quadrate,  $\blacksquare$ ). \*Experimentell bedingt existieren hier keine 0 min-Werte für die intrazelluläre Menge an CCL5 in T-Zellen.

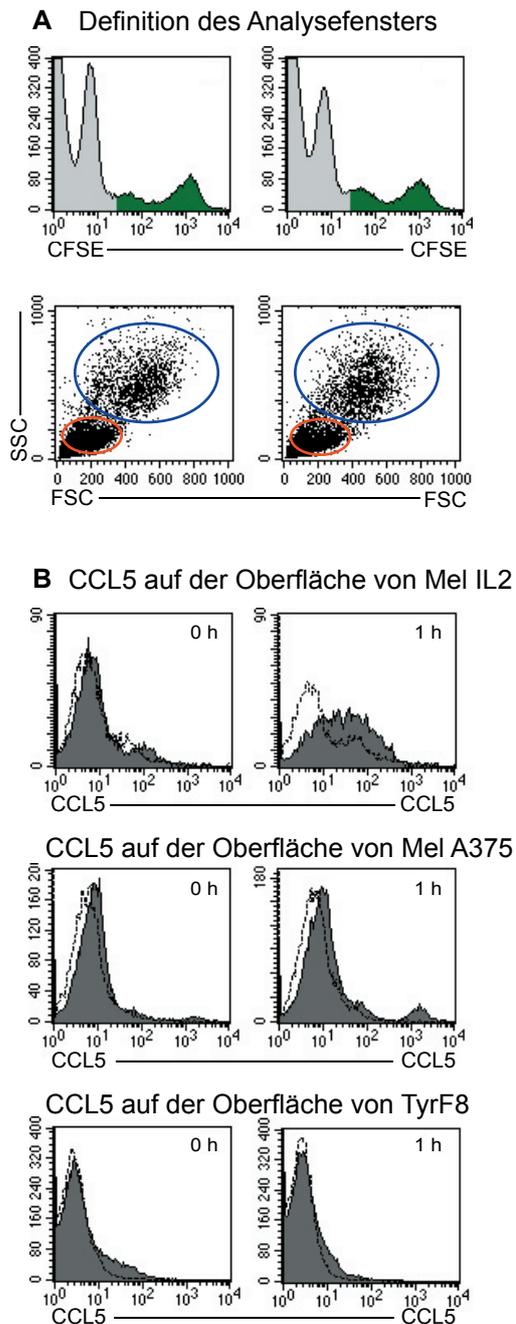
Eine Analyse der Zielzellen im Vorwärtsstreulicht (FSC) des Durchflusszytometers zeigte, dass 24 Stunden nach Zugabe der T-Zellen eine erhebliche Größenminderung der Antigen tragenden Tumorzellen (Mel IL2) eingetreten war (siehe linke Punktediagramme in Abbildung 4.34 A). Dies ist ein deutliches Zeichen, dass sich diese Tumorzellen bereits in einem späten Stadium der Apoptose befinden. Weiterhin zeigte sich, dass die positive Oberflächenfärbung für CCL5 auch nach 24 Stunden auf den nun bereits apoptotischen Körpern persistiert (Histogramm unten rechts in Abbildung 4.34 A). Bei den nicht Antigen tragenden Mel A375 trat auch 24 Stunden nach Koinkubation mit den T-Zellen weder eine Größenminderung noch eine positive Färbung von CCL5 auf der Zelloberfläche auf (Abbildung 4.34 B).



#### Abbildung 4.34: CCL5 auf apoptotischen Tumorzellen

TyrF8 und Mel IL2 oder Mel A375 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und CCL5 auf der Oberfläche der Tumorzellen wurde nach 0 bzw. 24 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Tumorzellen wurden vorher mit CFSE markiert, um sie von den T-Zellen unterscheiden zu können. **A:** Durch die Darstellung im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ist die im Vergleich zum Nullpunkt drastisch veränderte Größe (FSC) der apoptotischen Mel IL2 erkennbar. Die CCL5-spezifische Fluoreszenzintensität auf den Tumorzellen ist nachfolgend grau hinterlegt im Histogramm dargestellt; die gestrichelte Linie stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar. Auf der Oberfläche der apoptotischen Mel IL2 ist nach 24 Stunden eine deutliche Positivität für CCL5 erkennbar. **B:** Die Tumorzellen Mel A375 zeigen nach 24 Stunden keine markante Veränderung der Größe und keine Positivität für CCL5.

Aufgrund der oben bereits erwähnten "klebrigen" Eigenschaft von CCL5 könnte man vermuten, dass die Beladung der Zielzellen einen ungerichteten Prozess darstellt und deshalb stattfindet, weil der sezernierte Komplex aus CCL5 und Herpansulfat unspezifisch an alle sich bietenden Oberflächen bindet. Zum Beweis, dass selektiv nur solche Zellen beladen werden, die die T-Zellen über deren T-Zell-Rezeptor stimulieren, wurde ein Mischexperiment mit den T-Zell-stimulierenden (Antigen-positiven) Mel IL2 und den Antigen-negativen Mel A375 durchgeführt. Beide Tumorzellen gemeinsam wurden mit dem T-Zellklon TyrF8 inkubiert und nach einer Stunde wurde CCL5 auf der Oberfläche aller drei Zellpopulationen gemessen. Mel IL2 wurden zur Unterscheidung von Mel A375 oder TyrF8 mit CFSE gefärbt und die ungefärbten Mel A375 konnten von TyrF8 leicht anhand der stark unterschiedlichen Zellgröße unterschieden werden. Die Festlegung der Analysefenster zur durchflusszytometrischen Unterscheidung der drei Populationen ist in Abbildung 4.35 A dargestellt. Dabei sind Mel IL2 durch deren Färbung mit CFSE abgrenzbar (grüner Anteil in der ersten Zeile). Mel A375 sind durch die Schnittmenge aller CFSE<sup>-</sup> Zellen und der im Punktdiagramm (zweite Zeile) blau umrandeten Population definiert. Das Analysefenster von TyrF8 ergibt sich durch die Schnittmenge aller CFSE<sup>-</sup> Zellen und der im Punktdiagramm (zweite Zeile) rot umrandeten Population. Die Fluoreszenzintensitätshistogramme in Abbildung 4.35 B zeigen, dass CCL5 eine Stunde nach Mischinkubation aller drei Zellpopulationen weder auf der Oberfläche der T-Zellen selbst, noch auf der von Mel A375 gefunden werden kann; allein auf der Oberfläche von Mel IL2 zeigte sich nach einer Stunde eine deutliche Positivität für CCL5. Damit ist bewiesen, dass selektiv nur die Antigen tragende Zielzelle beladen wird.



**Abbildung 4.35: CCL5 auf der Oberfläche von Mel IL2, Mel A375 und TyrF8 nach gemeinsamer Inkubation aller drei Zellpopulationen**

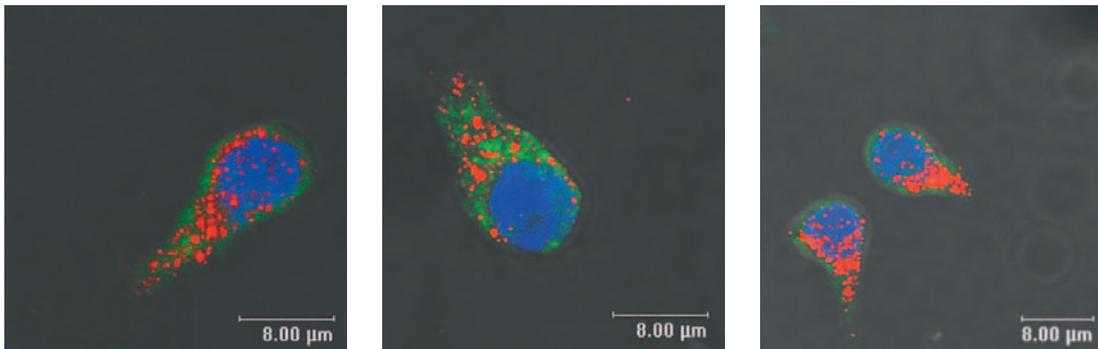
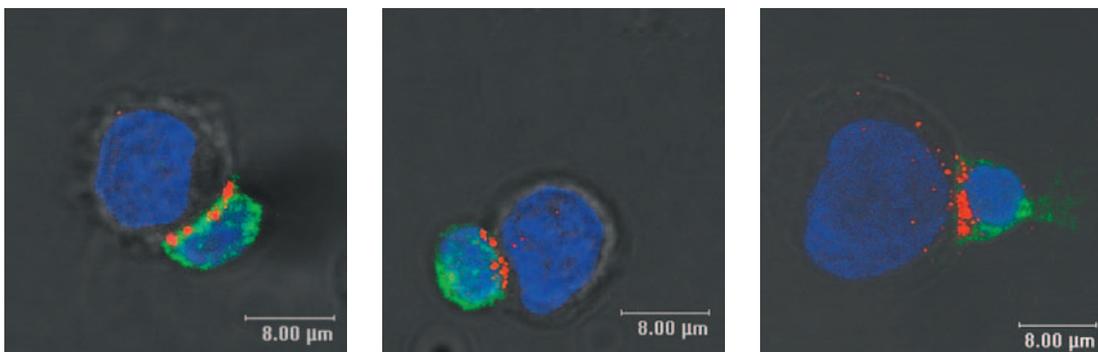
TyrF8, Mel IL2 und Mel A375 wurden gemischt und nach einer Stunde wurde CCL5 auf der Oberfläche aller Zellen im FACS gemessen. **A:** Mel IL2 wurden zur Differenzierung von Mel A375 oder TyrF8 mit CFSE gefärbt; die ungefärbten Mel A375 wurden von TyrF8 anhand der unterschiedlichen Zellgröße unterschieden. Die Analysefenster wurden wie folgt definiert: Mel IL2 sind alle CFSE<sup>+</sup> Zellen, Mel A375 sind die Schnittmenge aller CFSE<sup>-</sup> Zellen und der im Punktdiagramm (zweite Zeile) blau umrandeten Population; TyrF8 sind die Schnittmenge aller CFSE<sup>-</sup> Zellen und der im Punktdiagramm (zweite Zeile) rot umrandeten Population. **B:** Die CCL5-spezifische Fluoreszenzintensität auf den jeweiligen Zellen ist nachfolgend zu den jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten grau hinterlegt im Histogramm dargestellt; die gestrichelte Linie stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar. Nur auf der Oberfläche von Mel IL2 kann CCL5 nach einer Stunde identifiziert werden.

#### 4.4.3. Die Ausschüttung von CCL5 erfolgt gerichtet zur Tumorzelle hin

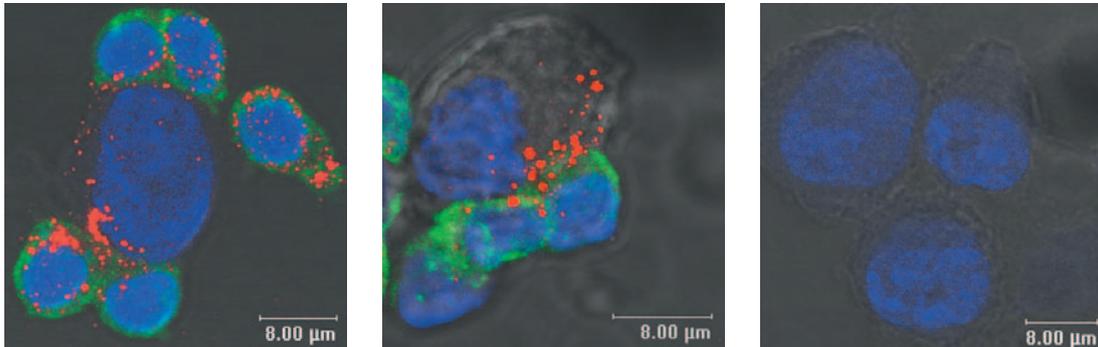
Der zugrunde liegende Mechanismus der spezifischen Beladung der Zielzelle unter Ausschluss weiterer, räumlich eng benachbarter Nicht-Zielzellen wurde im Weiteren näher untersucht. Da ein spezifischer und gerichteter Ausschüttungsvorgang von den zytotoxischen Effektormolekülen bekannt ist [Kuppers, 1977] (in der vorliegenden Arbeit demonstriert durch Abbildung 4.10), wurde bezüglich CCL5 ein ähnliches Prinzip für möglich erachtet. Eine bildliche Darstellung des Prozesses der Ausschüttung und Übertragung von CCL5 sollte klären, ob hier ein ähnlicher Mechanismus die Spezifität der CCL5-Ablagerung auf die Zielzelle erklärt.

Zunächst wurde der T-Zellklon TyrF8 mit Antikörpern gegen CD3 und CCL5 immunzytologisch gefärbt. Dabei zeigte sich, dass CCL5 als granuläre Struktur diffus im Zytoplasma der T-Zellen verteilt ist (Abbildung 4.36 A). In einem nächsten Schritt wurden Konjugate aus TyrF8 und Mel IL2 hergestellt; diese wurden nach 30 Minuten fixiert und mit Antikörpern gegen CD3 und CCL5 gefärbt. Die räumliche Verteilung von CCL5 in T-Zellen, die in Kontakt mit einer Zielzelle stehen, wurde anschließend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass CCL5, in Analogie zu Perforin (Abbildung 4.10), in zahlreichen T-Zellen eine polare Ausrichtung zur Zielzelle hin zeigt (Abbildung 4.36 B). Eindrücklich konnte auch dargestellt werden, dass sich CCL5 über die Oberfläche der Zielzelle verteilt (Abbildung 4.36 C).

Die räumliche Verteilung von CCL5 und Perforin in T-Zellen und in Konjugaten aus T-Zellen und Zielzellen wurde anschließend durch Doppelfärbung beider Proteine dargestellt. Dabei zeigte sich, dass Perforin und CCL5 in T-Zellen ohne Tumorzellkontakt diffus verteilt im Zytoplasma vorliegen; es konnten dabei keinerlei überlappende Farbsignale festgestellt werden (Abbildung 4.37 links). Dies muss als Hinweis für die Lokalisation beider Proteine in unterschiedlichen Granula der Zelle gewertet werden. In T-Zellen mit Tumorzellkontakt orientierten sich Perforin und CCL5 zur immunologischen Synapse hin (Abbildung 4.37 Mitte). Während Perforin am Übergang zwischen T-Zelle und Zielzelle fokussiert erscheint, wird CCL5 über die Zielzelle verteilt (Abbildung 4.37 rechts). Es ist bekannt, dass Perforin innerhalb der Zielzelle von den derzeit erhältlichen Antikörpern nicht erkannt werden kann [Froelich, 2002].

**A** T-Zellen: CCL5 ist diffus in der Zelle verteilt**B** T-Zellen in Kontakt zur Tumorzelle MEL IL2: CCL5 reorientiert sich zur Tumorzelle hin**C** CCL5 wird auf die Tumorzelle übertragen

## Tumorzellen alleine



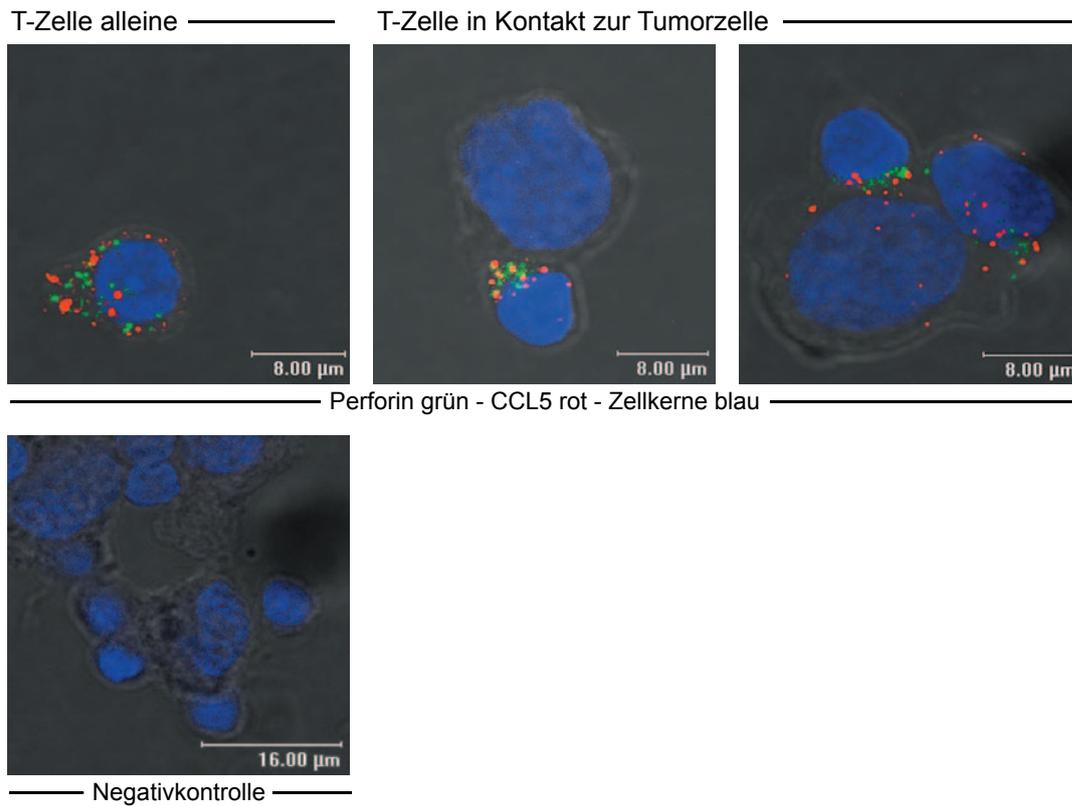

---

 CD3 grün - CCL5 rot - Zellkerne blau
 

---

**Abbildung 4.36: Räumliche Verteilung von CCL5 im T-Zellklon TyrF8 und Beladung der Zielzellen mit CCL5**

**A:** Fluoreszenzdoppelfärbung von CD3 (grün) und CCL5 (rot) im T-Zellklon TyrF8. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Färbung erfolgte nach „Protokoll B“ (siehe Abschnitt 3.2.6 im Methodenteil dieser Arbeit). Die Aufnahmen entstanden durch Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie; alle zur Erfassung der räumlichen Verteilung von CCL5 relevanten Schnittebenen wurden übereinander projiziert und die Farbe „rot“ gegenüber allen anderen Farben deckend dargestellt. CCL5 ist als granuläre Struktur diffus im Zytoplasma der Zelle verteilt. **B:** Nach Kontakt mit der spezifischen Zielzelle Mel IL2 (große ungefärbte Zellen) zeigt CCL5 eine polare Ausrichtung zur Tumorzelle hin. **C:** Die Tumorzellen werden mit CCL5 beladen, während Tumorzellen ohne Kontakt zu T-Zellen keine Färbung für CCL5 zeigen.



#### Abbildung 4.37: Räumliche Verteilung von Perforin und CCL5 im T-Zellklon TyrF8

Fluoreszenzdoppelfärbung von Perforin (grün) und CCL5 (rot) im T-Zellklon TyrF8. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Färbung erfolgte nach „Protokoll C“ (siehe Abschnitt 3.2.6). Die Aufnahmen entstanden durch Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie; alle zur Erfassung der räumlichen Verteilung von Perforin und CCL5 relevanten Schnittebenen wurden übereinander projiziert. In T-Zellen ohne Kontakt zu Zielzellen sind sowohl Perforin als auch CCL5 diffus in der Zelle verteilt (links oben). Es sind keine überlappenden Farbsignale der Färbungen beider Proteine zu finden. Nach Kontakt zur spezifischen Zielzelle Mel IL2 richten sich beide Proteine zur Tumorzelle hin (oben Mitte und rechts) und CCL5 wird auf die Tumorzelle übertragen (oben rechts). Die negative Kontrollfärbung wurde ohne Primäran-tikörper nur mit den entsprechenden Sekundärreagenzien durchgeführt (unten).

## 5. Diskussion

### 5.1. Unreife und reife dendritische Zellen zeigen im Nierenzellkarzinom ein unterschiedliches Verteilungsmuster

Dendritische Zellen sind für die Initiierung einer Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen nötig. Im Gewebe befindliche dendritische Zellen nehmen dort große Mengen an Antigen auf und wandern, nachdem sie entsprechende Signale erhalten haben, in die lokalen Lymphknoten aus, um dort antigenspezifisch naive T-Zellen zu aktivieren [Banchereau, 1998]. Die Existenz dendritischer Zellen im Tumorgewebe selbst stellt somit eine essentielle Voraussetzung für das Zustandekommen einer Immunreaktion durch T-Zellen dar [Fuchs, 1996; Gallucci, 1999; Smyth, 2001; Vicari, 2002]. Viele maligne Tumore wurden auf das Vorhandensein dendritischer Zellen hin untersucht, wobei in den meisten Fällen ein reichhaltiges Infiltrat gefunden wurde [Enk, 1997; Lespagnard, 1999; Vicari, 2002]. In kolorektalen Karzinomen, Bronchialkarzinomen, malignen Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes, Nasopharynxkarzinomen und Schilddrüsenkarzinomen konnte die Menge an infiltrierenden dendritischen Zellen positiv mit einer besseren Prognose korreliert werden [Ambe, 1989; Fox, 1989; Furukawa, 1985; Imai, 1993; Nomori, 1986; Reichert, 2001; Schroder, 1988; Tsujitani, 1990].

Auch im Nierenzellkarzinom wurde das Infiltrat an dendritischen Zellen von unterschiedlichen Gruppen immunhistochemisch untersucht. Hierbei wurde demonstriert, dass nur ein kleiner Anteil der infiltrierenden monozytären Zellen dendritische Zellen waren [Menetrier-Caux, 1998; Schwaab, 1999; Troy, 1998]. Zur Identifizierung der dendritischen Zellen wurden dabei Antikörper gegen CD83, CMRF-44 (Marker für aktivierte dendritische Zellen), CD80, CD86, HLA-DR oder S-100-Antigen verwendet. Zur genauen Identifizierung von dendritischen Zellen ist die Verwendung der meisten dieser Antikörper problematisch, da die genannten Antigene auch von weiteren Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen exprimiert werden. Weiterhin werden durch Färbungen gegen die genannten Antigene weitaus nicht alle dendritischen Zellen erfasst, denn insbesondere unreife dendritische Zellen exprimieren CD83, CMRF-44, CD80 oder CD86 nur schwach oder gar nicht [Banchereau, 1998; Soilleux, 2003].

Erst kürzlich wurde ein neues, von dendritischen Zellen exprimiertes Protein beschrieben und als "*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*" (DC-Sign) bezeichnet [Geijtenbeek, 2000]. DC-Sign wird im Menschen weiterhin nur von Alveolarmakrophagen (dies sind spezialisierte Makrophagen in der Lunge) exprimiert und stellt somit ein hochspezifisches Erkennungsmerkmal für dendritische Zellen dar [Soilleux, 2003; Soilleux, 2002]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DC-Sign<sup>+</sup> Zellen *in vivo* in keinem Gewebe die Proteine CD83 oder CD86 exprimieren und häufig noch schwach positiv für CD14 sind. Weiterhin kommen DC-Sign<sup>+</sup> Zellen

nicht in T-Zell-Arealen sekundärer lymphatischer Organe vor [Soilleux, 2003]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch DC-Sign *in vivo* spezifisch unreife dendritische Zellen erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass DC-Sign exprimierende Zellen in nicht unerheblicher Anzahl im Nierenzellkarzinom vorhanden sind. Diese sind in allen Fällen homogen und diffus im Gewebe verteilt und befinden sich dabei sowohl im Tumorparenchym als auch im Bindegewebe (Abbildung 4.4). Vorangegangene Berichte über einen ausgeprägten Mangel an dendritischen Zellen im Nierenzellkarzinom [Troy, 1998] können durch die hier gezeigten Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Zum Nachweis von reifen dendritischen Zellen im Nierenzellkarzinom wurde hier erstmals das letztlich entdeckte Protein DC-Lamp verwendet. DC-Lamp dient als hochspezifisches Erkennungsmerkmal für reife dendritische Zellen *in vivo* [Bell, 1999; de Saint-Vis, 1998; Katou, 2003]. DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen wurden durch Immunhistologie und PCR *in vivo* ausschließlich in sekundärem lymphatischem Gewebe gefunden, wo sie stets in den T-Zell-Arealen lokalisiert sind [de Saint-Vis, 1998]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Nierenzellkarzinome auf die Präsenz von DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen untersucht und dabei wurde gezeigt, dass in allen analysierten Geweben zahlreiche DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen vorhanden waren. Diese traten fast ausschließlich als Zellaggregate auf, welche häufig in der Nähe von größeren Bindegewebsarealen oder der Pseudokapsel des Tumors und seltener im Tumorparenchym lokalisiert waren. Einzeln gelegene DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen außerhalb von Akkumulationen waren selten (Abbildung 4.6). Durch immunhistochemische Färbung von Serienschnitten und durch Doppelimmunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen bevorzugt in T-Zellansammlungen liegen. Mittels konfokaler Mikroskopie gelang es, enge Kontakte zwischen DC-Lamp<sup>+</sup> dendritischen Zellen und T-Zellen nachzuweisen (Abbildung 4.7). Vergleichbare Beobachtungen wurden 1999 von Bell et al. beim Mammakarzinom gemacht [Bell, 1999]. Auch in chronisch entzündeten Geweben und bei Autoimmunerkrankungen wurden ähnliche Formationen beschrieben, wobei deren Anzahl positiv mit organbedrohender Gewebeerstörung korrelierte [Hjelmstrom, 2001; Katou, 2003]. Im Falle von malignen Tumoren findet eine derartige Zerstörung von Gewebe offensichtlich nicht statt und es stellt sich die Frage, ob die beschriebenen T-Zellansammlungen in die tumorspezifische Immunantwort involviert sind.

Die engen Kontakte von DC-Lamp<sup>+</sup> Zellen und T-Zellen fordern zu Spekulationen über mögliche immunologische Konsequenzen dieser Interaktion heraus, möglicherweise auch im Sinne von Antigenpräsentation mit nachfolgender T-Zell-Aktivierung. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Abregulation der ζ-Kette von T-Zellen in den Akkumulationen (Abbildung 4.27) könnte ein Hinweis auf hier stattfindende T-Zellaktivierung sein. Dies würde allerdings im Regelfall auch mit einer IFN-γ Sekretion der T-Zellen einhergehen, welche immunhistologisch in keinem Areal der analysierten

Nierenzellkarzinome nachweisbar war. Aktivierung führt normalerweise auch zu einer Proliferation der T-Zellen [Gudmundsdottir, 1999]; diese konnte durch Doppelfärbung einer T-Zellanhäufung mit CD3 und Ki67 (Abbildung 4.29) nicht nachgewiesen werden, wurde aber im Weiteren auch nicht an einem größeren Kollektiv untersucht. Das Phänomen der  $\zeta$ -Kettenabregulation in den DC-T-Zellanhäufungen könnte auch durch lösliche Faktoren bedingt sein. In einem Mausmodell wurden kürzlich makrophagenähnlich weiterdifferenzierte dendritische Zellen beschrieben [Zhang, 2004], die Stickstoffmonoxid produzieren, welches eine Abregulation der  $\zeta$ -Kette bewirken kann [Baniyash, 2004]. Diese "differenzierten" dendritischen Zellen verhindern weiterhin auch eine Proliferation von T-Zellen [Zhang, 2004]. Möglicherweise enthalten die in dieser Arbeit beschriebenen Ansammlungen ähnlich differenzierte dendritische Zellen. Eine präzisere phänotypische Charakterisierung wird zeigen, ob diese Zellen im Nierenzellkarzinom an der Inhibierung der Immunantwort beteiligt sind.

## **5.2.Fehlende Sekretion von IFN- $\gamma$ und unzureichende Bestände an Perforin in zytotoxischen T-Zellen als mögliche Ursache für mangelnde Kontrolle des Tumorwachstums**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom immunhistologisch wenig Perforin und kein IFN- $\gamma$  detektiert werden kann. Damit fehlen zwei wichtige Komponenten, die von zytotoxischen T-Zellen zur Tumorzellzerstörung benutzt werden.

Die Bedeutung von IFN- $\gamma$  bei der Eliminierung von malignen Tumoren konnte bereits mehrfach demonstriert werden. Kaplan et al. zeigten, dass sich in Mäusen, die Defekte im Rezeptor für IFN- $\gamma$  aufwiesen, durch karzinogene Substanzen deutlich schneller Tumore induzieren lassen, als in Kontrollmäusen [Kaplan, 1998]. Weiterhin wurde demonstriert, dass durch zytotoxische T-Zellen, welche aus Perforin und FasLigand *knock-out*-Mäusen gewonnen wurden, pulmonale Metastasen eines Melanoms vollständig zurückgebildet werden können [Winter, 1999]. Später wurde gezeigt, dass die antitumorale Aktivität abhängig von IFN- $\gamma$  sein kann [Peng, 2000]. IFN- $\gamma$  induziert eine Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Tumorzellen und erleichtert somit deren Erkennung durch zytotoxische T-Zellen. Weiterhin stimuliert IFN- $\gamma$  Makrophagen, die daraufhin zur Antigenpräsentation angeregt werden. IFN- $\gamma$  kann aber auch ganz direkt das Tumorwachstum eindämmen; eine zentrale Rolle wird hierbei der antiangiogenetischen Wirkung von IFN- $\gamma$  zugewiesen [Blankenstein, 2003]. Bei Melanompatienten wurde IFN- $\gamma$  im Rahmen der Therapiekontrolle als Nachweis von Lymphozytenaktivität *in situ* verwendet [Kammula, 1999] und bei Patienten mit Ösophaguskarzinom konnte die Menge an mRNA von IFN- $\gamma$  im Tumor positiv mit besserer Prognose korreliert werden [Schumacher, 2001]. Durch Schumacher et al.

wurden IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen zum ersten Mal auch immunhistologisch nachgewiesen, wobei allerdings keinerlei quantitative Aussagen über deren Vorkommen getroffen wurden [Schumacher, 2001; van Herpen, 2005].

Für das Nierenzellkarzinom existieren bisher lediglich durch PCR erbrachte Ergebnisse über ein Vorkommen von IFN- $\gamma$  *in situ*. Im Tumorgewebe konnte dabei mehr mRNA detektiert werden als im angrenzenden Normalnierengewebe [Olive, 1998]. Eine Gruppe aus Freiburg isolierte und sortierte später CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen aus mehreren Nierenzellkarzinomen und fand in diesen Zellen mittels PCR mehr mRNA für IFN- $\gamma$ , als in Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Patienten [Elsasser-Beile, 2000].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nun erstmals immunhistologische Nachweise über die Produktion von IFN- $\gamma$  im Nierenzellkarzinom erbracht. Dabei konnten keine IFN- $\gamma$  sezernierenden T-Zellen im Tumorgewebe gefunden werden. Lediglich zwei stark IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen wurden im Gewebe des Tumors RCC T12 nachgewiesen (Abbildung 4.17 B). Diese waren allerdings CD3<sup>-</sup> und es muss davon ausgegangen werden, dass es sich um dendritische Zellen, NK-Zellen oder die erst kürzlich beschriebenen IKDCs (*Interferon producing killer dendritic cells*) handelt, die ebenfalls IFN- $\gamma$  sezernieren können [Chan, 2006; Frucht, 2001]. Zweifel an der Methodologie konnten durch positive Kontrollfärbungen von *in vitro* stimulierten T-Zellen (Abbildung 4.17 A) und durch den Nachweis von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in der Tonsille (Abbildung 4.17 B oben links) ausgeräumt werden. Des Weiteren konnten auch Koga et al. mit dem gleichen Verfahren zahlreiche IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen in Hautbiopsien von Patienten mit Psoriasis identifizieren [Koga, 2002].

T-Zellen im Nierenzellkarzinom sind möglicherweise nicht ausreichend aktiviert oder die Bildung und Sekretion von IFN- $\gamma$  wird inhibiert. Angesichts der Bedeutung von IFN- $\gamma$  im Rahmen der Immunantwort gegen Tumore könnte die mangelnde IFN- $\gamma$  Sekretion eine Ursache für das Ausbleiben einer effektiven Zerstörung des Nierenzellkarzinoms darstellen. Immuntherapien basierend auf einer Induktion der IFN- $\gamma$  Produktion könnten somit die Behandlungserfolge im Nierenzellkarzinom verbessern. Tatsächlich gibt es Ansätze der Immuntherapie mit dem IFN- $\gamma$  induzierenden Zytokin IL-12 [Fishman, 2001].

Die Bedeutung des Perforin für die Eindämmung des Tumorwachstums wurde an Mäusen gezeigt, deren Gene für Perforin und Granzym abgeschaltet wurden. Diese entwickeln häufig spontane Lymphome und zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber karzinogenen Substanzen [Smyth, 2001; Trapani, 2002; van den Broek, 1996]. Die quantitative Analyse der Anzahl an CD3<sup>+</sup> und Perforin<sup>+</sup> Zellen in immunhistologisch gefärbten Gefrierschnitten verschiedener Nierenzellkarzinome zeigt deutlich, dass nur ein sehr kleiner Teil der T-Zellen (durchschnittlich weniger als 15 %) Perforin exprimiert (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9). Der genaue Anteil an Perforin<sup>+</sup> T-Zellen dürfte tatsächlich noch niedriger liegen als hier durch den

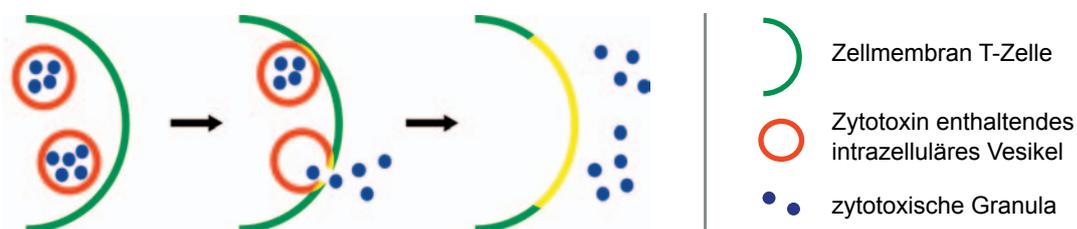
Bezug auf CD3<sup>+</sup> Zellen berechnet, da die immunhistologische Einzelfärbung nicht berücksichtigt, ob es sich bei den Perforin<sup>+</sup> Zellen um T-Zellen oder NK-Zellen handelt, welche ebenfalls Perforin exprimieren. Die immunhistologischen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit bestätigen allerdings durchflusszytometrische Analysen der eigenen Arbeitsgruppe, nach denen aus Nierenzellkarzinomen isolierte Lymphozyten ebenfalls nur geringe Zahlen an Perforin<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen.

Dennoch muss festgehalten werden, dass in allen Tumoren Perforin<sup>+</sup> Zellen gefunden wurden, die potentiell tumorreaktiv agieren könnten. Eine Tumorantwort könnte auch durch wenige Perforin<sup>+</sup> Zellen vermittelt werden, denn eine zytotoxische Perforin exprimierende T-Zelle besitzt prinzipiell die Fähigkeit, schnell hintereinander zahlreiche Zielzellen zu töten [Isaaz, 1995]. Bei Antigenerkennung orientieren sich die zytotoxischen Granula innerhalb der T-Zellen zur Zielzelle hin und werden daraufhin ausgeschüttet [Bossi, 2002; Stinchcombe, 2001]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur ein sehr geringer Anteil der wenigen Perforin<sup>+</sup> T-Zellen im Nierenzellkarzinom eine Ausrichtung des Perforin zeigt (Abbildung 4.11 und Abbildung 4.12). Die wenigen Perforin<sup>+</sup> T-Zellen im Nierenzellkarzinom sind daher entweder nicht in die Tumorzellerkennung involviert oder haben einen Defekt im Mechanismus der Perforinausrichtung. Während es weitere Analysen der Perforinverteilung in Tumor infiltrierenden Lymphozyten humaner Tumore bisher noch nicht gibt, wurde 2001 von Radoja et al. bei Lymphozyten aus Adenokarzinomen von Mäusen beschrieben, dass diese unmittelbar nach Isolierung aus dem Tumor nicht in der Lage waren, ihre Granzym B enthaltenden Granula in Richtung einer entsprechenden Zielzelle auszurichten. Derartige Ausrichtungsprozesse waren erst nach einer mehrstündigen Kultivierung möglich [Radoja, 2001]. Diese Untersuchungen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen es wahrscheinlich, dass das Tumormilieu den Vorgang der Ausrichtung von Granula hemmen kann. Erst kürzlich konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen eine Inhibierung der Exozytose zytolytischer Granula bewirken können [Mempel, 2006]. Ob im humanen Nierenzellkarzinom ebenfalls regulatorische T-Zellen für eine derartige Hemmung verantwortlich gemacht werden können, muss nun gezeigt werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, worin die Gründe für die große Anzahl an Perforin defizienten T-Zellen im Nierenzellkarzinom liegen. Die infiltrierenden T-Zellen könnten naiv sein und noch kein Differenzierungsprogramm durchlaufen haben, welches die Expression von Perforin induziert. Gegen diese These sprechen Beobachtungen, dass Tumor infiltrierende Lymphozyten andere Effektormoleküle wie Granzym A exprimieren (Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe) oder Aktivierungsmarker wie CD69 aufweisen [Van den Hove, 1997]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch immunhistologische Färbung von GMP17/TIA-1 gezeigt werden (Abbildung 4.16), dass zahlreiche Tumor infiltrierende Lymphozyten zytotoxische Granula besitzen, was gegen einen naiven Phänotyp der Tumor infiltrierenden Lymphozyten spricht. Durch Fluoreszenzdoppelfärbung mit CD3 konnte weiterhin gezeigt werden, dass

Membranbestandteile (GMP17/TIA-1) von mit zytotoxischen Granula gefüllten Vesikeln in örtlich begrenzte Areale der Plasmamembran der T-Zelle integriert sind (Abbildung 4.16 und Abbildung 5.1). Dies kann als Zeichen gewertet werden, dass erst kürzlich Zielzellerkennung und somit auch eine Degranulation von Effektormolekülen stattgefunden hat [Medley, 1996] (Abbildung 5.1).

Die Ausschüttung der Zytotoxine führt unter physiologischen Bedingungen zu einem temporären Verlust dieser Effektormoleküle. Unter normalen Umständen werden die intrazellulären Vorräte an Perforin nach einer T-Zell-Rezeptor vermittelten Degranulation allerdings schnell wieder aufgefüllt [Isaaz, 1995]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Perforinbestände in T-Zellen nach Stimulation mit antigenspezifischen Tumorzellen initial abnahmen, aber bereits nach sechs Stunden oft über das vorherige Maß hinaus wiederhergestellt waren (Abbildung 4.30). Daraus könnte geschlossen werden, dass die Perforindefizienz der Tumor infiltrierenden Lymphozyten bei nachweislich stattgefundener Degranulation auf einer Störung der Neusynthese des Perforin beruht. Bei Patienten mit chronischer HIV-Infektion findet man ebenfalls zahlreiche virusspezifische aber Perforin defiziente  $CD8^+$  T-Zellen, deren Funktion allerdings durch Zytokine wie IL-2 wiederhergestellt werden konnte [Lieberman, 2002]. An der Bereitstellung von IL-2 sind wesentlich  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen beteiligt und die unzureichende Funktionalität der zytotoxischen T-Zellen im Tumor könnte somit durch mangelnde IL-2-Produktion durch  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen verursacht sein. Derartige Spekulationen werden durch die Tatsachen untermauert, dass durch systemische IL-2 Therapie beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom Erfolge erzielt werden [Rosenberg, 2001;



**Abbildung 5.1: Nachweis eines Degranulationsereignisses durch Analyse der Lokalisation Zytotoxin enthaltender Vesikel**

Intrazelluläre Vesikel sind als rote Kreise abgebildet und befinden sich in T-Zellen, deren Zellmembran grün dargestellt ist. Die zytotoxischen Moleküle sind durch kleine blaue Punkte stilisiert. Die Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran (gelbe Mischfarbe) führt zur Ausschüttung der Zytotoxine. Die abgelaufene Degranulation kann auch später noch durch die örtlich begrenzt in die Zellmembran integrierten Vesikel (gelbe Mischfarbe) nachgewiesen werden.

Vogelzang, 1998] und dass dabei auch mehr Perforin-mRNA in Lymphozyten des peripheren Blutes gefunden wird [Leger-Ravet, 1994]. Therapiestrategien, die das Ziel einer vermehrten Perforinsynthese in T-Zellen verfolgen, könnten in Zukunft einen wichtigen Beitrag zu einer effektiven Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms leisten.

### **5.3. Die Expression der CD3 $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden T-Zellen des Nierenzellkarzinoms zeigt ein heterogenes Muster**

Die Erkennung und Zerstörung einer Tumorzelle durch reife zytotoxische T-Zellen setzt die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Komplex aus MHC-Klasse-I-Molekül und Tumorantigen voraus. Nach Bindung des T-Zell-Rezeptors wird hierzu in der T-Zelle eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, wobei über die Phosphorylierung zahlreicher Proteine ein Differenzierungs- oder Effektorprogramm ausgelöst wird [Trapani, 2002; Visco, 2000]. Die mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex assoziierte  $\zeta$ -Kette wird hierbei ebenfalls phosphoryliert, wobei dieser Schritt für die Signalweiterleitung unumgänglich ist [Frank, 1990]. Die  $\zeta$ -Kette wird nach Aktivierung der T-Zelle physiologischer Weise temporär abreguliert und die Signalweiterleitung somit unterbrochen [Poli, 2003]. Dadurch wird eine überschießende Aktivierung der T-Zelle verhindert [Bronstein-Sitton, 2003; Poli, 2003].

1992 beschrieben Mizoguchi et al. zum ersten Mal Störungen der Signalweiterleitung in Lymphozyten aus Maustumoren und zeigten, dass die Expression der  $\zeta$ -Kette in diesen Lymphozyten drastisch vermindert war [Mizoguchi, 1992]. Eine andauernde Abregulation der  $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten könnte somit ursächlich für eine mangelnde Tumorantwort sein. Seither gab es zahlreiche Studien, die die Expression der  $\zeta$ -Kette in Blutlymphozyten oder in Tumor infiltrierenden Lymphozyten untersuchten. Dabei wurde mit unterschiedlichen Methoden eine verminderte Expression der  $\zeta$ -Kette bei Patienten mit kolorektalen Tumoren [Kono, 1996; Matsuda, 1995; Nakagomi, 1993], malignem Melanom [Zea, 1995], Ovarialtumoren [Lai, 1996] oder Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes [Gunji, 1994] beschrieben. Zur Expression der  $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom gibt es widersprüchliche Aussagen. 1993 beschrieben Finke et al. starke Abregulationen in zehn von elf analysierten Tumoren [Finke, 1993], während Tartour et al. 1995 nur in vier von 13 Tumoren eine verminderte Expression der  $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten feststellen konnte [Tartour, 1995]. Durchflusszytometrische Analysen von Tumor infiltrierenden T-Zellen im Nierenzellkarzinom, die 1997 von Cardi et al. durchgeführt wurden, zeigten in keinem von acht analysierten Tumoren eine deutliche Abregulation der  $\zeta$ -Kette [Cardi, 1997]. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden 15 Nierenzellkarzinome auf die Expression von CD3 $\epsilon$  und der  $\zeta$ -Kette immunhistochemisch durch Auszählung gefärbter

Zellen im Tumorparenchym quantifiziert und miteinander verglichen (Abbildung 4.20). Dabei konnte in zwei Tumoren, eine gegenüber der Gesamtmenge an T-Zellen, erheblich reduzierte Anzahl an CD3 $\zeta$  exprimierenden Zellen beschrieben werden. Die an fünf Tumoren durchgeführte Doppelimmunfluoreszenzfärbung von CD3 $\epsilon$  und der  $\zeta$ -Kette bestätigte in allen Fällen die Ergebnisse der immunhistochemischen Einzelfärbung.

In Übereinstimmung mit den bisherigen Analysen von Tartour [Tartour, 1995] und Cardi [Cardi, 1997] zeigen diese Ergebnisse, dass eine Abregulation der  $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Nierenzellkarzinom zwar in einigen Fällen zu beobachten ist, aber dies eher die Ausnahme darstellt. Eine unzureichende Immunantwort kann somit zumindest bei den meisten der Patienten mit Nierenzellkarzinom kaum durch die verminderte Expression der  $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden Lymphozyten erklärt werden. Es stellt sich die Frage, welche Besonderheiten für die drastisch verminderte Expression der  $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden T-Zellen einiger Patienten verantwortlich sind. Korrelationen der  $\zeta$ -Kettenexpression mit Tumorstadium, Differenzierungsgrad oder Infiltration mit monozytären Zellen wurden bisher nicht beobachtet und konnten auch in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden.

Bemerkenswert ist, dass eine Abregulation der  $\zeta$ -Kette bei einem Mausfibrosarkom durch IL-2 verhindert werden konnte [Salvadori, 1994]. Weiterhin konnte durch IL-2 Immuntherapie bei 21 Patienten mit Nierenzellkarzinom, die vorangehend eine deutliche Abregulation der  $\zeta$ -Kette in peripheren Blutlymphozyten zeigten, eine Verstärkung der Expression an CD3 $\zeta$  herbeigeführt werden [Gratama, 1999]. Tartour et al. zeigten, dass in Tumor infiltrierenden Lymphozyten aus Nierenzellkarzinomen eine vorher vorhandene Abregulation der  $\zeta$ -Kette unter Kulturbedingungen mit IL-2 aufgehoben wurde [Tartour, 1995].

Womöglich sind die wenigen Patienten, deren Tumor infiltrierende T-Zellen eine starke Abregulation der  $\zeta$ -Kette zeigen, diejenigen, die von einer IL-2 Immuntherapie profitieren. Zwischen 20 % und 30 % der Patienten mit Nierenzellkarzinom sprechen auf eine IL-2 enthaltende Kombinations-Immuntherapie an. Dies entspricht zahlenmäßig dem Anteil an Patienten, die eine verminderte Expression der  $\zeta$ -Kette in Tumor infiltrierenden T-Zellen aufweisen. Zur Verifizierung einer derartigen Korrelation wären umfangreiche retrospektive Analysen von Tumormaterial aus Patienten, die auf Immuntherapie angesprochen haben, nötig.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistologischen Analysen zeigten, dass die Stärke der Expression von CD3 $\zeta$  in T-Zellen im Tumorgewebe regional sehr unterschiedlich sein kann. T-Zellen im interstitiellen Bindegewebe einiger Tumoren wiesen einen vollständigen Verlust der  $\zeta$ -Kette auf, während Zellen im unmittelbar benachbarten Tumorparenchym eine deutliche Expression von CD3 $\zeta$  zeigten (Abbildung 4.25). Eine temporäre Abregulation aufgrund einer Zielzellerkennung erscheint im interstitiellen Bindegewebe des Nierenzellkarzinoms unwahrscheinlich,

da sich die Antigen tragenden Tumorzellen nach gängigen Vorstellungen im Parenchym befinden. Im Bindegewebe müssen andere Ursachen, wie beispielsweise lösliche Faktoren, oder eine Antigenerkennung auf Makrophagen oder dendritischen Zellen, welche sich zahlreich im Bindegewebe des Nierenzellkarzinoms befinden, als Ursache der Abregulation angenommen werden. Erst letztlich wurde über eine negative Korrelation zwischen der Menge an Makrophagen und der  $\zeta$ -Kettenexpression in Tumor infiltrierenden T-Zellen im humanen Magenkarzinom berichtet [Ishigami, 2003].

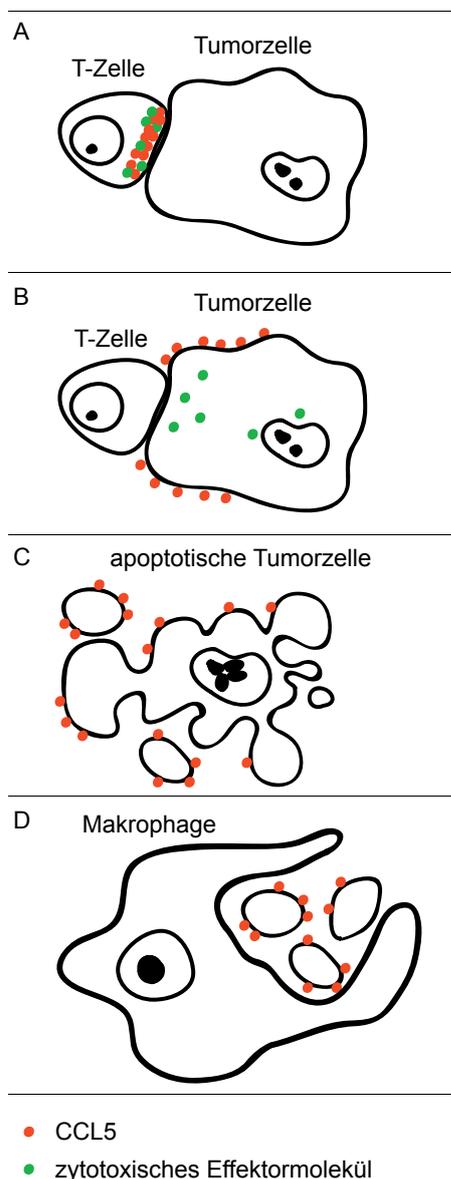
#### **5.4. Zytotoxische T-Zellen deponieren CCL5 selektiv auf Zielzellen und fördern dadurch deren Beseitigung durch Makrophagen**

Reife zytotoxische T-Zellen enthalten neben den zytotoxischen Molekülen Perforin, Granzym A und Granzym B auch das - als Chemokin bekannte - Protein CCL5. Dieses ist in intrazellulären Granula gespeichert und wird durch T-Zell-Rezeptor vermittelte Aktivierung sezerniert [Catalfamo, 2004; Swanson, 2002; Wagner, 1998]. Erkennt eine zytotoxische T-Zelle ihre entsprechende Zielzelle durch Bindung des MHC-Peptid-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor, werden die zytotoxischen Effektormoleküle zur Zielzelle hin ausgeschüttet und lösen in dieser einen programmierten Zelltod aus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass während dieses Prozesses auch das Protein CCL5 von der T-Zelle ausgeschüttet und zielgerichtet auf die Plasmamembran der Zielzelle übertragen wird. CCL5 ist auch auf der Oberfläche der resultierenden apoptotischen Körper der Zielzelle noch zu finden. Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der CCL5-Ablagerung auf den apoptotischen Zellen wurden in Kollaboration mit den Arbeitsgruppen Nelson (Medizinische Poliklinik Innenstadt, München) und Gröne (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) erbracht. Diese Gruppen zeigten, dass apoptotische Tumorzellen, auf deren Plasmamembran sich CCL5 befindet, von Makrophagen deutlich effektiver aufgenommen werden als solche, die kein CCL5 auf ihrer Oberfläche tragen (siehe Modell Abbildung 5.2).

Es stellt sich nun die Frage der biologischen Bedeutung dieses Vorgangs. Sicherlich fallen im Rahmen einer zytotoxischen T-Zell-Antwort erhebliche Mengen an toten Zellfragmenten an, welche womöglich ohne eine massiv verstärkte Aufnahme durch Makrophagen zu lange im Gewebe verweilen würden. Allgemein kommt der Beseitigung von apoptotischen Zellen eine wichtige Bedeutung zu und mit Störungen in diesem Prozess werden insbesondere Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht, da hier vermehrt Autoantigene im Gewebe persistieren. Ursächlich als gesichert gilt eine unzureichende Aufnahme apoptotischer Zellen beim Systemischen Lupus erythematoses, wobei hier entsprechende Autoantigene auf den apoptotischen Körpern nachgewiesen werden konnten [Gaipf, 2006; Potter, 2003]. In Anbetracht der

oben beschriebenen Zusammenhänge wäre es interessant zu untersuchen, ob eine mangelhafte Beladung von Zielzellen mit CCL5 ursächlich an diesem Krankheitsbild beteiligt sein könnte.

Weiterhin ist es denkbar, dass der Mechanismus der CCL5-vermittelten Aufnahme durch Makrophagen eine unterstützende Komponente bei der zytotoxischen T-Zell-Antwort darstellt. CCL5-markierte Zielzellen, in denen aufgrund suboptimaler Zytotoxinbedingungen nicht im ausreichenden Ausmaß Apoptose induziert wurde, könnten durch Makrophagen effektiv phagozytiert werden. Barber et al. zeigten 2003 anhand eines Mausmodells, dass  $CD8^+$  Gedächtniszellen, welche im Gegensatz zu gewöhnlichen Effektorzellen nur sehr wenig Perforin aufweisen, *in vitro* kaum in der Lage waren Zielzellen abzutöten, während dieser Vorgang *in vivo* erstaunlicher Weise



**Abbildung 5.2: Ablauf der Vernichtung einer Tumorzelle durch zytotoxische T-Zellen und Makrophagen**

Nach spezifischer Erkennung einer Tumorzelle durch eine zytotoxische T-Zelle orientieren sich Granula, die zytotoxische Effektormoleküle wie Perforin, Granzym A und Granzym B (alle grün) oder das Protein CCL5 (rot) enthalten, zur Zielzelle hin (A). Danach werden die zytotoxischen Effektormoleküle ausgeschüttet und gelangen in die Tumorzelle, in der sie daraufhin Apoptose auslösen; CCL5 hingegen wird nach Freisetzung auf der Oberfläche der Tumorzelle deponiert (B). Im Laufe der Apoptose bildet die Tumorzelle die charakteristischen blasenartigen Strukturen, die sich später von der Zelle ablösen und als apoptotische Körper bezeichnet werden. Auch in diesem Stadium befindet sich CCL5 noch auf der Plasmamembran der Zelle und der Zellfragmente (C). Makrophagen erkennen spezifisch CCL5-markierte Zellbestandteile und phagozytieren diese in effektiver Weise (D).

sehr schnell und effektiv ablief [Barber, 2003]. CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen weisen große Mengen an intrazellulärem CCL5 auf [Kaech, 2002] und die nur *in vivo* anwesenden Makrophagen könnten im Modell von Barber für die effektive Abtötung von CCL5-markierten "nicht-apoptotischen" Zielzellen verantwortlich gewesen sein. CCL5 könnte somit *in vivo* indirekt an der Zielzellvernichtung beteiligt sein, selbst wenn die Effektorzellen vor Ort nicht ausreichend mit "herkömmlichen" Effektormolekülen wie Perforin und Granzymen ausgestattet sind. Beweise hierfür müssen in Zukunft durch CCL5<sup>+</sup>/perforindefiziente und CCL5-defiziente/Perforin<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen in geeigneten Mausmodellen erbracht werden.

## 6. Zusammenfassung

Für die Entwicklung effektiver Immuntherapien gegen maligne Tumore sind detaillierte Kenntnisse über die immunologischen Vorgänge im Tumorgewebe nötig. In der vorliegenden Arbeit wurde das leukozytäre Infiltrat im Nierenzellkarzinom analysiert. Tumorinfiltrierende Makrophagen wurden in zehn verschiedenen Nierenzellkarzinomen in jeweils großer Anzahl und mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad nachgewiesen. Auch dendritische Zellen wurden in allen analysierten Tumoren gefunden. Dabei waren unreife dendritische Zellen diffus im Tumorgewebe verteilt, während reife dendritische Zellen in definierten Akkumulationen gemeinsam mit T-Zellen lokalisiert waren. Durch konfokale Lasermikroskopie konnten in diesen Arealen enge Kontakte reifer dendritischer Zellen mit T-Zellen nachgewiesen werden. Die Expression der für die intrazelluläre Signalweiterleitung relevanten CD3 $\zeta$ -Kette war in T-Zellen in diesen Arealen teilweise drastisch reduziert; dies könnte durch den Einfluss der dendritischen Zellen bedingt sein.

Quantitative Analysen der CD3 $\zeta$ -Kettenexpression Tumor infiltrierender T-Zellen zeigten, dass dieses Signalkaskaden-Protein in T-Zellen der meisten Nierenzellkarzinome vorhanden ist und somit eine mangelhafte Tumorantwort vermutlich nicht durch eine verminderte Expression der CD3 $\zeta$ -Kette bedingt ist. Lediglich bei zwei von 14 Tumoren konnte eine deutliche Minderexpression der CD3 $\zeta$ -Kette nachgewiesen werden. Eine lokale Abregulation der CD3 $\zeta$ -Kette wurde zudem im interstitiellen Bindegewebe vieler Tumore beobachtet.

Analysen von Tumor infiltrierenden T-Zellen ergaben, dass nur wenige das Effektorprotein Perforin enthielten. Durch konfokale Lasermikroskopie wurde gezeigt, dass dieses Effektormolekül in den wenigen Perforin<sup>+</sup> T-Zellen nicht gegen Zielzellen ausgerichtet ist und somit entweder keine Tumorzellen erkannt werden oder Defekte im Mechanismus der Ausrichtung von Perforin in diesen T-Zellen vorliegen. GMP17/TIA-1 ist ein Membranprotein der Vesikel, die die zytotoxischen Effektormoleküle enthalten und der Nachweis dieses Proteins in zahlreichen Tumor infiltrierenden T-Zellen weist darauf hin, dass diese trotz ihrer Perforindefizienz wahrscheinlich nicht naiv sind. Durch konfokale Lasermikroskopie wurde GMP17/TIA-1 in 30 % der infiltrierenden T-Zellen an umschriebenen Arealen in der Plasmamembran nachgewiesen. Dies ist als Resultat einer Fusion der intrazellulären Vesikel mit der Zellmembran zu werten und deutet auf aktive Zielzellerkennung durch T-Zellen im Tumor hin. Diese geht in der Regel mit einer Ausschüttung der Effektormoleküle einher und die Perforindefizienz im Nierenzellkarzinom könnte somit durch eine mangelhafte Wiederauffüllung der Bestände an zytotoxischen Molekülen bedingt sein.

Zytotoxische T-Zellen enthalten neben den Effektormolekülen auch das als Chemokin bekannte Protein CCL5. Es wurde gezeigt, dass CCL5 bei der Zielzellerkennung zusammen mit Perforin ausgeschüttet und dabei selektiv und zielgerichtet auf die

---

Plasmamembran der Tumorzelle übertragen wird. CCL5 befindet sich auch später noch auf der Oberfläche der resultierenden apoptotischen Körper. Die CCL5-Markierung der apoptotischen Tumorzellen fördert deren Aufnahme durch Makrophagen. Diese Beobachtungen weisen auf eine bisher unbekannte Kooperation von Perforin mit CCL5 und auf Interaktionen zwischen zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen bei der Eliminierung von Zellen hin.

## 7. Literaturverzeichnis

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.

Alberti L, Bachelot T, Duc A, Biota C, Blay JY. A spliced isoform of interleukin 6 mRNA produced by renal cell carcinoma encodes for an interleukin 6 inhibitor. *Cancer Res* 2005;65(1):2-5.

Ambe K, Mori M, Enjoji M. S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer* 1989;63(3):496-503.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.

Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 2004;4(9):675-87.

Barber DL, Wherry EJ, Ahmed R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *J Immunol* 2003;171(1):27-31.

Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2(6):401-9.

Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 1999;190(10):1417-26.

Blankenstein T, Qin Z. The role of IFN-gamma in tumor transplantation immunity and inhibition of chemical carcinogenesis. *Curr Opin Immunol* 2003;15(2):148-54.

Böcker W, Denk H, Heitz PU. Pathologie, 2. Auflage. Urban&Fischer Verlag München Jena; 2001.

Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1993;690:42-9.

- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997;18(6):267-8.
- Bossi G, Trambas C, Booth S, Clark R, Stinchcombe J, Griffiths GM. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* 2002;189:152-60.
- Bouso P, Robey E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* 2003;4(6):579-85.
- Bronstein-Sitton N, Cohen-Daniel L, Vaknin I, Ezernitchi AV, Leshem B, Halabi A, Houry-Hadad Y, Greenbaum E, Zakay-Rones Z, Shapira L, Baniyash M. Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function. *Nat Immunol* 2003;4(10):957-64.
- Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2000;67(1):97-103.
- Cardi G, Heaney JA, Schned AR, Phillips DM, Branda MT, Ernstoff MS. T-cell receptor zeta-chain expression on tumor-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997;57(16):3517-9.
- Catalfamo M, Karpova T, McNally J, Costes SV, Lockett SJ, Bos E, Peters PJ, Henkart PA. Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity* 2004;20(2):219-30.
- Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, Brockstedt D, Dubensky TW, Stins MF, Lanier LL, Pardoll DM, Housseau F. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006;12(2):207-13.
- Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol* 2004;25(6):323-7.
- de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998;9(3):325-36.

DeVries ME, Ran L, Kelvin DJ. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin Immunol* 1999;11(2):95-104.

Elsasser-Beile U, Rindsfuser M, Grussenmeyer T, Schultze-Seemann W, Wetterauer U. Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4(+) or CD8(+) tumour-infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer. *Br J Cancer* 2000;83(5):637-41.

Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000;257(2):231-7.

Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997;73(3):309-16.

Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today* 1999;20(4):158-60.

Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltrott RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E, et al. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993;53(23):5613-6.

Fishman M, Seigne J, Antonia S. Novel therapies for renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10(6):1033-44.

Fox SB, Jones M, Dunnill MS, Gatter KC, Mason DY. Langerhans cells in human lung tumours: an immunohistological study. *Histopathology* 1989;14(3):269-75.

Frank SJ, Niklinska BB, Orloff DG, Mercep M, Ashwell JD, Klausner RD. Structural mutations of the T cell receptor zeta chain and its role in T cell activation. *Science* 1990;249(4965):174-7.

Froelich CJ. Interview about cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. *Modern Aspects of Immunobiology* 2002;2(4):158.

Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001;22(10):556-60.

Fuchs EJ, Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 1996;8(5):271-80.

- Furukawa T, Watanabe S, Kodama T, Sato Y, Shimosato Y, Suemasu K. T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer* 1985;56(11):2651-6.
- Gaipl US, Kuhn A, Sheriff A, Munoz LE, Franz S, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Clearance of apoptotic cells in human SLE. *Curr Dir Autoimmun* 2006;9:173-87.
- Galkina E, Tanousis K, Preece G, Tolaini M, Kioussis D, Florey O, Haskard DO, Tedder TF, Ager A. L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J Exp Med* 2003;198(9):1323-35.
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999;5(11):1249-55.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997;18(2):89-95.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100(5):575-85.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710-5.
- Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 2001;166(1):1-5.
- Gratama JW, Zea AH, Bolhuis RL, Ochoa AC. Restoration of expression of signal-transduction molecules in lymphocytes from patients with metastatic renal cell cancer after combination immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48(5):263-9.
- Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 1999;162(9):5212-23.

Gunji Y, Hori S, Aoe T, Asano T, Ochiai T, Isono K, Saito T. High frequency of cancer patients with abnormal assembly of the T cell receptor-CD3 complex in peripheral blood T lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 1994;85(12):1189-92.

Hamada I, Kato M, Yamasaki T, Iwabuchi K, Watanabe T, Yamada T, Itoyama S, Ito H, Okada K. Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22(6C):4281-4.

Hemmerlein B, Markus A, Wehner M, Kugler A, Zschunke F, Radzum HJ. Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, c-fms, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49(9):485-92.

Hjelmstrom P. Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. *J Leukoc Biol* 2001;69(3):331-9.

Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993;81(6):1607-13.

Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med* 1994;180(1):1-4.

Imai Y, Yamakawa M. Dendritic cells in esophageal cancer and lymph node tissues. *In Vivo* 1993;7(3):239-48.

Isaaz S, Baetz K, Olsen K, Podack E, Griffiths GM. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur J Immunol* 1995;25(4):1071-9.

Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Okumura H, Matsumoto M, Miyazono F, Hokita S, Aikou T. Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer. *Anticancer Res* 2003;23(5A):4079-83.

Jantzer P, Schendel DJ. Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo. *Cancer Res* 1998;58(14):3078-86.

Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 2002;111(6):837-51.

- Kaisho T, Akira S. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med* 2003;3(4):373-85.
- Kammula US, Lee KH, Riker AI, Wang E, Ohnmacht GA, Rosenberg SA, Marincola FM. Functional analysis of antigen-specific T lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens. *J Immunol* 1999;163(12):6867-75.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(13):7556-61.
- Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Nagura H, Yoshie O, Motegi K. Differential expression of CCL19 by DC-Lamp+ mature dendritic cells in human lymph node versus chronically inflamed skin. *J Pathol* 2003;199(1):98-106.
- Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M. In situ localization of IFN-gamma-positive cells in psoriatic lesional epidermis. *Eur J Dermatol* 2002;12(1):20-3.
- Kolbeck PC, Kaveggia FF, Johansson SL, Grune MT, Taylor RJ. The relationships among tumor-infiltrating lymphocytes, histopathologic findings, and long-term clinical follow-up in renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 1992;5(4):420-5.
- Kono K, Rensing ME, Brandt RM, Melief CJ, Potkul RK, Andersson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2(11):1825-8.
- Krejci KG, Markiewicz MA, Kwon ED. Immunotherapy for urological malignancies. *J Urol* 2004;171(2 Pt 1):870-6.
- Kuppers RC, Henney CS. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells. *J Immunol* 1977;118(1):71-6.
- Lai P, Rabinowich H, Crowley-Nowick PA, Bell MC, Mantovani G, Whiteside TL. Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996;2(1):161-73.

Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-93.

Leger-Ravet MB, Mathiot C, Portier A, Brandely M, Galanaud P, Fridman WH, Emilie D. Increased expression of perforin and granzyme B genes in patients with metastatic melanoma treated with recombinant interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1994;39(1):53-8.

Lespagnard L, Gancberg D, Rouas G, Leclercq G, de Saint-Aubain Somerhausen N, Di Leo A, Piccart M, Verhest A, Larsimont D. Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int J Cancer* 1999;84(3):309-14.

Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3(5):361-70.

Lieberman J, Manjunath N, Shankar P. Avoiding the kiss of death: how HIV and other chronic viruses survive. *Curr Opin Immunol* 2002;14(4):478-86.

Lin J, Weiss A. T cell receptor signalling. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 2):243-4.

Lokich J. Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review. *Am J Clin Oncol* 1997;20(4):416-8.

Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000;74:181-273.

Matsuda M, Petersson M, Lenkei R, Taupin JL, Magnusson I, Mellstedt H, Anderson P, Kiessling R. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int J Cancer* 1995;61(6):765-72.

Medley QG, Kedersha N, O'Brien S, Tian Q, Schlossman SF, Streuli M, Anderson P. Characterization of GMP-17, a granule membrane protein that moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(2):685-9.

Mempel TR, Pittet MJ, Khazaie K, Weninger W, Weissleder R, von Boehmer H, von Andrian UH. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 2006;25(1):129-41.

Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;92(12):4778-91.

Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 1992;258(5089):1795-8.

Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez AC, Manes S, Viola A. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 2005;6(5):465-71.

Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt H, Taupin JL, Vivier E, Anderson P, Kiessling R. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993;53(23):5610-2.

Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 2001;61(13):5132-6.

Nomori H, Watanabe S, Nakajima T, Shimosato Y, Kameya T. Histiocytes in nasopharyngeal carcinoma in relation to prognosis. *Cancer* 1986;57(1):100-5.

O'Laughlin S, Braverman M, Smith-Jefferies M, Buckley P. Macrophages (histiocytes) in various reactive and inflammatory conditions express different antigenic phenotypes. *Hum Pathol* 1992;23(12):1410-8.

Olive C, Cheung C, Nicol D, Falk MC. Expression of cytokine mRNA transcripts in renal cell carcinoma. *Immunol Cell Biol* 1998;76(4):357-62.

Ortiz BD, Nelson PJ, Krensky AM. Switching gears during T-cell maturation: RANTES and late transcription. *Immunol Today* 1997;18(10):468-71.

Peng L, Krauss JC, Plautz GE, Mukai S, Shu S, Cohen PA. T cell-mediated tumor rejection displays diverse dependence upon perforin and IFN-gamma mechanisms that cannot be predicted from in vitro T cell characteristics. *J Immunol* 2000;165(12):7116-24.

- Poli G, Bordignon C. Unplugging the T cell receptor. *Nat Immunol* 2003;4(10):943-4.
- Potter PK, Cortes-Hernandez J, Quartier P, Botto M, Walport MJ. Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. *J Immunol* 2003;170(6):3223-32.
- Radoja S, Frey AB. Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. *Mol Med* 2000;6(6):465-79.
- Radoja S, Saio M, Schaer D, Koneru M, Vukmanovic S, Frey AB. CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol* 2001;167(9):5042-51.
- Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 2001;91(11):2136-47.
- Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993;178(2):509-19.
- Renard V, Cambiaggi A, Vely F, Blery M, Olcese L, Olivero S, Bouchet M, Vivier E. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 1997;155:205-21.
- Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997;15:405-31.
- Ritter M, Buechler C, Kapinsky M, Schmitz G. Interaction of CD163 with the regulatory subunit of casein kinase II (CKII) and dependence of CD163 signaling on CKII and protein kinase C. *Eur J Immunol* 2001;31(4):999-1009.
- Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411(6835):380-4.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182(2):389-400.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000;177:134-40.

Salvadori S, Gansbacher B, Pizzimenti AM, Zier KS. Abnormal signal transduction by T cells of mice with parental tumors is not seen in mice bearing IL-2-secreting tumors. *J Immunol* 1994;153(11):5176-82.

Schendel DJ, Oberneder R, Falk CS, Jantzer P, Kressenstein S, Maget B, Hofstetter A, Riethmuller G, Nossner E. Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy. *J Mol Med* 1997;75(6):400-13.

Schroder S, Schwarz W, Rehenpenning W, Loning T, Bocker W. Dendritic/Langerhans cells and prognosis in patients with papillary thyroid carcinomas. Immunocytochemical study of 106 thyroid neoplasms correlated to follow-up data. *Am J Clin Pathol* 1988;89(3):295-300.

Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001;61(10):3932-6.

Schwaab T, Schned AR, Heaney JA, Cole BF, Atzpodien J, Wittke F, Ernstoff MS. In vivo description of dendritic cells in human renal cell carcinoma. *J Urol* 1999;162(2):567-73.

Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001;2(4):293-9.

Soilleux EJ. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 2003;104(4):437-46.

Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 2002;71(3):445-57.

Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001;15(5):751-61.

Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999;2(1):99-105.

Swanson BJ, Murakami M, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity* 2002;17(5):605-15.

Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 1997;278(5335):117-20.

Tartour E, Latour S, Mathiot C, Thiounn N, Mosseri V, Joyeux I, D'Enghien CD, Lee R, Debre B, Fridman WH. Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int J Cancer* 1995;63(2):205-12.

Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1486-90.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):735-47.

Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4(3):585-93.

Tsujitani S, Kakeji Y, Watanabe A, Kohnoe S, Maehara Y, Sugimachi K. Infiltration of dendritic cells in relation to tumor invasion and lymph node metastasis in human gastric cancer. *Cancer* 1990;66(9):2012-6.

Tyner J, Uchida O, Kajiwara N, Kim E, Patel A, O'Sullivan M, Walter M, Schwendener R, Cook D, Danoff T, Holtzman M. CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. *Nat Immunol* 2005;11(11):1180-7.

van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184(5):1781-90.

Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997;9(5):684-93.

Van den Hove LE, Van Gool SW, Van Poppel H, Baert L, Coorevits L, Van Damme B, Ceuppens JL. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1997;109(3):501-9.

van Herpen CM, van der Laak JA, de Vries IJ, van Krieken JH, de Wilde PC, Balvers MG, Adema GJ, De Mulder PH. Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clin Cancer Res* 2005;11(5):1899-909.

van Oers NS. T cell receptor-mediated signs and signals governing T cell development. *Semin Immunol* 1999;11(4):227-37.

Vicari AP, Caux C, Trinchieri G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 2002;12(1):33-42.

Visco C, Magistrelli G, Bosotti R, Perego R, Rusconi L, Toma S, Zamai M, Acuto O, Isacchi A. Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* 2000;39(10):2784-91.

Vogelzang NJ, Stadler WM. Kidney cancer. *Lancet* 1998;352(9141):1691-6.

Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, Pasternack MS, Luster AD. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 1998;391(6670):908-11.

Winter H, Hu HM, Urba WJ, Fox BA. Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J Immunol* 1999;163(8):4462-72.

Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995;269(5228):1281-4.

Zea AH, Curti BD, Longo DL, Alvord WG, Strobl SL, Mizoguchi H, Creekmore SP, O'Shea JJ, Powers GC, Urba WJ, et al. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1327-35.

Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, Guo J, Huang X, Chen T, Wang J, Cao X. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2004;5(11):1124-33.

Zwadlo G, Brocker EB, von Bassewitz DB, Feige U, Sorg C. A monoclonal antibody to a differentiation antigen present on mature human macrophages and absent from monocytes. *J Immunol* 1985;134(3):1487-92.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6(4):295-307.

## Abkürzungsverzeichnis

CFDA SE	Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forwad scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-2	Interleukin-2
ITAM	<i>immune receptor tyrosine-based activation motifs</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonucleinsäure</i>
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	para-Formaldehyd
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
Rantes	<i>Regulated on activation and normally T cell expressed and secreted</i>
RCC	<i>renal cell carcinoma</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## Danksagung

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Elfriede Nößner für die Überlassung der Thematik, für ihr großes Engagement bei der Betreuung der Arbeit und insbesondere auch für die Schaffung einer zwischenmenschlich angenehmen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Bei Frau Prof. Dolores Schendel möchte ich mich bedanken, dass sie in ihrer Funktion als Institutsleitung diese Arbeit ermöglicht hat.

Bei Anna Brandl und Dr. Michaela Hackenberg möchte ich mich für die kompetente Einweisung in die Methoden der Zellkultur und der Immunhistologie bedanken.

Sehr dankbar bin ich weiterhin Frau Dr. Elisabeth Kremmer und Herrn Dr. Josef Mysliwietz für die zahlreichen wertvollen Ratschläge aus ihrem reichen Erfahrungsschatz.

Besonders in Erinnerung wird mir Sibylle Ruhland bleiben, die mir – ebenfalls auf dem Weg zu ihrer Promotion – bei zahlreichen Nachtschichten im Labor freundschaftliche Gesellschaft leistete. Dafür danke ich ihr sehr.

Meiner Frau Christine will ich an dieser Stelle für ihr so weit reichendes Verständnis für den zuweilen hohen Zeitaufwand meiner wissenschaftlichen Tätigkeit danken.

---

## Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

Baur N, Anz D, Rosmanit M, Schendel DJ, Noessner E, Disturbed Metabolism of Cytotoxins in Renal Cell Carcinoma Infiltrating Lymphocytes Defining the Lack of Cytolytic Effector Function, 12th International Congress of Immunology, 2003, Montreal, Canada, Poster, Abstract N° 2455, Publication # Th53.127

Ambach A, Noessner E, Anz D, Weren A, Hartig R, Bonnekoh B, König W, Schraven B, König B, Nelson PJ, Gollnick H, A new granula system in human cytotoxic lymphocytes: identification, isolation and characterization of the release kinetics of CCL5-granules, Deutscher Hautkrebskongress, 15. Jahrestagung der ADO, 2005, Magdeburg, Poster, Abstract N° P11

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden unter folgenden Titeln in internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

Li Z\*, Nelson PJ\*, Anz D, Noessner E, Proudfoot A, Horuk R, Schlöndorff D, Gröne HJ, CCL5-release by cytotoxic T cells marks target cells and enhances phagocytosis, eingereicht und in Revision

Anz D\*, Baur N\*, Rosmanit M, Mysliwietz J, Schendel DJ, Noessner E, Disturbed cytotoxic effector function of tumor-infiltrating lymphocytes hinders tumor growth control despite tumor recognition *in situ*, in Vorbereitung

\* diese Autoren leisteten den gleichen Beitrag zum Manuskript

## Lebenslauf

**David Anz**  
geboren am 11.3.1977 in München

### Schulbildung, Zivildienst und Auslandsaufenthalt

9/1983-8/1996	Grundschule und Gymnasium (Luisengymnasium) in München, Abiturnote 1,7
9/1996-10/1997	Zivildienst in einer Heilpädagogischen Tagesstätte für geistig behinderte Kinder in München
10/1997-8/1998	Studium der Verwaltungswissenschaften in Montpellier, Frankreich (2 Semester). Note des "Erstjahresexamens": 14/20 Punkte (Bestnote aller Teilnehmer)

### Medizinstudium

9/1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
8/2000	Ärztliche Vorprüfung, Note 1,66
8/2001	1. Staatsexamen, Note 2,0
8/2004	2. Staatsexamen, Note 1,66
10/2005	3. Staatsexamen, Note 1,0 Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung 1,49 (sehr gut)

### Praktisches Jahr

11/2004-2/2005	Pädiatrie, Kinderklinik des Kreiskrankenhauses Starnberg
2/2005-5/2005	Innere Medizin, Medizinische Klinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München
5/2005-8/2005	Chirurgie, Chirurgische Klinik des Krankenhauses München Harlaching

### Dissertation

10/2001-2/2005	<i>Einrichtung:</i> GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit München, Institut für Molekulare Immunologie <i>Leitung/Betreuung:</i> Prof. D. J. Schendel, PhD / PD Dr. rer. nat. E. Nößner
----------------	--

### Beruf

seit 1/2006	Wissenschaftlicher Assistent in der Medizinischen Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
-------------	---

München, den 8. Dezember 2006