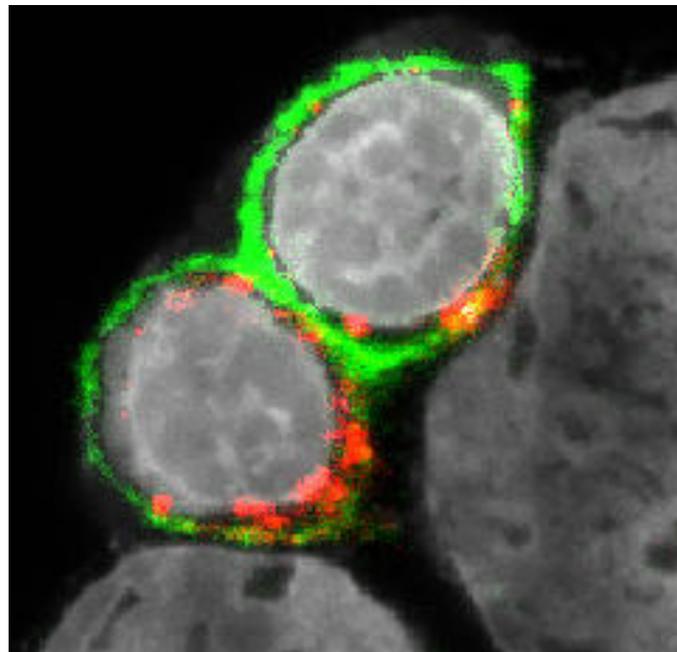


Tumormilieu-induzierte Inaktivierung zytotoxischer Lymphozyten

Petra S. A. Skrablin



München 2007

Tumormilieu-induzierte Inaktivierung zytotoxischer Lymphozyten

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

Angefertigt am
Institut für Molekulare Immunologie
GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit –
unter der Leitung von Prof. Dr. Dolores. J. Schendel
und der Betreuung von PD Dr. Elfriede Nößner

vorgelegt von
Petra S. A. Skrablin
München, den 15.11.2007

Erstgutachter:

Frau PD Dr. Christine S. Falk

Zweitgutachter:

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Mitgutachter:

Herr Prof. Dr. Heinrich Jung

Frau PD Dr. Angelika Böttger

Dissertation eingereicht am:

15.11.2007

Tag der mündlichen Prüfung:

02.04.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	T-Lymphozyten	2
1.2.1	Effektorfunktion zytotoxischer T-Lymphozyten	3
1.2.2	Perforin	7
1.2.3	Granzym A und Granzym B	8
1.2.4	RANTES	9
1.3	Funktion von Makrophagen	10
1.4	Das humane Nierenzellkarzinom	11
1.5	Tumorerfiltrierende Lymphozyten und deren Beeinflussung durch das Tumormilieu	14
1.6	Das Tumormilieu	15
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
2	Material	17
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	17
2.2	Chemikalien	19
2.3	Zellkultur	20
2.3.1	Medien und Puffer (steril)	20
2.3.2	Medienzusätze und sonstige Lösungen	21
2.4	Lösungen und Puffer	22
2.5	Gewebeschnitte	23
2.6	Blutproben	24
2.7	Zellen	25
2.8	Antikörper	26
2.8.1	Primärantikörper	26
2.8.2	Sekundärantikörper	27
3	Methoden	29
3.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur	29
3.1.1	Allgemeine Anmerkungen	29
3.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	29
3.1.3	Kultivierung und Trypsinierung von adhärent wachsenden Zelllinien	30
3.1.4	Kultivierung von Suspensionszellen	31
3.1.5	Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen	31
3.1.6	Bestimmung der Zellzahl	32
3.2	Koinkubation von T-Zellklonen und Tumorzellen	33
3.3	Stimulationsversuch zum Nachweis der Zytokin-Sekretion	33
3.4	Nachweis der CD107-Oberflächenmobilisierung	34
3.5	Nachweis der lytischen Aktivität von T-Zellen	35
3.5.1	Nachweis der Chromfreisetzung nach Zellyse der Zielzellen (Chromfreisetzungstest)	35
3.5.2	Nachweis der Zellyse von fluoreszenzmarkierten Zielzellen	36
3.6	Inkubation von T-Zellklonen auf einem Tumorzellrasen	37
3.7	Generierung von Makrophagen und dendritischen Zellen aus mononukleären Blutzellen	38

3.7.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut.....	38
3.7.2	Anreicherung von Monozyten	38
3.8	<i>Nachweis der Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen durch Makrophagen.....</i>	<i>39</i>
3.8.1	Herstellung apoptotischer Tumorzellen	39
3.8.2	Nachweis der Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen	40
3.9	<i>Nachweis der Makropinozytose</i>	<i>41</i>
3.10	<i>Nachweis von Zytokinen mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	<i>42</i>
3.10.1	Nachweis von IFN- γ und IL-2	43
3.10.2	Nachweis von TGF- β	43
3.10.3	Auswertung des ELISA.....	43
3.11	<i>Durchflusszytometrie</i>	<i>44</i>
3.11.1	Markierung von Zelloberflächenproteinen.....	46
3.11.2	Markierung von intrazellulären Proteinen.....	47
3.11.3	Markierung toter Zellen	48
3.11.4	Markierung der T-Zell-Membran.....	48
3.11.5	Messung und Auswertung der Messdaten.....	50
3.12	<i>Immunfluoreszenzfärbung.....</i>	<i>53</i>
3.12.1	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit kryokonservierten Gewebeschnitten	53
3.12.2	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung von Paraffingewebeschnitten.....	55
3.13	<i>Konfokale Laser-Rastermikroskopie.....</i>	<i>55</i>
3.13.1	Aufnahme und Bearbeitung der aufgenommenen Bilder	56
3.14	<i>Gewinnung von Tumorkulturüberstand</i>	<i>57</i>
3.15	<i>Einstellung des pH-Werts von Zellkulturmedium</i>	<i>57</i>
3.16	<i>Statistische Analyse</i>	<i>57</i>
4	Ergebnisse	59
4.1	<i>Effektorstatus und zytotoxisches Potential von infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten in Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen.....</i>	<i>59</i>
4.1.1	Nachweis lytischer Granula in Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8 ⁺ -Lymphozyten	59
4.1.2	Nachweis von Perforin in Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8 ⁺ -Lymphozyten	62
4.1.3	Nachweis der Tumorzellerkennung durch CD8 ⁺ -Lymphozyten	64
4.1.3.1	<i>In vitro</i> Modellsystem zum Nachweis der Tumorzellerkennung.....	66
4.1.3.2	Nachweis der Tumorzellerkennung durch infiltrierende CD8 ⁺ -Lymphozyten im Nierenzellkarzinomgewebe	69
4.1.4	Nachweis von Perforin in CD8 ⁺ -Lymphozyten mit synaptischem GMP-17	71
4.1.5	Lytisches Reaktionsprofil der infiltrierenden GMP-17 ⁺ CD8 ⁺ -Effektorzellpopulation	73
4.1.6	Lokalisation des GMP-17 in den gewebeinfiltrierenden Perforin ⁺ und Perforin ⁻ GMP-17 ⁺ CD8 ⁺ -Lymphozyten	74
4.2	<i>Einfluss von Tumorzellen auf Effektormoleküle und Effektorfunktion von zytotoxischen T-Lymphozyten in vitro</i>	<i>77</i>
4.2.1	Verlust von Perforin in zytotoxischen T-Lymphozyten durch Tumorzellüberschuss	77
4.2.2	Nachweis der Degranulation zytotoxischer T-Lymphozyten durch Stimulierung mit hoher und niedriger Tumorzellzahl.....	84
4.2.3	Modulation des Gehalts an Effektormolekülen in zytotoxischen T-Lymphozyten durch Tumorzellen unabhängig von Zielzellerkennung	86
4.2.4	Modulation des Gehalts an RANTES in zytotoxischen T-Lymphozyten durch Inkubation mit Tumorzellen	90
4.3	<i>Funktionelle Kapazität von Perforin⁻ T-Effektorlymphozyten.....</i>	<i>93</i>
4.3.1	Verringerte Zytotoxizität des Perforin ⁻ -ZTL Klon JB4	93
4.3.1.1	Nachweis lytischer Granula im Perforin ⁻ -ZTL Klon JB4	95
4.3.1.2	Analyse der Degranulationsfähigkeit des Perforin ⁻ -ZTL Klon JB4 nach Stimulierung mit Zielzellen	97

4.3.1.3	Gestörte Fusion lytischer Granula mit der Plasmamembran nach Kontakt mit Zielzellen im Perforin ⁻ -ZTL Klon JB4	99
4.3.2	IFN- γ -Sekretion des Perforin ⁻ -ZTL Klons JB4 nach Stimulierung mit Zielzellen	100
4.3.3	Analyse der CD3 ζ -Kette in JB4 nach der Inkubation mit Tumorzellen	101
4.4	<i>Re-Expression von Perforin im Perforin⁻-ZTL Klon JB4</i>	102
4.5	<i>Einfluss von Tumormilieu-assoziierten Faktoren auf die Effektormoleküle und die Effektorfunktion von zytotoxischen T-Lymphozyten in vitro</i>	104
4.5.1	Einfluss von RCC26 sezernierten Faktoren auf den Gehalt von Effektormolekülen und die lytische Kapazität von zytotoxischen T-Lymphozyten	104
4.5.2	Einfluss des pH-Werts auf den Effektormolekülgehalt und die IFN- γ -Sekretion von zytotoxischen T-Lymphozyten während der Stimulierung mit Zielzellen	108
4.5.3	Einfluss der Tumorzell-dichte auf die IFN- γ -Sekretion und den Perforingehalt von zytotoxischen T-Lymphozyten	111
4.5.4	Einfluss von RCC26-Kulturüberstand und TGF- β auf die Effektorfunktion von zytotoxischer T-Lymphozyten	115
4.6	<i>RANTES als Effektormolekül zytotoxischer T-Lymphozyten</i>	118
4.6.1	Herstellung und Charakterisierung humaner Makrophagen	119
4.6.2	Einfluss von RANTES auf die Phagozytose ZTL-induzierter apoptotischer Tumorzellen durch Makrophagen	121
5	Diskussion	125
5.1	<i>Tumorzellerkennung durch infiltrierende CD8⁺-Effektorlymphozyten am Beispiel des Nierenzellkarzinoms</i>	126
5.2	<i>Funktionelle Defizite Perforin⁻CD8⁺-Effektorlymphozyten</i>	130
5.3	<i>Induktion Perforin⁻ funktionsdefekter CD8⁺-Effektorlymphozyten durch Tumormilieu-assoziierte Faktoren</i>	131
5.4	<i>Entwicklung von Maßnahmen zur Revertierung des Perforin⁻-Phänotyps zytotoxischer T-Lymphozyten und die Bedeutung des Chemokins RANTES</i>	133
6	Zusammenfassung	135
7	Literaturverzeichnis	139
8	Verwendete Abkürzungen	151
9	Anhang	153
9.1	<i>Gehalt an Perforin im ZTL Klon JB4 während der Koinkubation mit KT-195</i>	153
9.2	<i>Gehalt an Granzym A und Granzym B im ZTL Klon JB4 während der Koinkubation mit KT-195</i>	154
9.3	<i>Gehalt an RANTES im ZTL Klon JB4 während der Koinkubation mit RCC26</i>	155
9.4	<i>Gehalt an Perforin, Granzym A und Granzym B im ZTL Klon TyrF8 während der Koinkubation mit Mel624.38</i>	156
10	Lebenslauf	157
11	Danksagung	159

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Lebewesen sind ständig den Angriffen anderer Organismen ausgesetzt. Um sich erfolgreich gegen pathogene Mikroorganismen, Viren und Parasiten zur Wehr zu setzen, besitzen höhere Wirbeltiere ein hoch entwickeltes Abwehrsystem, das Immunsystem (lat. *immunis*, unberührt, frei). Das Immunsystem erkennt Eindringlinge als fremd und vernichtet diese in einem komplexen Zusammenspiel von mehreren Organen, verschiedenen Zelltypen und zahlreichen Molekülen. Hinsichtlich der stammesgeschichtlichen Entwicklung unterscheidet man dabei die unspezifische (angeborene) Immunabwehr von der spezifischen (erworbenen) Immunabwehr. In erster Linie schützen mechanische Barrieren, wie die Epithelien, den Wirt gegen das Eindringen von Erregern. Kommt es dennoch zum Eindringen dieser, werden sie durch Faktoren der angeborenen Immunabwehr, unabhängig der Erreger, bekämpft. Zu der angeborenen Immunabwehr zählen zelluläre Komponenten, wie Makrophagen, dendritische Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten, aber auch Moleküle, wie Zytokine und Faktoren des Komplementsystems. Wird diese Verteidigungsbarriere durchbrochen, erfolgt die Aktivierung der spezifischen Immunabwehr, die sich spezifisch gegen jeden Eindringling richtet. In der erworbenen Immunabwehr haben vor allem T-Zellen und B-Zellen eine entscheidende Funktion. Bei der Aktivierung der T-Zellen und B-Zellen spielen dendritische Zellen und Makrophagen eine entscheidende Rolle. Sie präsentieren nach Aufnahme und Verdauung von Fremdkörpern Teile dieser in Form von Peptiden (Antigene) über Moleküle, die von Genen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) kodiert werden. Nach Einwanderung in lymphatische Gewebe, wie Milz und Lymphknoten, können sie diese dann den Lymphozyten präsentieren. Lymphozyten sind daraufhin in der Lage eine spezifische Immunantwort gegen nahezu jedes Antigen aufzubringen. Jeder ausgereifte Lymphozyt besitzt einen einzigartigen Antigenrezeptor und trägt damit in der Gesamtheit der Lymphozyten zu einem riesigen Repertoire an Antigenrezeptoren bei, die jeweils unterschiedliche Antigene erkennen können. Ein weiteres Charakteristikum der erworbenen Immunabwehr ist die Bildung von antigenspezifischen Gedächtniszellen in der Phase einer erfolgreichen Erstabwehr eines Krankheitserregers. Die Gedächtniszellen bleiben über einen längeren Zeitraum erhalten und

expandieren nach erneutem Antigenkontakt, wodurch es zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort kommt.

1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, entstehen im Knochenmark aus undifferenzierten Vorläuferzellen und wandern in den Thymus (daher „T^c“), wo sie ausreifen. T-Zellen tragen an ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor (TZR), mit dem jede T-Zelle jeweils ein spezifisches Antigen erkennen kann. Im Gegensatz zu den B-Lymphozyten, die auch freie Antigene erkennen, erkennen T-Zellen nur Antigene, die im Komplex mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen präsentiert werden. Die unterschiedlichen Typen von T-Zellen werden nach den Proteinen auf ihrer Zellmembran eingeteilt, die gleichzeitig für die Funktionen der Zellen wichtig sind. So tragen T-Helferzellen das *cluster of differentiation* (CD)4-Protein (CD4⁺-T-Zellen) und die zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) das CD8-Protein

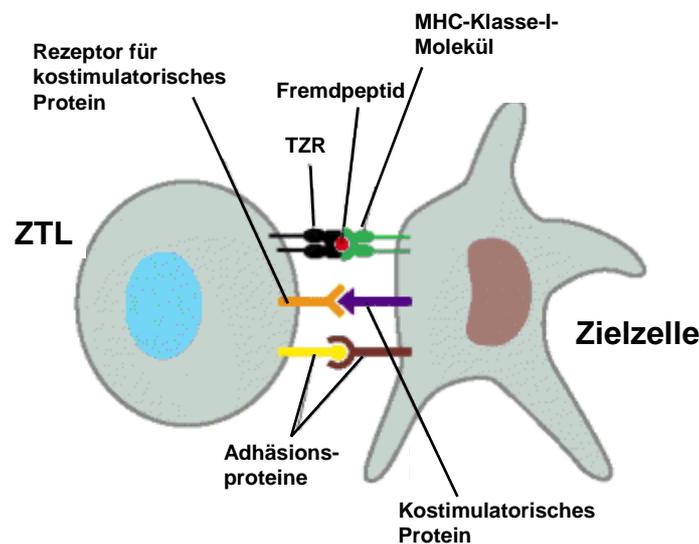


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Erkennung einer Zielzelle durch eine zytotoxische T-Zelle. Der TZR bindet spezifisch an den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex, wenn das entsprechende Peptid von der Zielzelle präsentiert wird. Zusätzlich kommt es zur Bindung der Adhäsionsproteine sowie der kostimulatorischen Proteine der Zielzelle mit den entsprechenden Rezeptoren auf der ZTL. Abkürzungen: ZTL: zytotoxische T-Zelle, TZR: T-Zell-Rezeptor, MHC: major histocompatibility complex. Modifiziert nach (2).

(CD8⁺-T-Zellen) auf ihrer Oberfläche. Bis zur Entstehung einer reifen T-Zelle muss sie mehrere Entwicklungsstadien durchlaufen. Dabei ist die Bildung eines funktionellen TZR entscheidend. Der TZR ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette, welches den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex bindet. Er ist mit dem CD3-Komplex assoziiert, welcher als eine Komponente das Protein CD3 ζ enthält. Nachdem der TZR einen MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex auf der Zielzelle gebunden hat, kommt es zur Phosphorylierung der Signaltransduktions-Untereinheit durch Tyrosinkinase und dadurch zur Signalweiterleitung (4). Je nach Art der T-Zelle wird durch die Signaltransduktion eine andere Effektorfunktion induziert. ZTL sind in der Lage infizierte Zellen nach Erkennung des über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentierten Antigens abzutöten. MHC-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert, wodurch alle Körperzellen abgetötet werden können, wenn sie das Antigen tragen, das der TZR erkennt. T-Helferzellen leisten nach Erkennung von Antigenen über MHC-Klasse-II-Moleküle durch die Sekretion von förderlichen Zytokinen wichtige CD8⁺-T-Zellhilfe und können Antikörperproduzierende B-Zellen aktivieren. MHC-Klasse-II-Moleküle werden im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I-Molekülen nur von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert.

1.2.1 Effektorfunktion zytotoxischer T-Lymphozyten

ZTL können nach Zielzellerkennung zum einen die Zielzelle abtöten und zum anderen entzündungsfördernde Zytokine, darunter Interferon (IFN)- γ , sezernieren. IFN- γ führt zur Verstärkung der weiteren Immunantwort und kann die Expression von MHC-Molekülen auf entarteten und virusinfizierten Körperzellen erhöhen, was wiederum zur verstärkten Aktivierung der ZTL beiträgt (5). Der Mechanismus der Zytotoxizität von ZTL beruht auf der Induktion von Selbsttod (Apoptose) in den Zielzellen. Diese kann zum einen durch Interaktion des Rezeptors Fas, welches sich auf der Zielzelloberfläche befindet, mit dem Fas-Liganden der ZTL oder durch die Ausschüttung von zytotoxischen Effektormolekülen nach Zielzellerkennung erfolgen (6). Beim letzteren spielen das Effektormolekül Perforin sowie die Serinproteasen, Granzyme A und Granzym B, eine entscheidende Rolle. Nach der Ausschüttung ermöglicht Perforin den Eintritt der Granzyme und weiterer Effektormoleküle in die Zielzelle (1). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Perforin keine Porenbildung der Plasmamembran der Zielzelle nach dem ursprünglichen Modell verursacht (7) (8), sondern eine Porenbildung der Endosomenmembran

bewirkt, um den Eintritt der durch Endozytose aufgenommenen Granzyme in die Zielzelle zu ermöglichen (9, 10). Ein weiteres Modell postuliert, dass Perforin einen Membran-Reparaturmechanismus in der Zielzelle induziert und so den Eintritt der Granzyme ermöglicht (11). Die Granzyme lösen anschließend in der Zielzelle eine Signalkaskade aus, die letztendlich zur Apoptose der Zielzelle führt (1).

ZTL entwickeln sich aus naiven $CD8^+$ -T-Zellen, die noch nicht mit Effektormolekülen ausgestattet sind, zu reifen Effektorzellen. Bei erstem Antigenkontakt wird in naiven $CD8^+$ -T-Zellen ein Differenzierungsprogramm ausgelöst, welches ab Tag 6 bis Tag 7 zur Expression von Effektormolekülen führt. Diese werden in speziellen sekretorischen Lysosomen (lytische Granula, Abb. 1.2) gespeichert (12). Aufgrund der Abstammung von Lysosomen befinden sich in der Membran lytischer Granula lysosomenspezifische Proteine wie *lysosomal associated membran protein* (LAMP)-1 und LAMP-2 (CD107a bzw. CD107b) sowie LAMP-3 (CD63) (13). Daneben enthalten lytische Granula auch spezifische Membranproteine wie das Granulamembranprotein 17 (*granule membrane protein of 17 kDa*, GMP-17) (14, 15). Das Membranprotein GMP-17 besitzt vier Transmembrandomänen und das Epitop, welches von dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten GMP-17-spezifischen Antikörper erkannt wird, ist am carboxyterminalen Ende des Proteins lokalisiert.

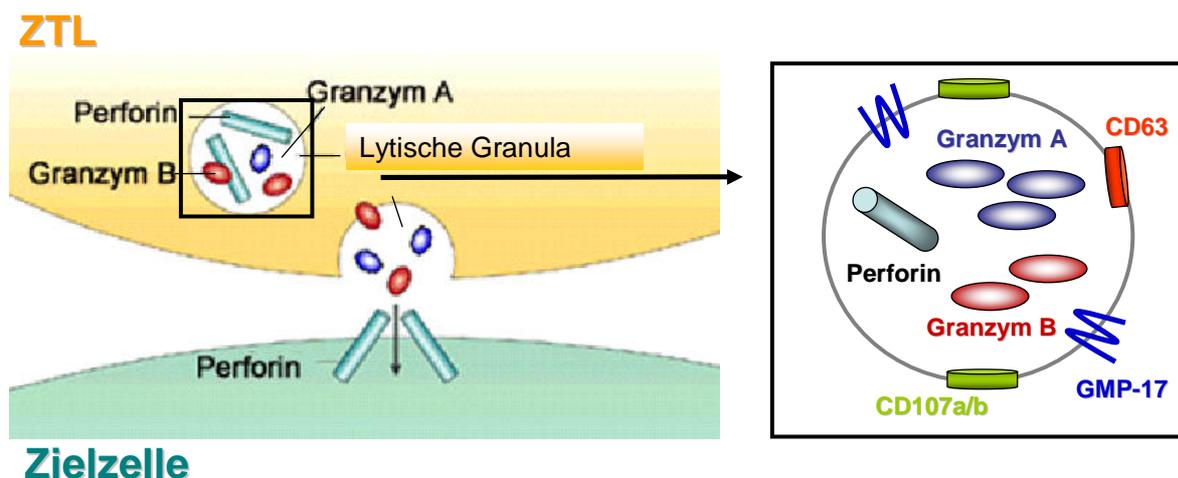


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Exozytose lytischer Granula von ZTL nach Zielzellkontakt. Nach Zielzellkontakt polarisieren die lytischen Granula der ZTL zur Zielzellkontaktstelle und verschmelzen mit der T-Zellplasmamembran, wodurch es zur Sekretion der zytotoxischen Effektormoleküle kommt. Die Vergrößerung zeigt ein lytisches Granulum mit den Effektormolekülen Perforin, Granzym A und Granzym B sowie den Granulamembranproteinen GMP-17, CD107a bzw. CD107b und CD63. Abkürzungen: ZTL: zytotoxische T-Zelle. Modifiziert nach (1).

Nach Bindung des TZR an den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex (pMHC) der Zielzelle kommt es zur Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen der Effektorzelle und der Zielzelle (16). Dadurch wird eine Signalkaskade in der ZTL gestartet, die zum einen lytische Granula zur Zielzellkontaktstelle hin polarisiert und zum anderen eine transkriptionelle Aktivierung von Genen, die unter anderem für Zytokine kodieren, induziert (17). Die immunologische Synapse wurde erstmalig in CD4⁺-T-Zellen beobachtet, wenn diese mit hoher Antigenkonzentration aktiviert wurden. Dabei bildete sich an der Zielzellkontaktstelle eine Struktur mit zentraler Akkumulation der TZR und weiterer Signalmoleküle aus (18). Die Akkumulation des TZR und der weiteren Signalmoleküle wird als *central supramolecular activation cluster* (cSMAC) bezeichnet und ist von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen umgeben, der als *peripheral SMAC* (pSMAC) bezeichnet wird. Eine ähnliche Struktur wurde auch an der Berührungsfläche zwischen ZTL und Zielzellen beobachtet, wobei es zusätzlich an der cSMAC-Region zur Akkumulation der lytischen Granula kommt und diese Region als sekretorische Domäne bezeichnet wird (19) (Abbildung 1.3, rechts oben).

Für ZTL wurde außerdem gezeigt, dass es je nach Stärke der Antigenstimulation zur Ausbildung zweier unterschiedlicher Arten von immunologischen Synapsen (lytische und stimulatorische Synapse) zwischen Zielzelle und ZTL kommt (20). Faroudi und Mitarbeiter zeigten, dass es schon bei niedrigen Antigenkonzentrationen zur Ausbildung der lytischen Synapse kommt (Abbildung 1.3, rechts unten), wohingegen die Ausbildung der stimulatorischen Synapse hohe Antigenkonzentration benötigt. Die Ausbildung der lytischen Synapse führte zur lytischen Effektorfunktion der ZTL, wohingegen die Ausbildung der stimulatorischen Synapse zur vollständigen Effektorfunktion, d.h. lytischer Effektorfunktion und Zytokin-Sekretion, führte.

Die Polarisierung der lytischen Granula zur Zielzellkontaktstelle erfolgt schon wenige Minuten nach Zielzellerkennung (21, 22). Die Mobilisierung der lytischen Granula zur Zielzellkontaktstelle erfolgt durch den Transport entlang Mikrotubuli zum *microtubule organizing center* (MTOC), der sich an der Berührungsfläche zur Zielzelle ausbildet (23). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass beim Transport der lytischen Granula zur Zielzellkontaktstelle Zentrosomen ebenfalls beteiligt sind (24). Nach Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran kommt es zur Exozytose der Effektormoleküle. Die Polarisierung der lytischen Granula ermöglicht eine fokussierte Ausschüttung der Effektormoleküle. Beim „lytischen Hit“ entleert eine ZTL ihre Speicher nicht vollständig.

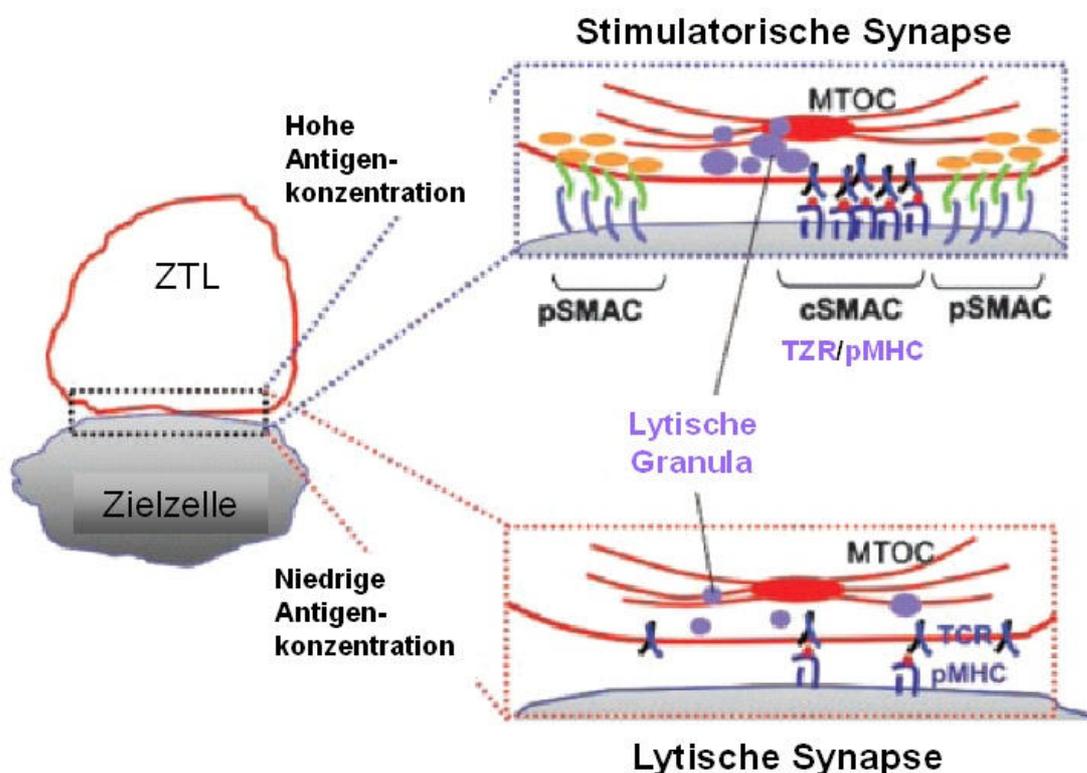


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse. Vereinfachte Darstellung der immunologischen Synapse, die sich nach Kontakt der ZTL mit der Zielzelle, an der Kontaktstelle ausbildet wird. Die stimulatorische immunologische Synapse besteht aus einer zentralen Region aus lytischen Granula und dem cSMAC. Der cSMAC ist der zentrale Kern aus Signal- und Effektormolekülen (u.a. TZR und dem MHC-Peptid-Komplex) und wird umringt von Adhäsionsmolekülen, die an der pSMAC Region lokalisiert sind (rechts oben). Für eine Zytokin-Sekretion der ZTL ist die Ausbildung der stimulatorischen Synapse erforderlich, die bei hohen Antigenkonzentrationen gebildet wird. Niedrige Antigenkonzentrationen dagegen sind für die Ausbildung der minimalen lytischen Synapse ausreichend, die durch Rekrutierung der lytischen Granula gebildet wird (rechts unten). Dieser fehlen die Merkmale, die für eine stimulatorische immunologische Synapse charakteristisch sind. Abkürzungen: ZTL: zytotoxische T-Zelle, TZR: T-Zell-Rezeptor, MTOC: *microtubule organizing center*, cSMAC: *central supramolecular activation cluster* pSMAC: *peripheral supramolecular activation cluster*, MHC: *major histocompatibility complex*, pMHC: MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex. Modifiziert nach (3).

Zudem werden durch Neusynthese der Effektormoleküle die Speicher wieder befüllt. Dadurch kann eine ZTL seriell mehrere Zielzellen nacheinander abtöten (25) (26). Kürzlich zeigten Wiedemann und Mitarbeiter, dass ZTL auch mehrere Zielzellen gleichzeitig durch räumlich-zeitliche Abkopplung lyischer und der stimulatorischer Synapsen abtöten können (22).

1.2.2 Perforin

Patienten mit der Erkrankung *familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose* (FHL)-2, die eine Mutation im Gen für Perforin tragen, zeigen erheblich hohe Anfälligkeiten für virale Infektionen (27). Dies weist auf eine Schlüsselrolle für Perforin bei der Bekämpfung viraler Infekte hin. Perforin-defiziente *knockout*-Mäuse zeigen ähnliche Anfälligkeiten, so dass sich die Bedeutung des Perforins für die immunologische Resistenz gegen virale und bakterielle Infektionen bestätigt (28, 29).

Perforin ist ein circa 67 kDa großes Protein und bildet nach Polymerisierung in der Zielzellmembran Poren von circa 5-20 nm Durchmesser (30, 31). Die Expression von Perforin ist in ruhenden T-Zellen sehr gering, wird aber bei Stimulation des TZR und durch Zytokine wie IL-2, IL-15 und IL-21 induziert (32). Die dreidimensionale Struktur des Proteins ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Perforin am carboxyterminalen Ende eine so genannte C2-Bindedomäne besitzt, die calciumabhängig für die Bindung an Phospholipide von entscheidender Bedeutung ist (31). In den lytischen Granula führt ein niedriger pH-Wert von unter pH 5,5 zur Protonierung der Aspartat-Reste in der C2-Domäne, wodurch eine Bindung von Calcium und damit eine Aktivierung des Perforins verhindert wird. Erst bei Ausschüttung des Perforins werden ab einem pH-Wert von pH 6,2 in der immunologischen Synapse die Aspartat-Reste deprotoniert, so dass Calcium binden kann und Perforin aktiviert wird, wodurch es den Eintritt der Granzyme in die Zielzelle ermöglicht (33).

Um sich selbst vor der Aktivität des Perforins zu schützen, gelangt das Granulamembranprotein Cathepsin B bei Exozytose der lytischen Granula auf die Außenseite der Effektorzellmembran (34). Cathepsin B inaktiviert durch Proteolyse jegliches Perforin, welches gegen die eigene Effektorzelle gerichtet ist. Neben Cathepsin B muss es noch weitere schützende Mechanismen geben, da Cathepsin B defiziente Effektorzellen ebenfalls überleben (35).

1.2.3 Granzym A und Granzym B

Für die Induktion der Zielzellapoptose sind die Serinproteasen Granzym A und Granzym B die wichtigsten Granzyme. Granzym B aktiviert eine proteolytische Kaskade, die mit der Aktivierung der Caspase-3 beginnt und über sieben weitere Caspasen verläuft. Schließlich wird die Caspase-aktivierbare DNase (CAD), die im Zytosol an ein inhibierendes Molekül (ICAD) gebunden ist, freigesetzt und aktiviert (Abbildung 1.4). CAD dringt in den Zellkern der Zielzelle ein und spaltet dort die chromosomale DNA in die für eine Apoptose charakteristischen Fragmente von 200 bp (36). Über einen Caspase-unabhängigen Weg kann Granzym B das Protein *BH3-interacting domain death agonist* (BID) spalten. Das gespaltene BID aktiviert die Proteine *BCL-2-associated X protein* (BAX) und *BCL-2-antagonist of cell death* (BAD), die Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden. Dadurch wird die Integrität der Mitochondrienmembran zerstört und die Freisetzung von Cytochrom C induziert. Das freigesetzte Cytochrom C kann in Anwesenheit aktiver Caspasen mit dem *apoptotic protease-activating factor* (APAF)-1 und der Procaspase-9 ein so genanntes Apoptosom bilden, das wiederum die Caspase-3 aktiviert, wodurch der mitochondrielle Weg mit dem Caspase-abhängigen Weg verknüpft ist (37).

Granzym A hingegen induziert Apoptose über einen Caspase-unabhängigen Weg. Zum einen spaltet es das Histon H1, wodurch die DNA für DNasen zugänglich gemacht wird. Zum anderen zerstört Granzym A die Lamina, die Bestandteile der Kernmembran sind. Granzym A kann auch DNA-Schäden durch Einzelstrangbrüche verursachen. Des Weiteren kann Granzym A den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials induzieren, wodurch es zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien durch Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies kommt (1).

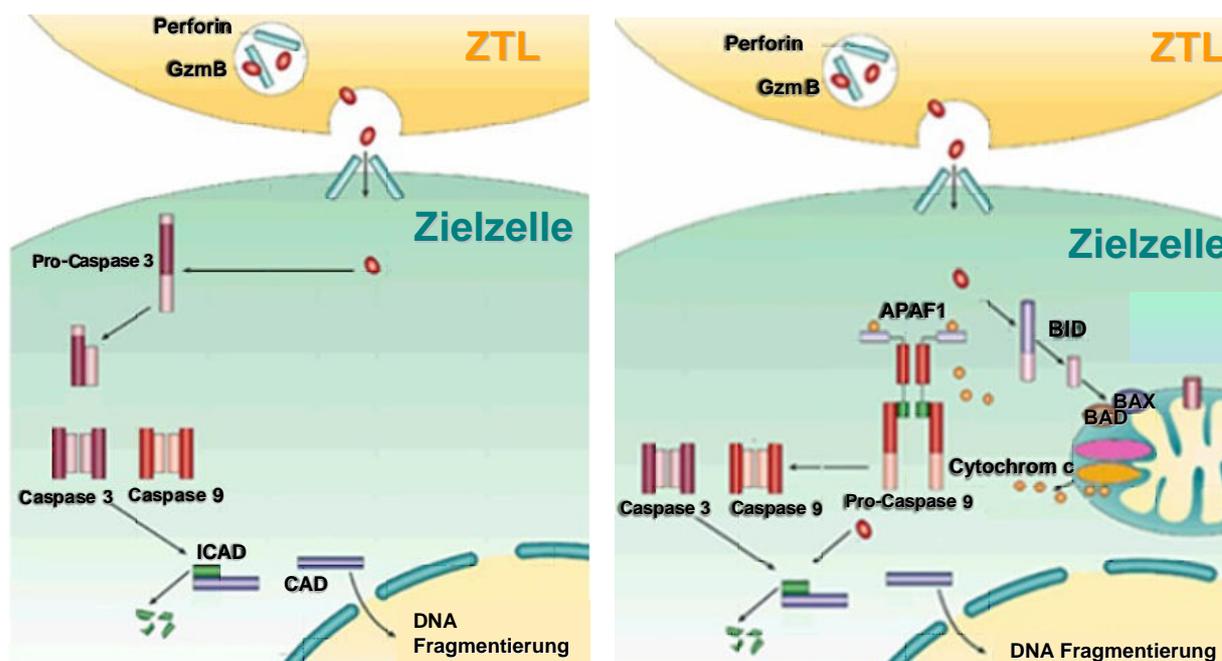


Abb. 1.4: Apoptosewege von Granzym B. Granzym B aktiviert die Caspase-3 und löst damit eine proteolytische Kaskade aus, die letztlich CAD aktiviert. CAD wird daraufhin aus dem inaktiven Komplex mit ICAD losgelöst, dringt in den Zellkern der Zielzelle ein und führt zur Fragmentierung der DNA (links). Über einen Caspase-unabhängigen Weg spaltet Granzym B das Protein BID. Das gesplattene BID aktiviert BAX und BAD um Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden. Daraufhin kommt es zur Zerstörung der Integrität der Mitochondrienmembran. Unter anderem gelangt das Cytochrom c ins Zytosol und aktiviert Caspasen, die zusammen mit dem APAF-1 und Pro-Caspase-9 ein Apoptosom bilden, das wiederum Caspase-3 aktiviert (rechts). Abkürzungen: ZTL: zytotoxische T-Zelle, GzmB: Granzym B, CAD: caspase-aktivierbare DNase, ICAD: inactive CAD, BID: BH3-interacting domain death agonist, BAX: BCL-2-associated X protein, BAD: BCL-2-antagonist of cell death, APAF: apoptotic protease-activating factor. Modifiziert nach (1).

1.2.4 RANTES

RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), nach der neuen Nomenklatur auch CCL5 genannt, ist ein Chemokin. Als Chemokine bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine. Chemokine werden von vielen verschiedenen Zelltypen, darunter auch Monozyten und T-Zellen, sezerniert. Chemokine können Leukozyten anlocken und aktivieren (38, 39). Die Signaltransduktion von RANTES wird dabei durch die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 übermittelt. RANTES wird während der Differenzierung naiver CD8⁺-T-Zellen zu reifen Effektorzellen zusammen mit Perforin, Granzym A und Granzym B induziert (40). Für RANTES konnte gezeigt werden, dass es in ZTL

ebenfalls wie die zytotoxischen Effektormoleküle in intrazellulären Kompartimenten gespeichert vorliegt und spezifisch nach TZR-Stimulierung sezerniert wird (41, 42). Neuere Arbeiten zeigen unter anderem, dass RANTES durch Verstärkung der T-Zellproliferation und der Zytotoxizität zu einer generellen Aktivierung der ZTL beitragen kann (43, 44).

1.3 Funktion von Makrophagen

Makrophagen stellen die aktive Form der Monozyten dar, die in der Blutbahn zirkulieren. Unter dem Einfluss verschiedener Zytokine u. a. *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) durchlaufen sie unterschiedliche Reifungs- und Differenzierungsstadien. Sobald sie ins Gewebe einwandern, differenzieren sie zu Makrophagen und vergrößern sich auf das Fünf- bis Zehnfache der ursprünglichen Zellgröße. Dabei nimmt ihre phagozytische Kapazität zu, sowie der Gehalt an verdauenden Enzymen in den Lysosomen. Makrophagen üben in der Immunabwehr sehr vielseitige Funktionen aus. Durch die Eigenschaft der Phagozytose, die eine essentielle Komponente der angeborenen Immunantwort darstellt, können sie Eindringlinge, verletztes und totes Gewebe sowie apoptotische Zellen beseitigen (45, 46). Viele ihrer Funktionen erfüllen Makrophagen durch die Ausschüttung von biologisch aktiven Substanzen wie Proteinen, Lipiden und reaktiven Sauerstoffspezies, wobei deren Produktion getrennt, nacheinander oder gleichzeitig erfolgen kann (47).

In der spezifischen Immunabwehr aktivieren Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen T-Zellen und B-Zellen. Nach Phagozytose und Verdau von Fremdkörpern werden Teile dieser Antigene über MHC-Moleküle auf der Makrophagen-Zelloberfläche präsentiert. Die T-Lymphozyten, die diese Struktur mit ihrem TZR spezifisch erkennen, werden gebunden und zur Vermehrung angeregt. Dabei produzieren sie Zytokine, die wiederum antigenstimulierte B-Lymphozyten zur Differenzierung in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle aktivieren. Die gebildeten Antikörper binden spezifisch an entsprechende Strukturen von Mikroorganismen, wodurch diese neutralisiert werden oder durch das Komplementsystem vernichtet werden. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe können ebenfalls durch Makrophagen phagozytiert werden.

1.4 Das humane Nierenzellkarzinom

In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Nierenkrebs bei Frauen auf etwa 6 400 und bei Männern auf etwa 10 300 geschätzt. Bei bösartigen Neubildungen der Niere im Erwachsenenalter handelt es sich zu 85 % um Nierenzellkarzinome (48). Das Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) ist ein epithelialer Tumor der vom Tubulusepithel der Niere ausgeht. Es stellt die häufigste neoplastische Erkrankung der Niere dar und macht in Deutschland einen Anteil von 1 – 2 % aller bösartigen Tumoren aus. Männer erkranken dreimal häufiger als Frauen. Die Erkrankung wird meist im sechsten Lebensjahrzehnt diagnostiziert. Nach der im deutschsprachigem Raum verbreiteten Mainz-Klassifikation nach Thoenes werden die Nierenzellkarzinome nach zytomorphologischen Kriterien und Tumorstadium in klarzellige, chromophile, chromophobe und polymorphe und Duct-Bellini-Typen unterschieden. Das klarzellige Nierenzellkarzinom macht einen Anteil von 70 - 80 % aller Nierenzellkarzinome aus (49). Die Klassifikation und die Stadieneinteilung sowie der histologisch beurteilte Grad der Tumordifferenzierung für das Nierenzellkarzinom sind in Tabelle 1.1 nach den Richtlinien des *Union International Contre le Cancer* (UICC) zusammengefasst.

Die Prognose hängt entscheidend vom Ausmaß der Erkrankung bei Therapiebeginn ab. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei lokal begrenztem Tumor 70 - 80 %, bei lokal vorgeschrittenem Tumor 20 - 60 % und bei Fernmetastasen unter 10 %. Bei Prognosestellung sind bereits 13 % der Karzinome metastasiert. In diesem fortgeschrittenen Stadium beträgt die Ein-Jahres-Überlebensrate ohne weitere Behandlung nur etwa 15 %. Hierbei spielt die Zahl der befallenen Organe eine entscheidende Rolle. Metastasen treten in absteigenden Häufigkeiten primär in Lunge, Lymphknoten, Skelett, Leber und Nebennieren auf, wobei Skelett und Lebermetastasen die ungünstigste Prognose anzeigen (50).

Die Therapie der Wahl bei Vorliegen eines nicht metastasierten Nierenzellkarzinoms ist die chirurgische Entfernung des Tumors. Das metastasierte Karzinom ist in der Regel nicht heilbar. Das Nierenzellkarzinom entzieht sich weitgehend einer konservativen Therapie (Bestrahlung, Chemotherapie), wodurch diese häufige und hochmaligne Erkrankung die Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten erfordert. Bei 0,2 - 0,5 % der Nierenzellkarzinome zeigt

sich eine spontane Remission von Primärtumoren oder Metastasen, die auf eine Antwort des Immunsystems gegen den Tumor zurückgeführt werden (51). Daher erhofft man sich Erfolge durch eine Immuntherapie. Diese Hoffnung liegt in der Beobachtung begründet, dass Nierenzellkarzinome meist eine große Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) beinhalten, die nach Isolierung Aktivität gegen Tumorzellen zeigen (52).

Immunologisch wirksame Substanzen wie das IL-2 zeigten bereits 1985 klinische Erfolge in der Behandlung metastasierender Tumoren (53). Die in Deutschland mittlerweile standardisierte und am häufigsten angewendete Behandlung bei metastasierendem Nierenzellkarzinom nach der operativen Entfernung des Primärtumors stellt die kombinierte Immun-Chemotherapie mit systemischer Gabe von IFN- α , IL-2 und 5-Fluoruracil dar (54). Hierbei wurden Ansprechraten von 20 – 30 % beschrieben, die etwa bei der Hälfte aller Fälle zu kompletten oder teilweisen Remissionen des Tumors führten (55) (56). Diese Erfolge bekräftigten die Hypothese, dass in einigen Fällen eine effektive Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst werden kann. Derzeit laufen zudem mehrere Erfolg versprechende Studien mit Tyrosinkinase-Inhibitoren. Weitere Studien zur Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten für Tumorerkrankungen beinhalten die Verabreichung weiterer Zytokine, tumorspezifischer Antikörper und den adoptiven Transfer von *in vitro* aktivierten Zellen unter anderem von tumorspezifischen T-Lymphozyten.

Hinsichtlich der Entwicklung wirkungsvoller Immuntherapien ist die Frage noch nicht beantwortet, in wie weit der Tumor selbst das Immunsystem beeinflusst und Mechanismen im Tumormilieu gegeben sind, die eine Immunantwort behindern oder inaktivieren. So ist immer noch nicht vollkommen verstanden, warum Lymphozyten den Tumor zwar zahlreich infiltrieren und damit eine Veränderung des Normalzustandes zu erkennen scheinen, im Tumor aber offensichtlich keine effiziente Zerstörung der entarteten Zellen bewirken.

Tabelle 1.1: Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach den Richtlinien der Union International Contre le Cancer (UIOC), Stand 2002. (Quelle: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Urogenitale Tumoren, Tumorzentrum München).

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

1.5 Tumorinfiltrierende Lymphozyten und deren Beeinflussung durch das Tumormilieu

Damit eine effiziente Immunantwort gegen den Tumor entsteht, sind viele Ereignisse erforderlich, die zum Teil noch unvollkommen verstanden sind. Für eine erfolgreiche Immunantwort ist die Induktion der tumorantigenspezifischen T-Lymphozyten, ihre Migration in den Tumor sowie die Effektorfunktion der T-Lymphozyten am Ort des Tumors Voraussetzung. Defekte in der Migration von Lymphozyten zum Tumor wurden beobachtet, indem antigenspezifische T-Zellen in der Peripherie nachgewiesen wurden, aber nicht im Tumor (57). Nierenzellkarzinome zeigen jedoch in der Regel ein ausgeprägtes Lymphozyteninfiltrat, das neben Lymphozyten, darunter T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen, auch Monozyten und dendritische Zellen beinhaltet (52, 58-61). Unter den infiltrierenden Lymphozyten (TIL) sind die T-Lymphozyten bisher am ausführlichsten charakterisiert worden. Meist wurde von einer überwiegenden Anzahl von CD8⁺-T-Zellen gegenüber CD4⁺-T-Zellen berichtet (58, 62, 63). Isoliert man die T-Lymphozyten aus dem Tumorgewebe und kultiviert sie *in vitro* mit IL-2, zeigen sie lytische Aktivität gegenüber autologen Tumorzellen auf (52). Die Persistenz von tumorspezifischen T-Zellen im peripheren Blut eines Nierenzellkarzinom-Patienten konnte über einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren ebenfalls nachgewiesen werden (64). Unbehandelte infiltrierende Lymphozyten hingegen zeigen nach Isolierung keine lytische Aktivität (65) (66) (52). Auch bleibt *in vivo* eine Abstoßung des Tumors aus. Dies deutet auf eine defiziente Effektorfunktion der infiltrierenden Lymphozyten im Tumor hin.

Die zytotoxische T-Zell-Reaktion braucht die Erkennung von Antigenen, die über MHC-Klasse-I-Komplexe auf Zielzellen präsentiert werden. Daher sind das Fehlen bzw. eine Abregulation der MHC-Klasse-I-Moleküle, eine schwache Antigenpräsentation oder das Fehlen von Komponenten der antigenpräsentierenden Maschinerie Möglichkeiten für das Ausbleiben einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion. Diese Defizite sind bei Tumoren weit verbreitet (67).

Daneben können von Tumorzellen sezernierte Moleküle zu einer Inhibierung der Immunantwort beitragen. Zu diesen zählen Zytokine, wie der transformierende Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor*- β , TGF- β). TGF- β inhibiert die Aktivierung von T-Zellen, verändert die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen (68) und inhibiert die Expression der Effektormoleküle IFN- γ , Granzym B, Granzym A, und Perforin spezifisch während der

Differenzierung naiver T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen (69). In Tumormodellen führten TGF- β -Rezeptor-negative CD8⁺-T-Zellen zur Tumorregression, wohingegen TGF- β sensitive T-Zellen nicht in der Lage waren das Wachstum zu kontrollieren. Weitere Zytokine, wie IL-10, können ebenfalls die zelluläre Immunantwort inhibieren (70). Beschrieben ist die Präsenz von regulatorischen T-Lymphozyten in zahlreichen Tumoren, darunter auch im Nierenzellkarzinom (71). Diese sezernieren Zytokine, wie TGF- β und IL-10, und können somit eine Suppression der antitumoralen Immunantwort bewirken (72).

Das Molekül Perforin spielt eine entscheidende Rolle bei der zytotoxischen Effektorfunktion von ZTL und ist für die Tumorbekämpfung wichtig. Perforin-*knock-out*-Mäuse entwickeln häufiger Tumoren (28, 73). Außerdem zeigen Perforin-*knock-out*-Mäuse größere Tumoren und eine retardierte Tumorregression sowie eine geringere Effizienz in der Abstoßung von Tumormetastasen gegenüber Wildtyp-Mäusen (74, 75). Untersuchungen humaner infiltrierender Lymphozyten zeigen eine Korrelation zwischen einer geringen Anzahl an Perforin⁺-Zellen im Tumor und einem aggressiven Wachstum von Karzinomen (76 - 78).

1.6 Das Tumormilieu

Das Milieu solider Tumoren unterscheidet sich von dem Milieu gesunder Gewebe. Wesentliche Faktoren sind dabei die Vaskularität und der Stoffwechsel der Tumorzellen. Durch die starke Proliferation der Tumorzellen kommt es zu einer schlechteren Blutversorgung innerhalb des Tumors, wodurch ein geringer Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) im soliden Tumor entsteht (79). Aufgrund des auf anaerobe Glykolyse eingestellten Stoffwechsels der Tumorzellen akkumulieren Stoffwechselprodukte, wie Laktat und Protonen, die den pH-Wert erniedrigen und zu Azidose führen. Zusätzlich trägt der hohe Partialdruck des Kohlendioxids zur Azidose bei (80).

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Mit immunologischen Strategien, wie der Immunisierung mit tumorassoziierten Antigenen oder der adoptiven Immuntherapie, erhofft man sich durch Induktion bzw. Verabreichung von antigenspezifischen Zellen eine erfolgreiche Bekämpfung von Tumoren. Zwar gelingt die Herstellung tumorantigenreaktiver Zellen zunehmend besser, aber klinische Erfolge gemessen an dem Tumorrückgang sind bisher noch selten. Aus Nierenzellkarzinomen isolierte T-Zellen zeigen oftmals lytische Aktivität gegenüber autologen Tumorzellen, wenn man sie aus dem Tumor isoliert und mit IL-2 kultiviert. T-Zell-Rezeptoranalysen, der *in vitro* funktionsfähigen und gegen die autologen Tumorzellen reaktiven tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten zeigten des Weiteren, dass dieselben T-Zell-Rezeptoren im Tumorgewebe vorzufinden sind (64, 81). Den Beobachtungen, dass aus dem Tumor isolierte tumorinfiltrierende T-Lymphozyten ohne *in vitro* Kultur nicht reaktiv sind (52, 60) und im Patienten auch meist keine Tumorabstoßung stattfindet, kann man entnehmen, dass die Lymphozyten im Tumor nicht oder wenig reaktiv sind.

In folgender Arbeit wurden Nierenzellkarzinom-infiltrierende CD8⁺-Lymphozyten direkt im Tumorgewebe, wo sie noch dem Tumormilieu ausgesetzt sind, untersucht, um die funktionellen Defizite zu identifizieren. Dazu wurde der Differenzierungsstatus und die Präsenz des Effektormoleküls Perforin in den Lymphozyten mittels immunhistologischer Mehrfachfärbungen nachgewiesen. Des Weiteren wurde bestimmt, ob und in welchem Ausmaß im Tumor aktive Interaktionen zwischen CD8⁺-Lymphozyten und Tumorzellen vorliegen. Dazu wurde eine Methodik mit immunhistologischen Mehrfachfärbungen in Kombination mit einer Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie etabliert, die es erlaubt Zielzellerkennung und zytotoxische Reaktion der CD8⁺-Lymphozyten bildgebend darzustellen und zu quantifizieren.

Um mechanistisch mögliche Ursachen, die zu den *in situ* erkannten Defiziten geführt haben könnten, aufzuklären, wurde ein *in vitro* Modellsystem entwickelt. Hierbei wurde der Einfluss von Tumormilieu-assoziierten Faktoren, wie Zelldichte, Azidose und TGF- β auf die Effektormoleküle und die Effektorfunktion von zytotoxischen T-Lymphozyten untersucht. Mit der Kenntnis der Mechanismen, die zu einer Inaktivierung der T-Zell-Effektorfunktion führen, können Maßnahmen entwickelt werden, die die Effizienz immuntherapeutischer Strategien verbessern.

2 Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
40 µm Rundfilter	Becton Dickinson, Heidelberg
5 ml Spritzen (für Multistepper)	Eppendorf, Hamburg
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: ¹³⁷ Caesium)	GammaCell 40, Ottawa, Kanada
Bodenplatten für ELISA (96-Loch)	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Chamber slides	Becton Dickinson, Heidelberg
Deckgläschen	IDL, Nidderau
Einmalpipetten 2,5,10 und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
ELISA-Lesegerät SLT SPECTRA	SLT Instruments, Altdorf, Österreich
Fluoreszenzzytometer, FACS TM -Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzzytometer, LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kryostat	Leica Jung CM 3000
Laserscanning System TCS SP2	Leica Microsystems, Heidelberg
Leica DM IRBE Mikroskop	Leica Microsystems, Heidelberg
Lichtmikroskope (Leica DMLS, Zeiss Axioskop)	Leica Microsystems, Heidelberg; Zeiss, Jena
MACS-Zelltrennsystem (Säulen, beads)	Miltenyi, Biotec, Bergisch Glattbach
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
MoFlo TM High Performance cell sorter	Dako, Glostrup, Dänemark
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten, Glas	Peske OHG, München
pH-Meter 766 Calimetric	Knick, Berlin
Pipettenspitzen	Eppendorf / Gilson
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenplatten (96-Loch)	PAA Laboratories, Cölbe
Sterilbank	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
Stickstofftank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer Griesheim, Krefeld
Szintilationsmessgerät <i>TOPCount</i>	Canberra Packard, Dreieich
Zellkulturflächen (175 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflächen (25 cm ² und 75 cm ²)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Hanau

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller
ELISA-Kit IFN- γ	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Kit IL-2	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Kit TGF- β 1	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5 ml mit Deckel)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (klein)	Greiner bio-one, Frickenhausen
LumaPlate TM -96 (Filterplatten für CML)	Canberra Packard, Dreieich
Mehrkanalpipette	Dunn Labortechnik, Asbach
Mehrlochplatten (48- Loch)	Becton Dickinson, Heidelberg
Mehrlochplatten (6-, 12- und 24- Loch)	Becton Dickinson, Heidelberg
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner bio-one, Frickhausen
Substratreagenzien A und B (Substrat für ELISA)	Becton Dickinson, Heidelberg
TECAN Genios Plus (Photometer)	SLT, Creilsheim
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze

2.2 Chemikalien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1 N Salzsäure	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
⁵¹ Cr-Natrimchromat (5 mCi)	Hartmann
7-Amino-Actinomycin D (7AAD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen Ag, Melsungen
BSA-Fitc	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAKO® Target Retrieval Solution (10x)	DAKO, Hamburg
ELISA Substratlösung	Becton Dickinson, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fixogum	Science Services
Humanserum (für die Durchflusszytometrie)	Cambrex Corporation
Immersionsöl	Leica Microsystems, Wetzlar
Methanol	Merck, Darmstadt
Met-RANTES	Proudfoot, A., Serone, Genf
Natronhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Orthophosphorsäure	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Pulver zum Lösen	Biochrom AG, Berlin
PKH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau	ICN Biomedicals GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vectashield	VECTOR Laboratories
Vybrant DiD	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Zellkultur

2.3.1 Medien und Puffer (steril)

RMPI-Basismedium

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

T-Zell-Medium

RPMI-Basismedium
7,5 % FCS
7,5 % Humanserum
50 U / ml IL-2 (bei einigen Versuchen anstelle von IL-2 10 ng / ml IL-15)

RCC-Medium

RPMI-Basismedium
12 % FCS

LCL-Medium

RPMI-Basismedium
10 % FCS

Selektionsmedium für K-562-A2

LCL-Medium
1 mg / ml Gentamycin (G418)

CML-Medium

RPMI-Basismedium
15 % FCS
1x Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium

20 % DMSO in RPMI-Basismedium

Trypin-EDTA-Lösung

2x Stocklösung Trypsin-EDTA

MACS-Puffer

0,1 % Humanserum
0,5 mM EDTA (in PBS)

2.3.2 Medienzusätze und sonstige Lösungen

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Rekombinantes Interleukin-2 (Proleukin)	Cetus, Emeryville, USA
Rekombinantes Interleukin-15 (PromoKin)	PromoCell GmbH, Heidelberg
Rekombinantes GM-CSF, Leukine®	Schering, Berlin
Rekombinantes Interleukin-4	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden
Tyrosinase-Peptid (YMNGTMSQV)	IMI, GSF
Humanserum (verschiedener gesunder Spender)	IMI, GSF
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll®	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin 2500 IE	Essex Pharma GmbH, München
Gentamycin (G418)	Roche, Ponsberg
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
AIMV	Invitrogen, Karlsruhe
OPTI-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Accutase®	PAA Laboratories, Cölbe
Calcein AM	Invitrogen, Karlsruhe

Einige Medienzusätze sollen hier noch mal näher beschrieben werden:

L-Glutamin

Glutamin ist in vielen Fällen die wachstumslimitierende Aminosäure für in Kultur befindliche Zellen. Es dient als wichtige Kohlenstoffquelle sowie als Ausgangsstoff für viele katabolische Reaktionen. Des Weiteren kann Glutamin als Energiequelle in den Zitratzyklus eingeschleusst werden. Da Glutamin instabil ist und durch im Medium befindliche Glutaminasen sowie nicht-enzymatisch abgebaut wird, ist eine Zugabe zum Kulturmedium kurz vor Gebrauch notwendig. Die sterile Stammlösung (200 mM) wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

Natriumpyruvat

Natriumpyruvat dient ebenfalls als Energiequelle und kann dem Zitratzyklus zur Energiegewinnung zugeführt werden. Die sterile Natriumpyruvat-Lösung (200 mM) wurde bei 4°C aufbewahrt.

Fötale Kälberserum (FCS)

Um eine optimale Zellvermehrung zu gewährleisten, ist es notwendig, dem Grundmedium zusätzlich tierische Seren zuzugeben. Diese liefern essentielle Bestandteile wie unter anderem Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, Aminosäuren, anorganische Salze und Spurenelemente. Um die hitzelablen Komplementfaktoren in dem Serum zu zerstören, wurde es vor Gebrauch bei 56°C für 45 min hitzeinaktiviert.

2.4 Lösungen und Puffer

FACS-Puffer

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

FACS-Puffer mit Saponin

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

Paraformaldehyd-Lösungen

- 1 % bzw. 4 % Paraformaldehyd (in PBS)

ELISA-Coating-Puffer

- 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5

ELISA-Waschpuffer

- 0,05 % Tween20 in PBS

ELISA-Blockierungspuffer (IL-2 und IFN- γ)

- 1 % Magermilchpulver (in PBS)

ELISA-Blockierungspuffer (TGF- β)

- 10 % FCS (in sterilem PBS)

20x SSC-Puffer

0,3 M Natriumcitrat 2H₂O (8,82 g)
 3 M Natriumchlorid (17,83 g)
 ad Aqua ad iniectabilia (100 ml)
 → pH-Wert 7,0 (mit 1N Salzsäure)

DAPI-Stocklösung

5 mg DAPI /ml in Aqua ad iniectabilia

DAPI-Gebrauchslösung

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

Stopp-Puffer für Phagozytoseassay

01 % Natriumazid in PBS
 200 mM EDTA in PBS

2.5 Gewebeschnitte

Die in Tabelle 2.1 aufgeführten Nierentumoren wurden von der urologischen Abteilung des Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Bei allen untersuchten Tumoren handelte es sich um klarzellige Nierenzellkarzinome. In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit untersuchten Kontrollgewebe (Paraffingewebe) aufgelistet. Alle Gewebeschnitte (4 bis 5 µm) wurden bereits fertig auf Objektträgern zur Verfügung gestellt. Die Sammlung der Gewebeproben wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

Tabelle 2.1: Übersicht der untersuchten Nierenzellkarzinomgewebe.

Bezeichnung	Jahrgang, Geschlecht ¹	Tumorgröße	Stadium	TNM-Klassifikation ³	Histologisches Grading	Fernmetastasen	Follow-up ² (8/05)
T1-RCC	1926, M	7,5 cm	II	T3aNxM0	G2	-	A-DF
T4-RCC	1920, W	7,8 cm	III	T3bN2M0	G2	-	A
T5-RCC	1921, W		IV	T1N0M1	G3	Lunge	A-SD
T7-RCC	1934, M	7,8 cm	IV	T3bN0M1	G2	Lunge	A-PR
T8-RCC	1919, W	9,5 cm	I	T2NxMx	G2	-	A-DF

¹M: männlich, W: weiblich

²A: lebendig (alive), DF: krankheitsfrei (disease free), SD: Erkrankung stabil (stable disease), PR: Erkrankung progressiv

³Für die Erklärungen der einzelnen Stadieneinteilungen und TNM-Klassifikationen siehe Tabelle 1.1.

Tabelle 2.2: Übersicht der untersuchten Kontrollgewebe.

Bezeichnung	Organ/Material	Bemerkungen	Quelle
Tranplantat	Niere/Bioptat	Abgestoßenes Nierentransplantat	Prof. J. Diebold, Pathologisches Institut, LMU, München
Leber 2935	Leber/Bioptat	Akute virale Leberentzündung	Prof. H.-J. Gröne, Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie, DKFZ, Heidelberg
Leber 2690	Leber/Bioptat	Akute virale Leberentzündung	Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie, DKFZ, Heidelberg

2.6 Blutproben

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

2.7 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen, deren Charakteristika, Kulturmedien, Quelle sowie evt. die Referenz ist in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Zellen.				
Bezeichnung	Charakteristika	Kulturmedium¹	Quelle	Referenz
PBL-Pool	Gemisch von PBL aus vier gesunden Spendern		IMI, GSF	
B-LCL-LAZ388	Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie	LCL-Medium	Mackenson, A.	
Makrophagen	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	AIMV-Medium (GM-CSF)	im Labor generiert	
Dendritische Zellen	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	AIMV-Medium (GM-CSF, IL-4)	im Labor generiert	
RCC26	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2 ⁺	RCC-Medium	IMI, GSF	(82)
KT-195	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2 ⁻	RCC-Medium	DKFZ, Heidelberg	(83)
K-562	Humane Erythroleukämiezelllinie	LCL-Medium	ATCC, Rockville, Maryland, USA	
K-562-A2	Humane Erythroleukämiezelllinie, HLA-A2-Transfektante von K-562	LCL-Medium (Gentamycin)	Britten, C.M., Mainz	
Mel624.38	humane Melanomzelllinie, HLA-A2 ⁺ , Tyrosinase ⁺	RCC-Medium	Panelli, M.	(84)
ZTL Klon JB4	humane klonale ZTL Linie, Allo-HLA-A-reaktiv	T-Zell-Medium	IMI, GSF	(85)
ZTL Klon TyrF8	humane klonale ZTL Linie, HLA-A*0201-restringiert, spezifisch für das Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ -Epitop	T-Zell-Medium	Schrier, P., Leiden	(86)
ZTL Klon TIL26	Isoliert aus RCC-Patient 26	T-Zell-Medium	IMI, GSF	(64)
Mel 93.04 A12.1	humane Melanomzelllinie, HLA-A2 ⁺ , Tyrosinase ⁺ , stabile IL-2-Transfektante	RCC-Medium	Schrier, P., Leiden	
¹ siehe Kapitel 2.3.1				

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.						
Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Einsatz	Verwendung¹	Hersteller/Quelle
Perforin	keine	Maus IgG2b	δG9	5 µg / ml	FACS, IF	BD Pharmingen
Isotyp	ohne	Maus IgG2b	MOPC 141	5 µg / ml	FACS	Sigma-Aldrich
Perforin	FITC	Maus IgG2b	δG9	1:10	FACS	BD Pharmingen
Perforin	keine	Ratte	KM 585 (P1-8)	1:50	IF	Kamiya Biomedical
GMP-17	keine	Maus IgG1	2G9A10F5	1:1000	IF	Immunotech
Granzym B	Keine	Maus IgG1	GB11	1:50	FACS, IF	Serotec
Granzym B	PE	Maus IgG1	GB11	1:20	FACS	Serotec
Granzym A	FITC	Maus IgG1	CB9	1:10	FACS	BD Pharmingen
Isotyp	FITC	Maus IgG1	MOPC-21	1:10	FACS	BD Pharmingen
RANTES	FITC	Maus IgG2b	VL2 ²	1:1	FACS	Nelson, P., LMU
CD8	Cy5	Kaninchen	SP16	1:100	IF	Lab Vision
PD-1	PE	Maus IgG1	MHI4	1:10	FACS	BD Pharmingen
CD107a	FITC	Maus IgG1	H4B4	1:25	FACS	BD Pharmingen
CD107b	FITC	Maus IgG1	H4A3	1:25	FACS	BD Pharmingen
Isotyp	FITC	Maus IgG1	MOPC 21	1:17	FACS	BD Pharmingen
CD14	FITC	Maus IgG2a	M5E2	1:25	FACS	BD Pharmingen
CD209	FITC	Maus IgG2b	DC N46	1:25	FACS	BD Pharmingen
CD11c	PE	Maus IgG1	B-Ly6	1:10	FACS	BD Pharmingen
CD1a	PE	Maus IgG1	HI149	1:10	FACS	BD Pharmingen
CD36	FITC	Maus IgG2b	FA6-152	1:10	FACS	Immunotech
CCR1	PE	Maus IgG2b	53504.111	1:10	FACS	R&D Systems
CCR5	PE	Maus IgG2b	45531	1:10	FACS	R&D Systems
Isotyp	PE	Maus IgG2b	27-35	1:10	FACS	BD Pharmingen
CD3ζ	FITC	Maus IgG2b	G3	1:25	FACS	Serotec
Isotyp	FITC	Maus IgG2b	G155-148	1:25	FACS	BD Pharmingen
Isotyp²	keine	Maus IgG2b	TIB 173	1:1	FACS	ATCC

¹FACS: Durchflusszytometrie, IF: Immunfluoreszenzanalyse

²Kulturüberstand

2.8.2 Sekundärantikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.					
Spezifität	Konjugation	Spezies	Einsatz	Verwendung¹	Hersteller
Maus IgG2b	AlexaFluor 488	Ziege	4 µg/ml	FACS, IF	Invitrogen
Maus IgG1	AlexaFluor 488	Ziege	4 µ/ml	FACS, IF	Invitrogen
Kaninchen ²	Cy5	Ziege	1:100	IF	Dianova
Maus IgG1	AlexaFuor 568	Ziege	4 µg/ml	IF	Invitrogen
Ratte ²	Cy3	Maus	1:200	IF	Dianova

¹FACS: Durchflusszytometrie, IF: Immunfluoreszenzanalyse
² Antikörper adsorbiert, so dass keine Kreuzreaktivität gegenben

3 Methoden

3.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Anmerkungen

Um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden, erfolgte die Durchführung der sterilen Arbeiten in einer Sterilbank.

3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um die Zellen für eine Langzeitlagerung zu konservieren, wurde die Gefrierschutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Das DMSO wirkt dabei als Gefrierschutzsubstanz indem es durch die Zellmembran diffundiert und somit den Wassergehalt in der Zelle erniedrigt. Dadurch wird die Bildung von Eiskristallen innerhalb sowie auch außerhalb der Zelle verhindert, die die Zelle schädigen würden. Da DMSO auf stoffwechselintakte Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte der Kryokonservierung sowie dem Auftauen zügig auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 5 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) sedimentiert und der Kulturüberstand abgesaut. Anschließend wurde das Zellsediment in eisgekühltem fötalem Kälberserum (FCS) mit 10 % DMSO aufgenommen. Je ein Kryoröhrchen wurde mit 1,0 ml dieser Zellsuspension befüllt, in Papiertücher eingepackt, um ein schnelles Einfrieren zu verhindern, und bei -80°C eingefroren. Nach einer bis zwei Wochen erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen auf Trockeneis in flüssigen Stickstoff (-196°C).

Das Auftauen der konservierten Zellen erfolgte rasch durch Erwärmung der Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in 100 % FCS aufgenommen und zum Entfernen des DMSO bei 1500 rpm 5 min abzentrifugiert und der Kulturüberstand abgesaugt. Nach Aufnahme des Zellsediments in Gebrauchsmedium wurden sie in die entsprechenden Zellkulturflächen gegeben. Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einem CO_2 -Gehalt von 6,5 % in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und einer Temperatur von 37°C .

3.1.3 Kultivierung und Trypsinierung von adhärent wachsenden Zelllinien

Die Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte in dem für die Zellen optimalen Kulturmedium. Das Volumen des Kulturmediums in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm² Adhärenzfläche) betrug 10 ml bzw. bei den verwendeten Melanomzelllinien 15 ml. In den großen Zellkulturflaschen (175 cm² Adhärenzfläche) betrug das Volumen des Kulturmediums 20 ml. Da die Nährstoffe im Kulturmedium ab einer gewissen Zelldichte aufgebraucht werden, wurde das Kulturmedium der Zellen alle drei bis vier Tage gewechselt, indem das alte Kulturmedium abgesaugt und neues Kulturmedium hinzu gegeben wurde. War unter dem Mikroskop bereits ein dichter Zellrasen sichtbar d.h. eine Konfluenz von 80 % bis 100 % vorhanden, wurde die Zellzahl reduziert, indem bei den Melanomzelllinien vier Fünftel bzw. bei den Nierenzellkarzinomzelllinien die Hälfte bis zwei Drittel der Zellen verworfen wurde. Für die Entnahme von Zellen bei einer adhärent wachsenden Zellkultur musste zuerst eine Zellsuspension hergestellt werden. Hierzu wurde das alte Kulturmedium in der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 5 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen, um das noch verbleibende FCS-haltige Medium (siehe unten) und tote Zellen, die nicht mehr an den Zellkulturboden angeheftet waren, zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml (75 cm² Zellkulturflaschen) bzw. 2 ml (175 cm² Zellkulturflaschen) Trypsin-EDTA-Lösung ca. 2 min bis 5 min behandelt, damit sie sich von der Kulturgefäßoberfläche ablösen. Dabei werden durch das Trypsin die Bindeproteine zwischen Zelle und Substrat proteolytisch gespalten und durch EDTA die für die Salzbrücken zwischen Zelle und Substrat notwendigen zweiwertigen Kationen, vor allem Kalzium, komplexiert. Sobald unter dem Mikroskop zu erkennen war, dass sich alle Zellen vollständig abgelöst hatten, wurde Zellkulturmedium hinzu gegeben. Die im Kulturmedium enthaltenen Bestandteile des FCS inaktivieren das Trypsin und stoppen somit die Reaktion. Die Inkubation der Zellen mit der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte nicht länger als nötig, da es bei längerer Exposition die Zellen schädigt. Das gewünschte Volumen der Zellsuspension wurde aus der Kulturfläche entnommen und diese Zellen verworfen oder in Experimente eingesetzt. Den restlichen Zellen in der Kulturflasche wurde neues Kulturmedium zugegeben und die Kultivierung fortgesetzt. Das Ablösen der Zellen von der Kulturgefäßoberfläche stand somit am Beginn jedes Zellkulturexperiments mit adhärent wachsenden Zelllinien.

3.1.4 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Kultivierung von Suspensionszellen erfolgte in dem für die Zellen optimalen Zellkulturmedium in kleinen oder mittleren aufrecht gestellten Zellkulturflächen (5 bis 10 ml bzw. 20 bis 40 ml Zellkulturvolumen). Die transfizierte Zelllinie K-562-A2 besitzt eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker und wurde in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde je ein Viertel bis ein Zehntel der Zellsuspension entnommen und durch neues Medium ersetzt. Die entnommenen Zellen wurden verworfen oder in Experimente eingesetzt.

3.1.5 Kultivierung und Restimulation von T-Zellklonen

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

Damit die T-Zellklone überleben und zur Proliferation angeregt werden, müssen sie regelmäßig einen Stimulus durch eine Restimulation erhalten. Diese wurde durch Kultivierung der T-Zellklone mit den jeweiligen Antigen⁺-Zielzellen erreicht. Zusätzlich benötigen die T-Zellklone so genannte Antigen⁻-*feeder*-Zellen sowie ein Gemisch PMBC verschiedener Spender, die ein für die T-Zellen förderliches Zytokinmilieu schaffen. Als *feeder*-Zellen wurde die B-LCL-LAZ388 Zelllinie verwendet. Zielzellen, *feeder*-Zellen und PMBC wurden in einer Bestrahlungsanlage mit dem Caesium-Isotop ¹³⁷Cs (β- und γ-Strahler) bestrahlt, um die Proliferation dieser Zellen zu verhindern. Die jeweiligen Bestrahlungsdosen, die aufgrund der Halbwertszeit des ¹³⁷Cs (30 Jahre) in unterschiedlichen Bestrahlungsdauern resultierten, sowie die Zellzahlen pro Restimulationsansatz sind in Tabelle 2.1 angegeben. Der Restimulationsansatz wurde zusammen mit jeweils 6 x 10⁵ Zellen der T-Zellklone in einer Vertiefung in 1,5 ml T-Zell-Medium mit 50 U IL-2/ml ausgesät. Die T-Zellen zeigten ab dem ersten Restimulationstag eine länglichere Morphologie und ein leuchtend klares Zytoplasma. Ab

dem dritten bis vierten Tag verschwanden die Restimulationszellen zunehmend. Die Restimulation der T-Zellklone wurde alle 12 bis 14 Tage wiederholt durchgeführt. Die T-Zellklone wurden zwischen Tag 7 und Tag 9 nach der Restimulation in die Experimente eingesetzt.

Tabelle 3.1: Restimulationsansatz für 6×10^5 Zellen der T-Zellklone JB4¹, TyrF8² bzw. TIL26¹ pro Vertiefung einer 24-Lochplatte		
Restimulationszellen	Zellzahl	Bestrahlungsdosis (Gy)
¹ RCC26 / ² MeI 93.04 A12.1	6×10^4	100
PMBC	1×10^6 bis $1,4 \times 10^6$	50
B-LCL-LAZ388	1×10^5	150

3.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Färbung der Zellen mit Trypanblau (Trypanblau-Exklusionsmethode). Der Farbstoff Trypanblau kann intakte Plasmamembranen nicht durchdringen, wodurch lebende Zellen nicht angefärbt werden. Hingegen nehmen tote Zellen den Farbstoff auf und sind unter dem Mikroskop dunkelblau erkennbar. Die Zellsuspension wurden abzentrifugiert und das Zellsediment in 2 bis 10 ml Medium, abhängig von der Zellsedimentgröße, resuspendiert. Nach Abnahme eines Aliquots der gut gemischten Zellsuspension, wurde dieses mit einer isotonischen Trypanblaulösung entsprechend verdünnt. Bei Verwendung von PBMC wurde Trypanblau mit 1 % Essigsäure verwendet, um die eventuell noch vorhandenen Erythrozyten zum Platzen zu bringen, um diese nicht mitzuzählen. Für einige Versuche wurden nur die Lymphozyten gezählt, die sich anhand der Morphologie von größeren Zellen, wie Tumorzellen und Monozyten, unterscheiden lassen. Die Anzahl der ungefärbten Zellen wurde in mindestens zwei Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer gezählt und gemittelt. Unterschieden sich die Werte stark voneinander wurden weitere Großquadrate ausgezählt und gemittelt. Da die Fläche eines Großquadrats 1 mm^2 beträgt und der Spalt zwischen Deckglas und Zählkammer eine Höhe von 0,1 mm hat, umfasst ein Großquadrat ein Zellsuspensionsvolumen von 1 μl . Die Zellzahl /ml wurde über folgende Formel berechnet:

Zellzahl/ml =	Mittelwert der ausgezählten Großquadrate x 10^4 x Verdünnungsfaktor mit Trypanblau-Lösung
---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------

3.2 Koinkubation von T-Zellklonen und Tumorzellen

Die Koinkubation des T-Zellklons JB4 mit verschiedenen Tumorzelllinien erfolgte durch Zugabe von $0,5 \times 10^6$ DiD-markierten Zellen des T-Zellklons JB4 (siehe Kapitel 3.11.4) zu $0,5 \times 10^6$ Tumorzellen (in dieser Arbeit als „1x“ bezeichnet) bzw. zu 5×10^6 Tumorzellen (in dieser Arbeit als „10x“ bezeichnet) in einem Endvolumen von 1 ml in T-Zell-Medium in sterilen 5 ml Röhrchen. Hierbei wurde dem T-Zellmedium anstelle des IL-2 mit IL-15 (10 ng/ml) zugesetzt. IL-15 wurde dem IL-2 vorgezogen, da es in Nieren- und Nierenzellkarzinomen natürlicherweise vorkommt (87). Die Kulturansätze wurden über verschiedene Zeitspannen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Gehalt an Effektormolekülen in den T-Zellen mittels Durchflusszytometrie-Analyse bestimmt (siehe 3.11). Hierbei wurden die Zellen eines Kokulturansatzes nach Inkubationsende auf kleine FACS-Röhrchen aufgeteilt und alle Inkubationsschritte auf einem Schüttler bei 4°C durchgeführt.

Bei einigen Versuchen wurden die Zellkulturüberstände der Kokulturansätze für eine Zytokin-Analyse mittels ELISA aufgehoben. Hierzu wurden die Ansätze nach Inkubationsende jeweils gut gemischt, bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und die Kulturüberstände in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei mindestens -20°C eingefroren.

3.3 Stimulationsversuch zum Nachweis der Zytokin-Sekretion

Um die Zytokin-Sekretion des T-Zellklons JB4 zu analysieren wurden 5×10^3 T-Zellen mit $1,5 \times 10^4$ Stimulationszellen in 200 µl T-Zell-Medium gegeben und für 20 h bis 24 h in 96-Loch-Rundbodenplatten inkubiert. Um die Spezifität der Zytokin-Freisetzung beurteilen zu können, wurden die Stimulationszellen und die Effektorzellen jeweils auch alleine in 200 µl inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände nach einer Zentrifugation über 5 min bei 1500 rpm in eine neue 96-Lochplatte überführt und bei -20°C eingefroren. Der Nachweis der Zytokine in den Überständen erfolgte nach Kapitel 3.10.

3.4 Nachweis der CD107-Oberflächenmobilisierung

Die Degranulationsaktivität des T-Zellklons JB4 erfolgte durch den Nachweis der CD107-Oberflächenmobilisierung mittels Durchflusszytometrie (88). Hierzu wurden die T-Zellen bei Anwesenheit von Antikörpern gegen die Proteine CD107a und CD107b mit Zielzellen stimuliert. CD107a und CD107b sind Membranproteine der Lysosomen und daher auch Bestandteil lytischer Granula von zytotoxischen T-Zellen. Kommt es bei Zielzellerkennung zur Granulaausschüttung gelangen die CD107-Moleküle an die Oberfläche der T-Zelle. Durch Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD107a und CD107b während der Koinkubation mit Zielzellen werden alle auf die Oberfläche gelangten Moleküle markiert (Abbildung 3.1). Die resultierende Fluoreszenzintensität der T-Zellen ist somit proportional zum Ausmaß der Degranulation.

5×10^4 Zellen des T-Zellklons JB4 wurden nach der DiD-Markierung in 50 μ l T-Zellmedium auf kleine FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend wurden je 4 μ l der FITC-markierten CD107a- bzw. CD107b-spezifischen Antikörper zugegeben. In einem Parallelansatz wurde 6 μ l eines FITC-markierten Isotypkontrollantikörper zugegeben. Die Stimulation der T-Zellen wurde durch Zugabe von 5×10^4 Zellen der Zielzelle RCC26 in 50 μ l T-Zell-Medium gestartet. Für einige Experimente wurden 5×10^6 Zielzellen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über 4 h bei 37°C. Da in dieser kurzen Zeit keine Kontamination zu erwarten war, wurden die Röhrchen offen in den Brutschrank gestellt. Um die Spezifität der Degranulation beurteilen zu können, wurden alle Ansätze inklusive der Ansätze mit dem Isotypkontrollantikörper auch für 0 h inkubiert. Hierbei wurden die Zielzellen erst nach Zugabe von 500 μ l eiskaltem FACS-Puffer zu dem T-Zell-Antikörper-Gemisch zugegeben sowie alle Schritte auf Eis durchgeführt. Das im FACS-Puffer enthaltene Azid inhibiert alle schwermetallhaltigen Enzyme. Dadurch werden Enzyme der Atmungskette inhibiert

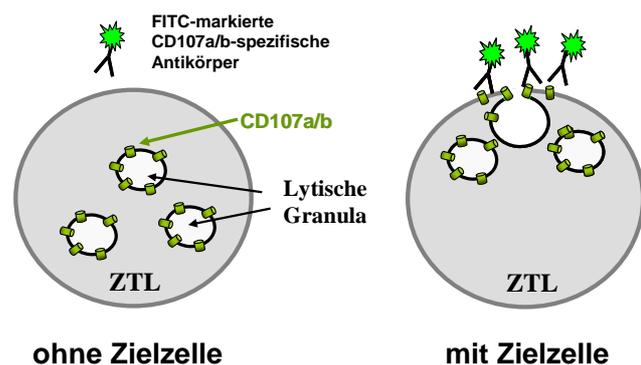


Abb. 3.1: Prinzip des Nachweises CD107-Oberflächenmobilisierung.

Erläuterung der schematischen Darstellung: siehe Text
Abkürzungen: ZTL = zytotoxische T-Zelle, FITC: Fluorescein-5-isothiocyanat.

und der Stoffwechsel der Zellen unterbunden. Zusätzlich wurden auch Ansätze entweder mit den T-Zellen alleine ohne aber mit Nicht-Zielzellen mitgeführt. Nach Ende der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl eiskaltem FACS-Puffer abgestoppt, die Zellen abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und der Puffer abgesaugt. Die Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von Propidiumjodid unmittelbar am Durchflusszytometer aufgenommen.

3.5 Nachweis der lytischen Aktivität von T-Zellen

Die lytische Effektorfunktion des ZTL Klons JB4 wurde mittels der zwei folgenden Versuche untersucht.

3.5.1 Nachweis der Chromfreisetzung nach Zelllyse der Zielzellen (Chromfreisetzungstest)

Das Prinzip des Chromfreisetzungstests besteht in der zellvermittelten Lyse von radioaktivmarkierten Zielzellen durch die Effektorzellen (*cell mediated lysis*, CML). Die Zielzellen nehmen durch Inkubation mit einer Natriumchromat-Lösung das enthaltene Chrom-Isotop ^{51}Cr (γ -Strahler) auf. Das bei Zelllyse freigesetzte ^{51}Cr kann im Überstand nachgewiesen werden. Die Zielzellen wurden einen Tag vor dem Versuch 1/2 bis 1/4 verdünnt, um eine möglichst hohe Lebendzellzahl zu gewährleisten. Zur Markierung der Zielzellen wurden mindestens 1×10^6 Zellen geerntet, bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert und das Zellsediment in 100 µl 100 % FCS aufgenommen. Anschließend wurde die Natriumchromat-Lösung zu den Zielzellen gegeben, wobei das Volumen abhängig vom Alter der Natriumchromat-Lösung war. ^{51}Cr hat eine sehr geringe Halbwertszeit von 27,8 Tagen, so dass mit ansteigendem Alter der Natriumchromat-Lösung mehr von der Lösung eingesetzt wurde, um die im Experiment eingesetzte Aktivität des ^{51}Cr (130 µCi) annähernd konstant zu halten. In der Regel wurden bei frischem Natriumchromat 30 µl und bei zwei Wochen altem Natriumchromat 50 µl eingesetzt und die Zielzellen 1 bis 1,5 h bei 37°C inkubiert. Um das überschüssige, nicht aufgenommene ^{51}Cr zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit jeweils 5 ml CML-Medium gewaschen und anschließend auf eine Zellkonzentration von 4×10^4 Zellen/ml in CML-Medium eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl (entspricht 2×10^3 Zielzellen) pro Loch einer 96-Loch-

Spitzbodenplatte mit zuvor ausgesäten 50 µl an Effektorzellen in T-Zell-Medium (ohne IL-2) gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Dabei wurden Triplikate einer Verdünnungsreihe der Effektorzellen von 60×10^4 Zellen, 30×10^4 Zellen, 15×10^4 Zellen und $7,5 \times 10^4$ Zellen verwendet, so dass Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen von 30:1, 15:1, 7,5:1 und 3,25:1 gegeben waren. Um die spontane Chrom-Freisetzung der Zielzellen ohne Beteiligung von Effektorzellen zu ermitteln, wurden die markierten Zielzellen ohne Effektorzellen in Parallelansätzen inkubiert. Die maximale Aktivität wurde als die maximal in den Zielzellen enthaltene Aktivität definiert und ergab sich aus der direkten Messung der markierten Zielzellen. Nach der Inkubation wurden je Ansatz 50 µl des Kulturüberstandes auf eine 96-Lochfilterplatte zum Trocknen gegeben. Am nächsten Tag wurde die Messung der Platten am *TOPCount*-Gerät durchgeführt. Von den gemessenen *counts per minute* (cpm)-Werten aller Triplikate wurde der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der spezifischen Zellyse der Zielzellen durch die Effektorzellen erfolgte anschließend anhand der Mittelwerte über folgende Formel:

% spezifische Zellyse =	(experimentelle cpm – spontane cpm)	x 100
	(maximale cpm – spontane cpm)	

3.5.2 Nachweis der Zellyse von fluoreszenzmarkierten Zielzellen

Das Prinzip dieses Versuchs ist die Zellyse von adhärennten fluoreszenzmarkierten Zielzellen durch Effektortellen. Nach Zellyse lösen sich die Zielzellen von der Plattenbodenoberfläche ab und die verbliebene Fluoreszenzintensität kann gemessen werden. Am Tag vor dem Experiment wurden die Zielzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein markiert. Hierzu wurde eine Zellsuspension von 1×10^6 Zellen/5 ml in RCC-Medium eingestellt und Calcein in einer Endkonzentration von 0,625 µg/ml zugegeben. Nach gutem Mischen wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Zellen mit RCC-Medium gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von 3×10^4 /500 µl eingestellt. Je Vertiefung einer 48-Lochplatte wurden 500 µl der Zellsuspension gegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C bis zum nächsten Tag, so dass die Tumorzellen bis zum Versuch adhärennt waren. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden 3×10^5 T-Zellen in 500 µl T-Zellmedium ohne IL-2 zu

den adhärennten Zielzellen für 4 h gegeben. Anschließend wurden die T-Zellen sowie die durch Zellyse abgelösten Zielzellen durch mehrmals wiederholende Waschschrirte entfernt. Nach dem letzten Waschschrirte wurde je Vertiefung 500 µl RCC-Medium zugegeben. Die Messung der Fluoreszenzintensität (FI) der Bodenoberfläche erfolgte mittels TECAN Genios-Plus-Gerät bei einer Wellenlänge von 535 nm, die der Emissionswellenlänge des Calceins entsprach. Die verbliebene FI war somit umgekehrt proportional zur Zellyse der Zielzellen durch die Effektorzellen. Die spontane FI ergab sich aus der Messung des Positivkontrollansatzes. Hierbei wurden JB4 verwendet, die lytische Aktivität aufwiesen. Es wurde dabei mikroskopisch überprüft, in wieweit noch adhärennte Zielzellen anwesend waren. In der Regel waren alle Tumorzellen verschwunden. Diese FI stellt somit das Hintergrundsignal dar. Die maximale FI der verwendeten Zielzellpopulation ergab sich aus der Messung des Negativansatzes (Zielzellen ohne Effektorzellen), wobei keine Zellyse stattfindet. Auch hier wurden mikroskopisch der Zellrasen überprüft. Die Berechnung der spezifischen Zellyse der Zielzellen durch die Effektorzellen anhand der gemessenen FI erfolgte über folgende Formel:

% Spezifische Zellyse =	$100 - (\text{experimentelle FI} - \text{spontane FI})$	$\times 100$
	$(\text{maximale FI} - \text{spontane FI})$	

3.6 Inkubation von T-Zellklonen auf einem Tumorzellrasen

Für den Nachweis der Granulamembranfusion nach Zielzellkontakt wurden Zellen von T-Zellklonen nach entsprechender Vorinkubation für 30 min auf einen Tumorzellrasen gegeben, anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (siehe Kapitel 3.12) gegen CD8, GMP-17 und Perforin durchgeführt und die Lokalisation des GMP-17 in den T-Zellen am konfokalen Mikroskop analysiert.

Um einen Tumorzellrasen zu erhalten, wurden 5×10^3 Tumorzellen in 400 µl RCC-Medium pro Kammer eines sterilen Kammerobjektträgers bei 37°C über Nacht kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaut, 5×10^3 T-Zellen in 100 µl T-Zell-Medium ohne IL-2 auf den Zellrasen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand abgesaut und eine Immunfluoreszenzfärbung nach Kapitel 3.10.2 durchgeführt. Wurden die

Zellen nicht unmittelbar nach der Kokultur gefärbt, wurden sie in PBS über Nacht bei 4°C stehen gelassen und am nächsten Tag die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

3.7 Generierung von Makrophagen und dendritischen Zellen aus mononukleären Blutzellen

3.7.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut

Die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut gesunder Spender erfolgte mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Abnahme des Vollblutes erfolgte in Spritzen, die 100 µl Heparin enthielten, um ein Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das heparinisierte Vollblut wurde anschließend mit RPMI-Medium 1:1 verdünnt und auf 15 ml Ficoll-Lösung in 50 ml Röhrchen vorsichtig gegeben, um eine Mischung des Blutes mit dem Ficoll zu verhindern. Ficoll ist ein nichtionisches, synthetisches Polysaccharid mit einer Dichte von 1077 g/ml. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 2000 rpm über 20 min ohne Bremse werden die Bestandteile des Blutes durch die Zentrifugalkraft entsprechend ihrer Dichte voneinander getrennt. So können die PMBC von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt werden. Die PBMC bildeten eine weiße Grenzschicht zwischen dem Plasma und der Ficoll-Lösung, wohingegen die Erythrozyten und Granulozyten im Sediment zu finden sind. Nach der Zentrifugation wurden die PBMC in ein neues Röhrchen überführt, die PBMC-Suspension mit RPMI-Medium 1:1 verdünnt und bei 1900 rpm für 12 min mit Bremse zentrifugiert, um noch vorhandenes Ficoll wegzuwaschen. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und die PMBC in 20 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde über eine Filtermembran gegeben, um größere Zellklumpen aufzulösen. Die Zellen wurden anschließend gezählt. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

3.7.2 Anreicherung von Monozyten

Die Anreicherung von Monozyten aus den PBMC erfolgte über *magnetic-activated cell sorting* (MACS). Hierbei werden Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle aus einem Zellgemisch

isoliert. An die Antikörper, die an spezifische Oberflächenstrukturen der Zellen binden, sind magnetische Kügelchen gebunden. Gibt man die Zellen anschließend in eine Säule, die an einen Magneten befestigt ist, bleiben alle antikörpergebundenen Zellen in der Säule zurück. Anschließend eluiert man die verbliebenen Zellen aus der Säule.

Entsprechend der Zellzahl der PBMC wurden pro 1×10^7 Zellen 80 μl MACS-Puffer und 20 μl CD14⁺ *micro bead*-Lösung zum Zellsediment gegeben, gut gemischt und bei 4°C für 15 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde mindestens die 20-fache Menge an MACS-Puffer zu den Zellen gegeben und diese bei 1800 rpm für 12 min zentrifugiert. Während dessen wurde die MACS-Säule in den Magnetständer gegeben und die Säule mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Das Zellsediment wurde in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen und die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die CD14⁻-Zellen, die nicht in der Säule verbleiben, wurden in einem Röhrchen aufgefangen. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule gelaufen war, wurden dreimal nacheinander jeweils 3 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben, um noch vorhandenen CD14⁻-Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetständer genommen und die CD14⁺-Zellen mit 5 ml MACS-Puffer aus der Säule gespült. Während eine Zellzählung der Monozyten durchgeführt wurde, wurden die Zellen bei 1800 rpm 12 min zentrifugiert. Die Zellen wurden auf eine Zellkonzentration von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml in AIMV-Medium eingestellt und das Medium für die Generierung der Makrophagen mit 800 U/ml GM-CSF bzw. für die Generierung der dendritischen Zellen mit 800 U/ml GM-CSF und 400 U/ml IL-4 versetzt. Für die Generierung der dendritischen Zellen wurde je Vertiefung einer 6-Lochplatte 4 ml dieser Zellsuspension bzw. für die Generierung der Makrophagen 2 ml gegeben. Die Zellen wurden für 7 bis 8 Tage kultiviert und danach in die Experimente eingesetzt.

3.8 Nachweis der Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen durch Makrophagen

3.8.1 Herstellung apoptotischer Tumorzellen

Um die Aufnahme von apoptotischen Tumorzellen durch Makrophagen durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden die Tumorzellen vor Einsatz in die Apoptoseinduktion mit dem Membranfarbstoff DiD markiert. Hierzu wurden die Tumorzellen analog Kapitel 3.11.4

behandelt, wobei eine zuvor optimale ermittelte DiD-Konzentration von 5 µl/ml Zellsuspension eingesetzt wurde. Die Herstellung von apoptotischer Tumorzellen erfolgte durch Koinkubation des Tyrosinasepeptid-spezifischen HLA-A2-restringierten T-Zellklons TyrF8 mit der HLA-A2⁺Tyrosinase⁺-Melanomzelllinie Mel 93.04 A12.1, die für TyrF8 eine Zielzelle darstellt. Hierfür wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen der Melanomzelllinie im Verhältnis 1:1 mit den T-Zellen in einem sterilen 5 ml Röhrchen in 1,5 ml T-Zell-Medium ohne IL-2 gegeben. Für eine Verstärkung der zytotoxischen Reaktion wurde zusätzlich das von TyrF8 erkannte Tyrosinase-Peptid YMNGTMSQV in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C. Nach dieser Zeit waren RANTES⁺ apoptotische Tumorzellen nachweisbar(89). Nach der Inkubation wurde die Tumor-T-Zellen-Suspension abzentrifugiert, der Kulturüberstand abgesaugt und die Zellen in entsprechendem Volumen AIMV-Medium aufgenommen, so dass ein dreifacher Überschuss an in die Apoptose-Induktion eingesetzten Tumorzellen zu den Makrophagen in 300 µl vorhanden war (siehe unten). Nach sehr gutem Mischen des Tumor-T-Zell-Gemischs wurden jeweils 300 µl zu den adhärennten Makrophagen zugegeben (siehe unten).

3.8.2 Nachweis der Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen

Am Tag vor dem Phagozytose-Versuch wurden die Makrophagen mit einem Zellschaber geerntet, gezählt und erneut in einer Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml pro Loch einer 24-Lochplatte in AIMV-Medium ausgesät. Am nächsten Tag vor Einsatz in den Phagozytose-Versuch wurde ein Loch mit adhärennten Makrophagen geerntet und gezählt, um die Anzahl der Makrophagen pro Vertiefung zu ermitteln. Die erhaltene Zellzahl wurde dann für alle parallelen Ansätze als identisch angenommen. Zu parallelen Ansätzen wurde nach Abnahme des Kulturmediums zu den adhärennten Makrophagen 200 µl AIMV-Medium ohne bzw. mit Met-RANTES zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei wurde die Konzentration des Met-RANTES so gewählt, dass die Konzentration in 500 µl 10 ng/ml entsprach. Nach 30 min wurden zu den Makrophagen 300 µl der apoptotischen Tumorzell-T-Zell-Suspension gegeben, dass rechnerisch ein Verhältnis von 3:1 Tumorzellen zu Makrophagen gegeben war. (siehe oben). Zu einem Makrophagen-Ansatz wurde kein apoptotisches Tumorzellengemisch zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Lochplatten bei 37°C bzw. 4°C (auf Eis im

Kühlraum) für 30 min und 60 min. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Medium abgesaugt und 500 µl Stopp-Puffer zugegeben und erneut abgesaugt. Dies wurde zwei Mal wiederholt, um nicht aufgenommene apoptotische Tumorzellen und die T-Zellen wegzuwaschen. Zum Ablösen der adhärennten Makrophagen wurde 500 µl Accutase-Lösung, ein Enzymgemisch, das die adhärennten Zellen von der Lochbodenoberfläche ablöst, für 10 min bis 15 min zugegeben und zwischendurch oftmals die Lochplatte geschüttelt. Die abgelösten Makrophagen und gegebenenfalls noch vorhandenen apoptotischen Tumorzellen und T-Zellen wurden in kleine FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde eiskalter FACS-Puffer zugegeben und die Zellen einer Markierung des Zelloberflächenproteins CD11c mit einem fluoreszenzmarkierten (Phycoerythrin, PE) CD11c-spezifischen Antikörpers unterzogen. Anschließend wurden die lebenden Zellen unmittelbar am Durchflusszytometer aufgenommen.

Die Voreinstellungen am Durchflusszytometer erfolgten für die Einstellung des PE-Kanals mit dem Ansatz CD11c⁺-Makrophagen ohne apoptotische Tumorzellen und die Einstellung des DiD-Kanals mit einem Ansatz der apoptotischen Tumorzellen (DiD⁺) ohne Makrophagen. Die Aufnahme aller Ansätze wurde erst durchgeführt, wenn die Abgrenzung der Makrophagen- und der Tumorzell-Population voneinander im Wolkendiagramm von PE gegen DiD gegeben war.

3.9 Nachweis der Makropinozytose

Makrophagen bzw. dendritische Zellen wurden in 100 µl (1×10^5) in kleine FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde 900 µl FITC-markiertes Dextran in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Als Vergleichskontrolle wurden die Zellen auch jeweils ohne FITC-Dextran behandelt. Die Zellen wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert, die FITC-Dextran-Lösung abgesaugt und die Zellen in 500 µl eiskaltem FACS-Puffer aufgenommen, um die Reaktion zu stoppen. Der Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, indem zu den Zellen 100 µl FACS-Puffer gegeben wurde. Die Aufnahme der Zellen am Durchflusszytometer erfolgte unmittelbar. Dabei diente die Fluoreszenzintensität der Zellansätze ohne FITC-Dextran als Kriterium für die Hintergrundeinstellung des FITC-Kanals.

3.10 Nachweis von Zytokinen mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Der Nachweis der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TGF- β in Kulturüberständen erfolgte durch einen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nach der *Sandwich*-Methode (Abbildung 3.1). Hierbei wird eine 96-Lochplatte mit einem Zytokin-spezifischem Erstantikörper (*capture*-Antikörper) beschichtet. Anschließend wird die Platte mit einem Blockpuffer inkubiert und die zu untersuchende Probe aufgetragen. Nach Inkubationsende wird die Platte mit Waschlösung gewaschen, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu beseitigen. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Biotin-markierter Zweitantikörper (Detektions-Antikörper) zugegeben. Anschließend wird die Platte wieder gewaschen und Meerrettich-Peroxidase-gebundenes Avidin zugegeben. Dieses bindet an das Biotin des Detektions-Antikörpers. Die Meerrettich-Peroxidase spaltet nun die zugegebenen Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in ein farbiges Produkt. Die Reaktion wird anschließend durch Phosphorsäure (Stopplösung) abgestoppt. Die Farbintensität ist dabei direkt proportional zu der umgesetzten Substratmenge und somit indirekt proportional zur gebundenen Menge an Zytokin. Das durch die Meerrettich-Peroxidase umgesetzte Produkt kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden (Extinktionswerte). Durch eine mitgeführte Standardverdünnungsreihe mit rekombinantem Zytokin kann die Zytokin-Konzentration der experimentellen Probe ermittelt werden. Eine Verdünnungsreihe des rekombinanten Zytokins wird dabei auf jeder 96-Lochplatte mitgeführt.

Vor Einsatz der Zellkulturüberstände in den ELISA wurden sie bei 13 000 rpm für 5 min abzentrifugiert, um noch vorhandene Zellbestandteile zu sedimentieren. Wurde der ELISA nicht unmittelbar nach dem jeweiligen Experiment durchgeführt, wurden die Zellkulturüberstände bei -80°C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingefroren. Nach dem Auftauen wurden sie nach gutem Mischen zentrifugiert bevor sie in

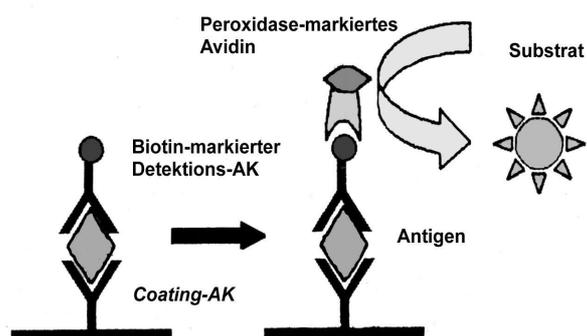


Abb. 3.2: Prinzip des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nach der *Sandwich*-Methode.

Erläuterung der schematischen Darstellung: siehe Text
Abkürzungen: AK = Antikörper.

den ELISA eingesetzt wurde. Wurden Kulturüberstände aus 96-Lochplatten in den ELISA eingesetzt erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min.

3.10.1 Nachweis von IFN- γ und IL-2

Der Nachweis von IFN- γ und IL-2 erfolgte nach Angaben der Hersteller. Anstelle von 100 μ l Antikörperlösung wurden jeweils 50 μ l verwendet. Die Blockierung der Platten erfolgte mit 1 % Magermilchpulver in PBS.

3.10.2 Nachweis von TGF- β

Der Nachweis von TGF- β erfolgte nach Angaben des Herstellers. Sowohl der *Capture*- als auch der Detektions-Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:125 anstelle von 1:250 eingesetzt. Die Blockierung der Platten wurde mit 10 % FCS durchgeführt. Der Nachweis von aktivem TGF- β in den Kulturüberständen erfolgte durch direkten Einsatz dieser in den ELISA. Die Aktivierung des latenten TGF- β in den Kulturüberständen erfolgte durch Säureaktivierung und anschließender Neutralisierung. Hierzu wurden zu je 100 μ l Kulturüberstand 4 μ l 1 N Salzsäure zugegeben, gut gemischt und die Kulturüberstände 60 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde je 100 μ l Kulturüberstand 4 μ l 1 N Natriumhydroxid zugegeben, gut gemischt und die Proben unmittelbar in den ELISA eingesetzt.

3.10.3 Auswertung des ELISA

Anhand der mitgeführten Standardverdünnungsreihe ließen sich die Konzentrationen der Zytokine in den untersuchten Proben ermitteln. Hierzu wurde eine Standardkurve anhand der vorgegebenen Zytokin-Konzentrationen und der jeweiligen gemessenen Extinktionswerte im Programm SigmaPlot erstellt. Über die fünfparametrische Gleichung wurden die Zytokin-Konzentrationen der Proben anhand des für jede Probe gemessenen Extinktionswerts errechnet. Die über die Formel errechneten Zytokin-Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe sollten nicht mehr als 30 % von den vorgegebenen abweichen.

3.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, Zellen auf die Expression mehrerer Oberflächenmoleküle bzw. intrazellulärer Proteine gleichzeitig zu untersuchen. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, die gegen bestimmte Proteine gerichtet sind. Nicht markierte Antikörper (Primärantikörper) können über isotyp- oder speziesspezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper (Sekundärantikörper) abgegriffen werden. Ebenfalls können mithilfe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe Zellen markiert werden. Anhand der Markierung durch die Fluoreszenzfarbstoffe können die Zellen anschließend durch *fluorescence activated cell sorting* (FACS) am Fluoreszenzzytometer analysiert werden. Bei der Messung der Zellen am Fluoreszenzzytometer werden diese über einen Flüssigkeitsstrom durch eine Messküvette aufgenommen und einzeln voneinander getrennt. Hat ein fluoreszenzmarkierter Antikörper an eine Zelle gebunden, wird der konjugierte Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laser, der die entsprechende Extinktionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs emittiert, angeregt. Der angeregte Farbstoff absorbiert die Energie des Laserlichtes und gibt sie in Form eines Photons einer bestimmten Wellenlänge (Emissionswellenlänge) wieder ab. Mithilfe geeigneter Filter, die einen bestimmten Bereich des emittierten Lichts durchlassen, werden die Photonen durch einen Photodetektor registriert. Die Anzahl der detektierten Photonen ist dabei proportional zu der Anzahl gebundener Antikörper bzw. Fluoreszenzmoleküle und somit zu der Expressionsstärke des untersuchten Moleküls (siehe Abbildung

3.3). Wichtig ist hierbei, dass geeignete Kontrollansätze bei jeder Messung mitgeführt werden, da die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nur als relativ angesehen werden dürfen. Die Kontrollansätze beinhalten einen Ansatz mit einem Antikörper, der bekanntermaßen an die Zelle bindet, und eine Ansatz mit einem Antikörper ohne gegebene Spezifität (Isotypkontrollantikörper), um das Hintergrundsignale zu erfassen. Zudem wird von jeder Zelle das Vorwärtsstreulicht

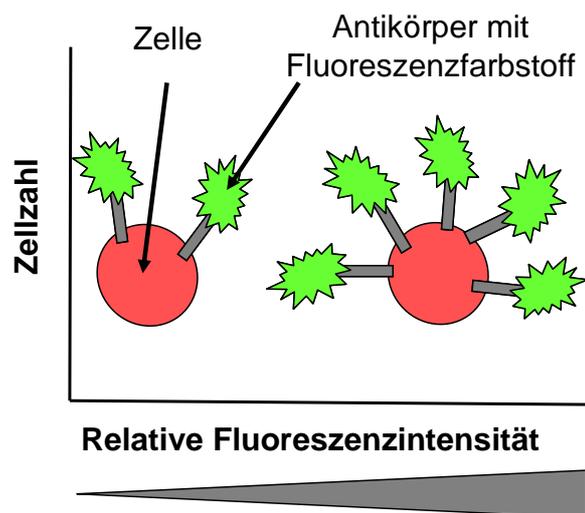


Abb. 3.3: Schematische Darstellung von Zellen mit unterschiedlicher Anzahl an gebundenen Antikörpern in einem Histogramm. Erläuterung siehe Text.

(*forward scatter*, FSC), ein Maß für die Größe der Zelle, und das Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC), ein Maß für die Granularität der Zelle, bestimmt. So ist es möglich, die in einer Probe enthaltenen Zellen nach der Größe und der Granularität, sowie auf die Fluoreszenzintensität, d.h. auf die Präsenz verschiedener Moleküle gleichzeitig zu untersuchen. Mittels einer speziellen Software des Fluoreszenzzytometers wird jedem gemessenen Ereignis, d.h. jeder Zelle, ein Wert für SSC, FSC, sowie für jede Fluoreszenzintensität zugeordnet und gespeichert. Alle gemessenen Fluoreszenzintensitätswerte eines Zellansatzes lassen sich gegen die Anzahl der Ereignisse (Zellen) als Histogramme mit logarithmischer Skalierung der Fluoreszenzintensität darstellen (Abbildung 3.4, rechts). Alternativ können zwei Parameter als Wolkendiagramm darstellen werden (Abbildung 3.4, links).

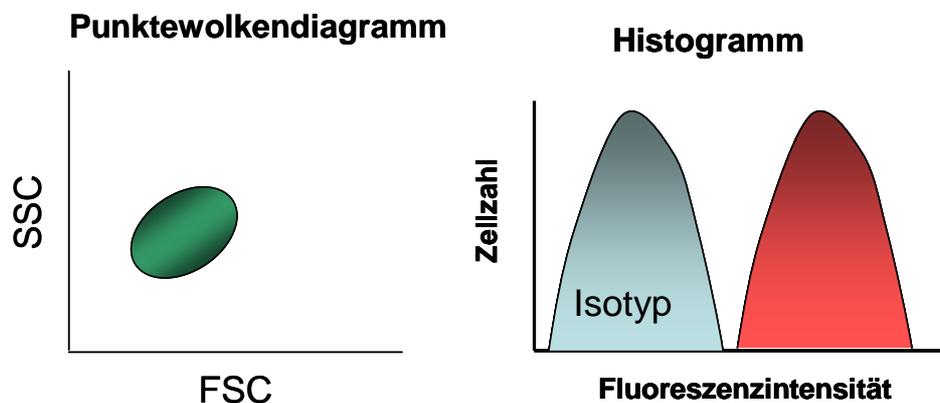


Abb. 3.4: Schematische Darstellung eines Punktwolkendiagramms von FSC gegen SSC (links) sowie der Darstellung der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl als Histogramm (rechts). Erläuterung siehe Text. Abkürzungen: FSC: Vorwärtsstreulicht, SSC: Seitwärtsstreulicht, Isotyp: Kurve der Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers.

In der vorliegenden Arbeit wurde der FACSCalibur, der mit zwei Lasern (Argonlaser und Heliumneonlaser) ausgestattet ist, sowie der LSR-II, der mit vier Lasern (Argonlaser, Heliumneonlaser, UV-Laser und violetter Laser) ausgestattet ist, verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit jeweiligen Extinktions- und Emissionsmaxima, sowie die verwendeten Laser und Filter (LSR-II) bzw. Fluoreszenzkanäle (FACSCalibur) sind aus Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Übersicht über Extinktions- und Emissionsmaxima, der Laser für die Anregung sowie die Filter für die Detektion der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe im FACS.

Fluoreszenzfarbstoff	Extinktionsmaxima	Emissionsmaxima	λ des Lasers	Filter (nm)	Kanal ⁵
FITC	495 nm	525 nm	488 nm ¹	530 / 30 ⁴	1
PE	564 nm	575 nm	488 nm ¹	575 / 26	2
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	488 nm ¹	530 / 30	1
DiD	644 nm	665 nm	633 nm ²	660/20	4
7-Actinomycin D	543 nm	655 nm	488 nm ¹	610 / 20	3
Propidiumjodid	493 nm	619 nm	350 nm ³	610 / 20	3

¹Argonlaser, ²Heliumneonlaser, ³UV-Laser
⁴Filter lässt eine Wellenlänge von 530 nm \pm 15 nm durch
⁵Angabe des Fluoreszenzkanals am FACSCalibur

3.11.1 Markierung von Zelloberflächenproteinen

Alle Schritte zur Markierung der Zellen für die FACS-Analyse erfolgten auf Eis. Für die Markierung von Zelloberflächenproteinen wurden zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen in ein kleines FACS-Röhrchen gegeben und 500 μ l FACS-Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 50 μ l abgesaugt (im Folgenden als „Waschen“ bezeichnet). Die Zellen wurden mit der jeweiligen Antikörpermenge (siehe Tabelle 2.3) 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 500 μ l FACS-Puffer gewaschen und bis auf 100 μ l Puffer abgesaugt. Erfolgte die durchflusszytometrische Messung nicht unmittelbar im Anschluss mit den lebenden Zellen, wurden sie mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das PFA vernetzt dabei die Zellproteine und macht die Zellfärbungen somit über einen längeren Zeitraum haltbar. Nach Fixierung wurden die Zellen innerhalb von drei Tagen am Durchflusszytometer aufgenommen.

3.11.2 Markierung von intrazellulären Proteinen

Wurde keine Markierung von Oberflächenproteinen durchgeführt, wurden die Zellen nach der Aufnahme in 500 µl FACS-Puffer gewaschen und wie folgt weiterbehandelt. Für die Markierung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen zuerst mit PFA fixiert. Hierbei wurde zu den Zellen während dem Vorgang des Zellmischens 500 µl PFA zugegeben und die Zellen für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen.

Besonders wichtig war es, die Zellen vor einer Inkubation mit einem Perforin-spezifischen Antikörper, nach der Behandlung mit dem PFA unbedingt mit PBS zu waschen, da ansonsten das vom Perforin-spezifischen Antikörper erkannte Epitop zerstört wird und ein Nachweis von Perforin nicht mehr möglich ist.

Für den Eintritt der Antikörper in das Zellinnere wurden die Zellen nach der Färbung der Oberflächenproteine durch die Behandlung mit Saponin permeabilisiert. Nach dem letzten Waschschrift nach der Fixierung wurden die Zellen hierfür in 500 µl einer 0,1 % Saponinlösung aufgenommen und in einem darauf folgenden Waschschrift weitere 500 µl einer 0,35 % Saponinlösung zugegeben und erneut gewaschen. Anschließend wurde die entsprechende Menge der jeweiligen markierten oder unmarkierten Primärantikörper (siehe Tabelle 2.4) zu der Zellsuspension gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Bei einer Markierung der intrazellulären Proteine mit einem unmarkierten Primärantikörper erfolgte ein weiterer Permeabilisierungsschritt mittels Saponin analog dem ersten. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde zu den Zellen gegeben und bei 4°C 30 min inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,1 % Saponinlösung gewaschen. Es erfolgte eine erneute Fixierung durch die Zugabe von 500 µl PFA, um auch die gebundenen intrazellulären Antikörper zu fixieren. Die Proben wurden innerhalb von 3 Tagen am Durchflusszytometer aufgenommen.

3.11.3 Markierung toter Zellen

In vielen Fällen ist es wichtig lebende von toten Zellen zu unterscheiden, da tote Zellen eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Wurden die Proben unmittelbar am Fluoreszenzzytometer gemessen, wurde die Anfärbung der toten Zellen durch die Zugabe von 0,2 µg/ml Propidiumiodid (PI) kurz vor der Messung durchgeführt. PI kann die perforierte Zellmembran toter Zellen aber nicht lebender Zellen durchdringen und interkaliert dort in die DNA. Für eine Lebend-Tot-Unterscheidung von Zellen, die anschließend einer Markierung von intrazellulären Proteinen unterzogen wurden, wurde 7-Aminoactinomycin-D (7AAD) verwendet. 7AAD gelangt ebenfalls in tote Zellen und lagert sich in die DNA. Für eine Markierung toter Zellen mit 7AAD wurden diese vor der Oberflächenfärbung mit 10 µg/ml 7AAD für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 500 µl PBS gewaschen, bevor mit der Fixierung der Zellen fort gefahren wurde. Die Extinktions- und Emissionsmaxima für PI und 7AAD sowie die verwendeten Laser und Filter bzw. Fluoreszenzkanäle sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

3.11.4 Markierung der T-Zell-Membran

Um die T-Zellen bei der durchflusszytometrischen Analyse von den Tumorzellen nicht nur anhand der Größe und Granularität durchflusszytometrisch unterscheiden zu müssen, wurde die T-Zellen mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiD, der sich in die Membran von Zellen einlagert, markiert. Die DiD-markierten Zellen können dann anhand des spezifischen Anregungs- und Absorptionsspektrums von DiD identifiziert werden. Für den T-Zellklon JB4 wurde eine optimale Konzentration an DiD von 4,5 µl pro 1×10^6 /ml T-Zellsuspension ermittelt. Die Stärke der daraus resultierenden Fluoreszenzintensität der DiD-markierten T-Zellen trennte die T-Zell-Population deutlich von der DiD-unmarkierten Tumorzellpopulation ab (siehe Abb. 4.13C). Nach Ernte und Zählung der T-Zellen wurde eine T-Zellsuspension von 1×10^6 Zellen/ml in OPTI-MEM-Medium in 50 ml Röhrchen eingestellt (mindestens 2×10^6 Zellen). Anschließend wurde das entsprechende Volumen der DiD-Lösung zugegeben, die Zellen durch resuspendieren gut gemischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde mindestens 10 ml OPTI-MEM zur Zellsuspension gegeben, die Zellen für 5 min bei 1500 rpm

abzentrifugiert und der Kulturüberstand abgesaugt. Das Zellsediment wurde durch mehrmaliges Endlangziehen auf einem Gitter gut aufgemischt und erneut 10 ml OPTI-MEM-Medium zugegeben. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt, um ungebundenes DiD zu entfernen. Nach erneuter Zellzählung wurden die Zellen in für das anschließende Experiment entsprechendes Kulturmedium aufgenommen.

Um die Effektorfunktion von DiD-markierten JB4 mit unmarkierten JB4 zu vergleichen, wurde die Zytokin-Freisetzung nach Stimulation mit Zielzellen gemessen. Hierzu wurden 5×10^3 T-Zellen mit $1,5 \times 10^4$ RCC26 (HLA-A2⁺) bzw. KT-195 (HLA-A2⁻) in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in 200 µl T-Zell-Medium über 24 h inkubiert. Um die Spezifität der Zytokin-Freisetzung beurteilen zu können, wurden die Stimulationszellen und die Effektorzellen jeweils auch alleine in 200 µl inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände in einen IFN- γ - bzw. IL-2-spezifischen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eingesetzt (siehe Kapitel 3.10). Des Weiteren wurde die lytische Aktivität von DiD⁺-T-Zellen mit DiD⁻-T-Zellen mittels Chromfreisetzungstest verglichen (siehe Kapitel 3.4.1). Hier bei wurde als Zielzelle die HLA-A2⁺ Melanomzelllinie Mel 93.04 A12.1 verwendet. Aus Abbildung 3.5 ist zu erkennen, dass die IFN- γ - und IL-2-Sekretion sowie die lytische Aktivität des T-Zellklons JB4 durch eine DiD-Markierung unbeeinträchtigt ist.

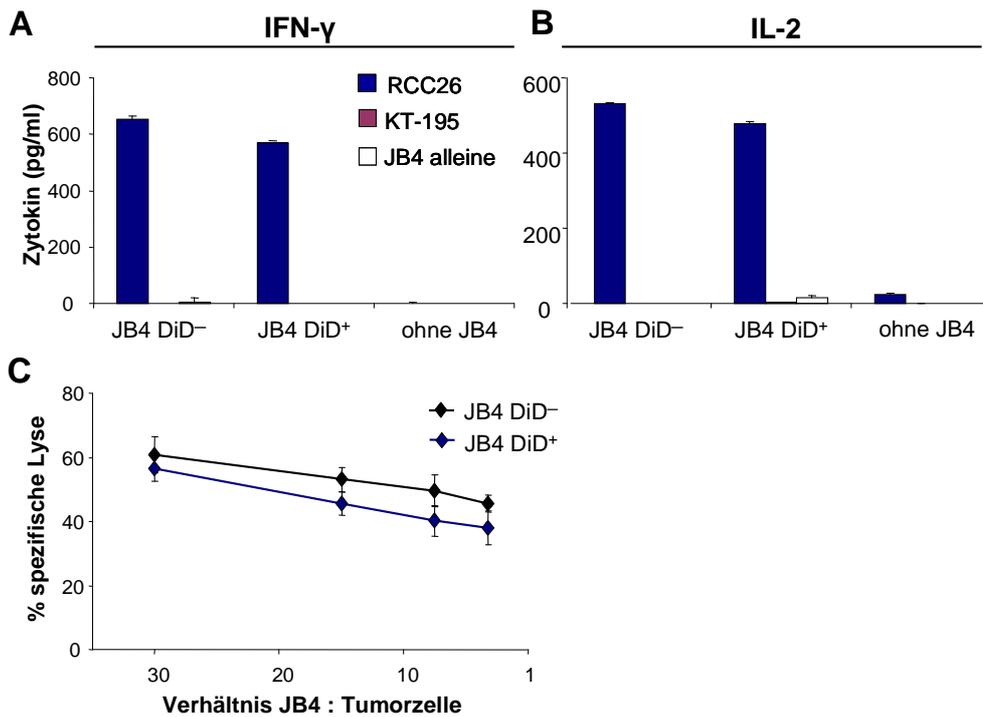


Abb. 3.5: Zytokinfreisetzung und lytische Aktivität des DiD-markierten T-Zellklons JB4.

A, B. IFN- γ - und IL-2-Sekretion DiD-markierter JB4 nach Stimulierung mit Tumorzellen. Der T-Zellklon JB4 wurde unmarkiert bzw. mit dem Membranfarbstoff DiD markiert und anschließend mit der HLA-A2⁺-Tumorzelllinie RCC26 bzw. mit der HLA-A2⁻-Tumorzelllinie KT-195 für 24 h stimuliert. Die Konzentration an IFN- γ bzw. IL-2 wurde in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte von zwei parallel durchgeführten Stimulierungsansätzen \pm Mittelwertabweichung. **C.** Zellvermittelte Lyse der Tumorzelllinie Mel 93.04 A12.1 durch unmarkierte bzw. DiD-markierte JB4. Der T-Zellklon JB4 wurde unmarkiert bzw. mit dem Membranfarbstoff DiD markiert und anschließend für 4 h mit verschiedenen Verhältnissen der ⁵¹Cr-markierten Tumorzellen inkubiert. Anhand des freigesetzten Choms in den Überständen wurde die spezifischen Lyse berechnet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der spezifischen Lyse in Prozent aus Triplikaten \pm Mittelwertabweichung.

3.11.5 Messung und Auswertung der Messdaten

Bevor eine Messung der Zellansätze am Fluoreszenzzytometer durchgeführt wurde, mussten Voreinstellungen mit separaten Einstellungsproben vorgenommen werden. Zuerst wurde die zu untersuchende Zellpopulation optimal in einem Wolkendiagramm der FSC-Intensität gegen die SSC-Intenität in der entsprechenden Software des Fluoreszenzzytometers eingestellt, so dass sich die gewünschte Zellpopulation möglichst in der Mittel des Punktwolkendiagramms (siehe

Abbildung 3.4, links) befand. Hierzu wurde in der Regel ein separater Zellansatz verwendet, der Zellen der keine Antikörper enthielt. Anschließend wurde der Zellansatz mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Isotypkontrollantikörper gemessen. Hierbei wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten als Histogramme angezeigt (siehe Abbildung 3.4, rechts) und die Kurve der Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers im Histogramm positioniert, so dass sich die Kurve möglichst weit links im Histogramm befanden (mittels der PMT-Spannungseinstellung). Da der Zellansatz mit dem Isotypkontrollantikörper als Negativkontrolle diente, sollte sich die Fluoreszenzkurve der Zellprobe, bei Präsenz des vom spezifischen Antikörpers erkannten Proteins, rechts davon befinden. Zu jeder Probe wurde ein paralleler Ansatz mit einem Isotypkontrollantikörper mitgeführt, um die Hintergrundfluoreszenzintensität des jeweiligen Protein-spezifischen Antikörpers zu erfassen.

Da die einzelnen Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe überlappen können, wie das z.B. es bei Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) der Fall ist (siehe Abbildung 3.6), war es notwendig vor der eigentlichen Messung der Proben eine Korrektur (Kompensation) der spektralen Überlappungen der Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe vorzunehmen. Die Kompensation ist immer dann erforderlich, sobald mehr als eine Fluoreszenzintensität simultan gemessen werden soll. Hierzu wurden Zellansätze benötigt, die jeweils nur einen Fluoreszenzfarbstoff beinhalteten. Am FACSCalibur musste hierzu die Korrektur der spektralen Überlappung manuell durchgeführt werden. Abbildung 3.7 gibt ein Beispiel einer Kompensation von FL 1 gegen FL 2 mit einer Probe, die nur in FL 1 „positiv“ ist. Dazu wurde in einem Wolkendiagramm überprüft, ob es doppelt-positive Signale (FL 1⁺FL 2⁺) gibt (Abbildung 3.7, links). War dies der Fall, so wurde von der Fluoreszenzintensität (FL 1), die kein Signal in FL 2 geben sollte, so lange Einheiten (%) der FL 2 abgezogen, bis die Population in FL 2 „negativ“ war (Abbildung 3.7, rechts). Nach diesen Einstellungen in der

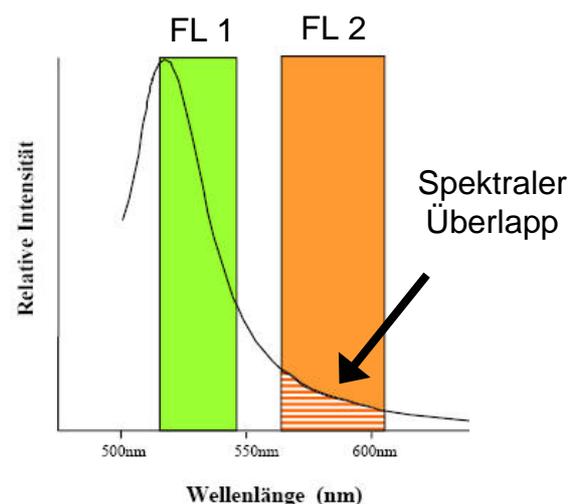


Abb. 3.6: Beispiel einer spektralen Überlappung des Emissionsspektrums von FL 1 in FL 2. Erläuterung siehe Text.

Software am Fluoreszenzzytometer wurden alle Zellansätze inklusive der Einstellungsproben aufgenommen. Die vor der Messung eingestellten Einstellungen konnten am FACSCalibur nach der Messung der Proben nicht mehr verändert werden.

Als optimal kompensiert bezeichnet man eine Einstellung eines Kontrollansatzes, der eine „negative“ sowie eine „positive“ Zellpopulation beinhaltet und letztere nur ein Signal aufweist (in Abbildung 3.7 FL 1) und nach der Kompensation die „positive“ Population dieselbe mediane Fluoreszenzintensität (MFI) wie die „negative“ Population aufweist (durch die gestrichelte Linie in Abbildung 3.7 rechts dargestellt) (90). Dieses Prinzip macht sich die FacsDiva-Software am LSR-II-Gerät zu Nutze. Hierbei werden alle Proben, die mit nur einem Fluoreszenzmolekül gefärbt wurden, gemessen und dabei in der Software-Einstellung die „positive“ Population markiert wird, um der Software anzugeben, welche Fluoreszenzintensität der Anwender als „positiv“ definiert. Die Software ist dann in der Lage, die jeweiligen Überlappungen der Spektren zu messen und zu korrigieren. Durch diese Autokompensation ist es nicht mehr nötig, die Proben manuell zu kompensieren. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Software häufig überkompensiert. Da es hier möglich ist, die Kompensation auch noch nach der Messung zu verändern, wurden die Kompensationen jeweils überprüft und eventuell manuell optimiert. Die am FACSCalibur gemessenen Daten wurden mittels der Software CellQuestPro (Becton Dickinson) und die am LSR-II-Gerät gemessenen Daten mittels der Software FlowJo (TreeStar Corp.) ausgewertet.

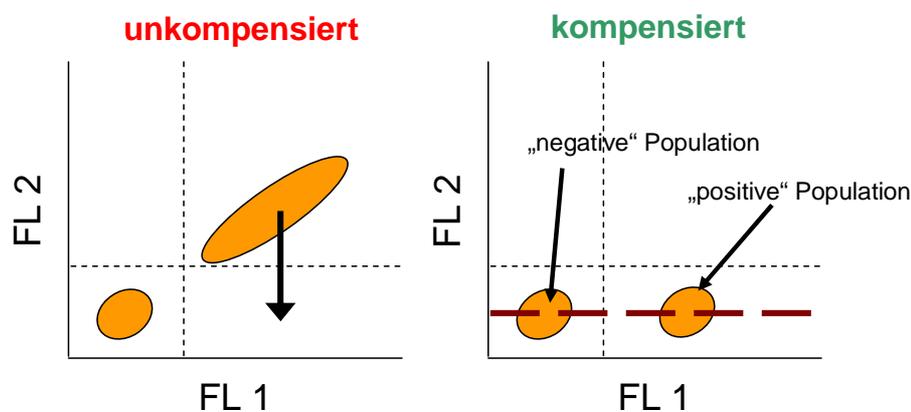


Abb. 3.7: Schematische Darstellung eines Punktwolkendiagramms mit zwei Zellpopulationen vor bzw. nach Durchführung der Kompensation. Erläuterung siehe Text.

3.12 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Oberflächenproteine oder intrazelluläre Proteine von Zellen ebenfalls wie bei der Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern abgegriffen. Die Analyse der Zellen erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der Vorteil zur Durchflusszytometrie ist hierbei, dass zusätzlich zur Präsenz eines Proteins die Lokalisation dieses innerhalb der Zellen analysiert werden kann. Der Vorteil der Durchflusszytometrie liegt jedoch in der besseren Quantifizierbarkeit der Zellen, da hierbei mehrere tausend Zellen analysiert werden.

In vorliegender Arbeit wurde zum Teil eine Dreifachimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt, so dass gleichzeitig drei verschiedene Proteine in einer Zelle nachgewiesen werden können. Die verwendeten Primärantikörper waren alle unmarkiert und mussten mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern abgegriffen werden. Damit ein Sekundärantikörper spezifisch nur einen Primärantikörper abgreift, müssen sich die Primärantikörper voneinander entweder anhand des Isotyps des Antikörpers oder der Spezies, aus dem der Antikörper gewonnen wurde, unterscheiden. Anschließend können fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper mit Isotyp- oder Spezies-Spezifität verwendet werden, die jeweils spezifisch nur einen Primärantikörper abgreifen (siehe Abbildung 3.8). Durch den Einsatz verschiedener Laser und Filter können die verschiedenen verwendeten Fluoreszenzmoleküle angeregt und die Präsenz sowie die Lokalisation der abgefangenen Proteine mittels einer Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Der Kern einer Zelle lässt sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) ebenfalls anfärben. DAPI bindet hochspezifisch an Adenin-Thymidin-Basenpaare und markiert daher spezifisch die DNA.

3.12.1 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit kryokonservierten Gewebeschnitten

Die Gewebeschnitte waren bei -80°C eingelagert und wurden nach dem Auftauen (mindestens 1 h) 10 min mit eiskaltem Aceton fixiert und anschließend die Gewebeschnitte zur besseren Orientierung mit einem Fettstift umrandet. Die Gewebeschnitte wurden mit 2 % BSA in PBS für 20 min fixiert. Alle Primär- und Sekundär-Antikörper wurden mit 12,5 % humanem Serum in

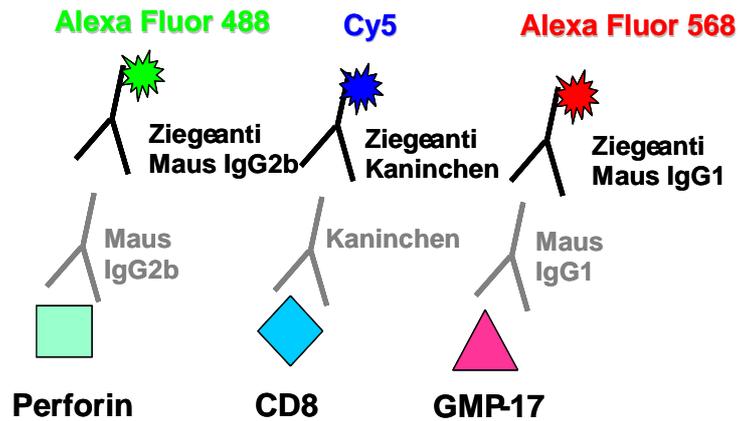


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Färbeansatzes für die Immunfluoreszenzfärbung. Perforin-, CD8-, und GMP-17-spezifische Primärantikörper können von Spezies- bzw. Isotyp-spezifischen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern abgegriffen werden.

PBS verdünnt. Die Schnitte wurden nach 3-maligem Waschen mit der Primärantikörper-Lösung, die alle Primärantikörper in den in Tabelle 2.4 angegebenen Konzentrationen enthielt, für 1 h inkubiert. Folgende Antikörperkombination wurde verwendet: Kaninchen anti-CD8, Maus-IgG1 anti-GMP-17 und MausIgG2b anti-Perforin (siehe Abbildung 3.8). Nach 3-maligem Waschen wurden die Gewebeschnitte mit einer Lösung, die alle Sekundärantikörper in den in Tabelle 2.5 angegebenen Konzentrationen enthielt, für 1 h inkubiert. Hierbei wurde folgende Antikörperkombination verwendet: anti-Kaninchen-Cy5, anti-IgG1-Alexa Fluor 568 und anti-IgG2b-Alexa Fluor 488 (siehe Abbildung 3.8). Ab diesem Schritt wurde im Dunkeln gearbeitet, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbmoleküle zu vermeiden. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut gewaschen und für 10 min mit einer 4 % PFA-Lösung fixiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte DAPI, indem die Gewebeschnitte für 1 min in eine DAPI-Lösung (150 µg/ml) gegeben wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Vectashield eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Schnitte wurden bis zur Betrachtung unter dem konfokalen Lasermikroskop im Dunkeln bei -20°C gelagert.

3.12.2 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung von Paraffingewebeschnitten

Paraffingewebeschnitte mussten vor der Behandlung mit Antikörpern entparaffiniert und demaskiert werden. Hierzu wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten 5 min in Xylol gegeben. Das Xylol wurde verworfen und die Gewebeschnitte für weitere 5 min in frisches Xylol gegeben. Anschließend wurden die Schnitte jeweils für 5 min in 100 %, 70 % und 40 % Ethanol inkubiert. Für die Demaskierung von Proteinen wurde eine Glasküvette mit DAKO[®] Target Retrieval Solution (1x) im Wasserbad auf 95 % bis 97 % erwärmt und die Gewebeschnitte für 1 h darin inkubiert. Nach Inkubation wurde die Küvette auf Raumtemperatur abgekühlt, die Objektträger herausgenommen und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Immunfluoreszenzfärbung analog zu Kapitel 3.12.1 durchgeführt. Folgende Kombination der Primärantikörper wurde verwendet: Kaninchen anti-CD8, Maus-IgG1 anti-GMP-17 und Ratte anti-Perforin. Folgende Kombination an Sekundärantikörpern wurde verwendet: anti-Kaninchen-Cy5, anti-IgG1-Alexa Fluor 488 und anti-Ratte-Cy3.

3.13 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

In dieser Arbeit wurden Gewebeschnitte bzw. auf Objektträger fixierte Zellen nach der Immunfluoreszenzfärbung mithilfe eines konfokalen Laser-Rastermikroskops (Laser-Rastermikroskop TCS SP2 von Leica) analysiert. Der Vorteil des konfokalen gegenüber einem gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskop ist, dass vom Fluoreszenzfarbstoff emittiertes Licht nur aus einer einzelnen Zellebene (optische Schnittebene) abgefangen wird. Signale die aus tieferen bzw. höheren Zellebenen kommen werden ausgeblendet, so dass Strukturen nur aus einer definierten Höhe innerhalb der Zelle analysiert werden können. Nach Aufnahmen von mehreren Schnittebenen durch die Zelle, lassen sich die räumlichen Strukturen innerhalb der Zelle erfassen. Die Aufgenommenen einzelnen Schnittebenen können separat (eine optische Schnittebene) oder gestapelt (Projektion aller Ebenen auf eine Bildebene) dargestellt werden. Durch die gestapelte Projektion ist die räumliche Zuordnung einer Struktur aber nicht mehr möglich. Daher zeigen alle in der Arbeit gezeigten konfokalen Aufnahmen eine einzelne Schnittebene der Zelle. Dennoch wurde für die Analyse der räumlichen Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle jede einzelne der aufgenommenen Schnittebenen evaluiert. Das in

dieser Arbeit verwendete konfokale Lasermikroskop war mit vier Lasern ausgestattet, so dass bis zu vier verschiedene Proteine bzw. Strukturen gleichzeitig in einer Zelle analysiert werden konnten. Das Mikroskop ist mit zwei Heliumneonlasern (633 nm bzw. 543 nm), einem Diodenlaser (405 nm) und einem Argonkryptonlaser (488 nm) ausgestattet. In der Tabelle 3.3 sind die verwendeten Fluoreszenzmoleküle mit den zum Nachweis verwendeten Laser und Strahlenteiler aufgeführt.

Tabelle 3.3: Übersicht über die verwendeten Laser für die Anregung sowie die Strahlenteiler für die Detektion der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe am konfokalen Laser-Rastermikroskop.

Fluoreszenzfarbstoff	Verwendeter Laser	λ des Lasers	Strahlenteiler
Alexa Fluor 488	Argonkryptonlaser	488 nm	488/543
Alexa Fluor 568	Heliumneonlaser	543 nm	488/543
Cy3	Heliumneonlaser	543 nm	488/543
Cy5	Heliumneonlaser	633 nm	488/543/633
DAPI	Diodenlaser	405 nm	Substrat

3.13.1 Aufnahme und Bearbeitung der aufgenommenen Bilder

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Ölimmersionsobjektivlinse (HCX PL APO 63 x 1,40 NA), so dass eine Vergrößerung von 630x gegeben war. Um mögliche Intensitätsüberlagerungen der Emissionssignale der vier Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, wurden die Aufnahmezeiten des Emissionswellenlängenbereichs kontrolliert, sowie die Aufnahme der vier verwendeten Fluoreszenzmoleküle durch den sequentiellen Aufnahmemodus durchgeführt.

Die Intensitäten einzelner Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb einer Zelle wurden in der Bildbearbeitung durch beliebige Farben dargestellt. Wenn zwei Proteine, die durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe markiert, räumlich eng nebeneinander liegen, kommt es zur Überlagerung der für die Darstellung verwendeten Farbsignale. Die Überlagerung wird durch die Mischfarbe der entsprechenden Farben dargestellt. So wurde in dieser Arbeit das GMP-17

rot, CD8 grün, Perforin blau und DAPI (Zellkern) grau dargestellt. Die Beurteilung der Kolo-kalisation von Proteinen erfolgte durch Analyse der einzelnen aufgenommenen Schnittebenen. Die Bearbeitung der in dieser Arbeit gezeigten Bilder erfolgte nur durch Veränderungen des Kontrasts und/oder der Helligkeit des gesamten Bildes in der speziellen Leica Software (Leica konfokal Software LCSLite).

3.14 Gewinnung von Tumorkulturüberstand

Die Tumorzelllinie RCC26 wurde in einer Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ (entspricht „10x“) in T-Zell-Medium über 35 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm), der Kulturüberstand steril in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Vor Einsatz in die Experimente wurde der aufgetaute und auf Raumtemperatur erwärmte Tumorkulturüberstand gut gemischt.

3.15 Einstellung des pH-Werts von Zellkulturmedium

Die Einstellung des pH-Werts von 6,0 in T-Zell-Medium erfolgte durch unsterile Zugabe von Salzsäure unter Messung des pH-Werts am pH-Meter bis ein Wert von 6,0 erreicht wurde. Anschließend wurde das auf pH 6,0 eingestellte Medium sterilfiltriert.

3.16 Statistische Analyse

Der Signifikanz-Test von zwei unabhängigen Stichproben wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test mittels S-Plus durchgeführt. Dieser Signifikanz-Test wurde aufgrund der niedrigen Probenzahlen und der nicht gegebenen Normalverteilung angewandt (91). Falls nicht anders vermerkt, wurde die zweiseitige Alternativhypothese angenommen, die die Nullhypothese (beide Zahlenreihen gehören zur selben Grundgesamtheit) abgelehnt, wenn die unabhängigen Stichproben voneinander kleiner oder größer sind. Im Gegensatz zur zweiseitigen lehnt die einseitige Alternativhypothese die Nullhypothese ab, wenn die unabhängigen Stichproben

voneinander entweder nur kleiner oder entweder nur größer sind. Ein Unterschied wurde bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Effektorstatus und zytotoxisches Potential von infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten in Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen

Nierenzellkarzinome (*renal cell carcinoma*, RCC) enthalten ein starkes Infiltrat an Lymphozyten (92) (63). Dennoch werden die Tumoren nicht beseitigt. Aus Gewebeproben können regelmäßig CD8⁺-Lymphozyten isoliert werden, die nach kurzer Kultur *in vitro* zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen des Nierenzellkarzinoms aufweisen (52, 64). Da offensichtlich potentiell zytotoxische Lymphozyten am Ort des Tumors sind, aber keine Kontrolle des Tumorwachstums erfolgt, dürfte die Effektorfunktion der Lymphozyten gestört sein. Um mögliche Defekte zu identifizieren, wurden der Effektorstatus und das zytotoxische Potential von tumorinfiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten (TIL) des Nierenzellkarzinoms analysiert. Es wurden Gewebeproben von fünf verschiedenen Nierenzellkarzinomen (T1-RCC, T4-RCC, T5-RCC, T7-RCC und T8-RCC) histologisch mittels Dreifachimmunfluoreszenzfärbung auf die Expression des Granulamembranproteins 17 (GMP-17) und des Effektormoleküls Perforin in CD8⁺-Lymphozyten untersucht. Parallel dazu wurden Gewebeproben von Kontrollgeweben untersucht. Hierbei handelte es sich um ein Biopstat eines Nierentransplantats mit akuter Abstoßungsreaktion (im Folgenden als „Transplantat“ bezeichnet), sowie zwei Leberbiopstate (im Folgenden als „Leber 2935“ und „Leber 2690“ bezeichnet) mit histopathologisch nachgewiesener zellulärer Reaktivität gegen das Gewebe.

4.1.1 Nachweis lytischer Granula in Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten

Um den Effektorstatus der infiltrierten CD8⁺-Lymphozyten zu untersuchen, wurde der Antikörper gegen GMP-17 verwendet, welcher lytische Granula identifiziert. Mithilfe des Antikörpers gegen GMP-17 können naive Lymphozyten (GMP-17⁻) von reifen Effektolymphozyten (GMP-17⁺) unterschieden werden. Die Spezifität des Antikörpers gegen GMP-17 wurde an zwei zytotoxischen T-Lymphozytenklonen (ZTL Klone) JB4 und TIL26 getestet (82) (85). Nach Färbung der ZTL Klone mit den Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 wurden Aufnahmen mittels konfokaler Lasermikroskopie gemacht. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch die Aufnahme einer optischen Schnittebene von JB4. CD8 (grün) zeigt die T-Zell-

Oberfläche an und GMP-17 (rot) identifiziert die lytischen Granula im Zytoplasma (granulär punktuelle Färbung). Die T-Zellen wurden durch das Fluoreszenzsignal von CD8 identifiziert und anhand des GMP-17 in zwei Gruppen, mit bzw. ohne GMP-17-Signal, eingeteilt. Der prozentuale Anteil an doppelpositiven Zellen wurde berechnet. Insgesamt wurden 67 JB4- und 70 TIL26-Zellen analysiert. Sowohl bei der JB4-Kultur als auch bei der TIL26-Kultur exprimierten alle Zellen das GMP-17 (Abbildung 4.2, rotes Symbole für JB4 und graues Symbol für TIL26).

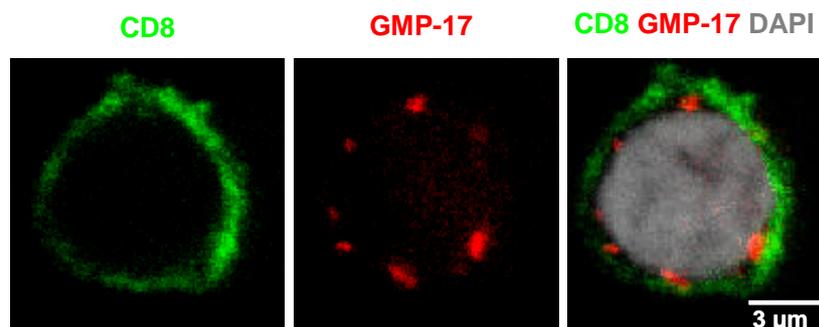


Abb. 4.1: Nachweis von CD8 und GMP-17 im ZTL Klon JB4. Doppelimmunfluoreszenzfärbung von CD8 (grün) und GMP-17 (rot) mit aufgetropften JB4. Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden Aufnahmen von einzelnen optischen Schnittebenen durchgeführt. Dargestellt ist die Aufnahme einer einzelnen optischen Schnittebene.

Gefrierschnitte von Nierenzellkarzinomen wurden analog mit Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 gefärbt und Aufnahmen (Vergrößerung 630x) von 4 bis 9 Gesichtsfelder je Gewebeschnitt gemacht. Dabei wurden pro Gewebe zwischen 101 und 254 CD8⁺-Lymphozyten bewertet und hinsichtlich der Expression von GMP-17 quantifiziert. In Abbildung 4.2 ist der prozentuale Anteil an GMP-17⁺-Zellen innerhalb der CD8⁺-Lymphozyten der untersuchten Nierenzellkarzinomgewebe dargestellt. Dabei entspricht jedes schwarze Symbol einem Gewebe. T1-RCC zeigte einen prozentualen Anteil an GMP-17⁺-Zellen von 93 % (94 GMP-17⁺-Zellen von 101 CD8⁺-Zellen), T4-RCC einen Anteil von 88 % (97 von 110 Zellen), T5-RCC einen Anteil von 96 % (117 von 122 Zellen), T7-RCC einen Anteil von 96 % (160 von 167 Zellen) und T8-RCC einen Anteil von 91 % (231 von 254 Zellen). Es ergab sich für die fünf Nierenzellkarzinome ein medianer Anteil an GMP-17⁺-Zellen von 93 % (Spannweite: 91% bis 97 %). Die CD8⁺-Lymphozyten der Nierenzellkarzinome hatten somit einen ähnlich hohen Anteil an GMP-17⁺-Zellen wie die Kulturen der ZTL Klone JB4 und TIL26. Offensichtlich

handelt es sich bei der Mehrheit der CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom um differenzierte Effektorzellen.

Gewebeschnitte der Kontrollgewebe wurden analog zu den Nierenkarzinomgeweben mit Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 immunhistologisch gefärbt und ausgewertet. Pro Kontrollgewebe wurden 4 bis 9 Gesichtsfelder mit insgesamt zwischen 163 und 357 CD8⁺-Lymphozyten quantifiziert (Abbildung 4.2, weiße Symbole). Beim Transplantat waren 295 der bewerteten 357 CD8⁺-Zellen GMP-17⁺ (83 %), bei der Leber 2935 waren es 147 der bewerteten 163 CD8⁺-Zellen (90 %) und bei der Leber 2690 waren es 214 der bewerteten 276 CD8⁺-Zellen (76 %). Das ergibt für die Kontrollgewebe einen medianen Anteil von 83 % (Spannweite: 76 % bis 90 %) an differenzierten CD8⁺-Lymphozyten.

Die CD8⁺-Lymphozyten der Nierenzellkarzinome zeigen somit einen etwas höheren Anteil an

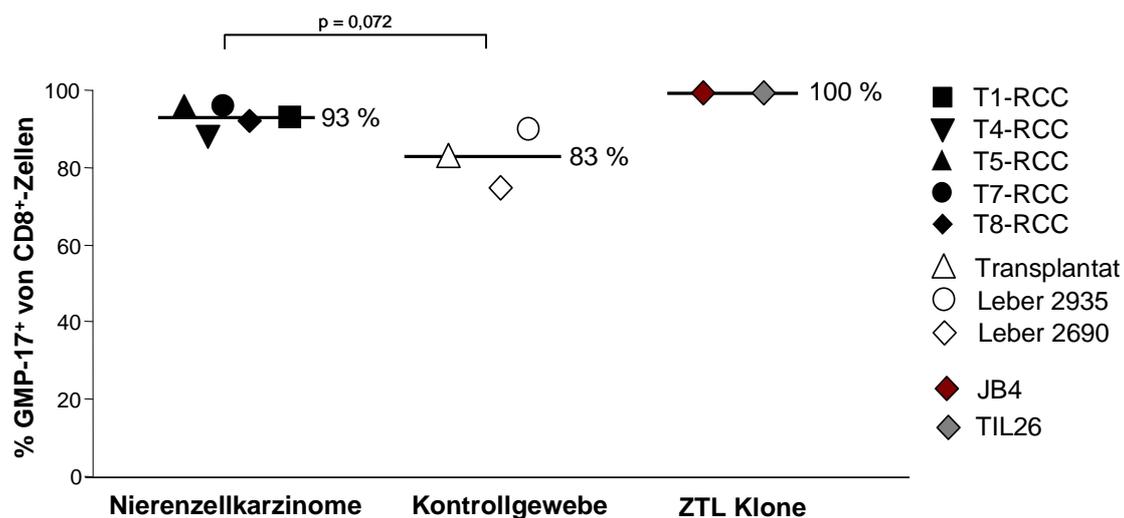


Abb. 4.2: Prozentualer Anteil GMP-17⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺-Lymphozyten. Nach Immunfluoreszenzfärbung der Gewebeschnitten von Nierenzellkarzinomen (T1-RCC, T4-RCC, T5-RCC, T7-RCC und T8-RCC) und Kontrollgeweben (Transplantat, Leber 2935 und Leber 2690) mit Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie jeweils zwischen 4 und 9 Gesichtsfelder pro Gewebe aufgenommen. Anhand der Signale für CD8 und GMP-17 wurden die CD8⁺-Zellen in eine GMP-17⁺ bzw. GMP-17⁻ Gruppe eingeteilt und der prozentuale Anteil an GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten berechnet, der graphisch dargestellt ist. Jedes Symbol entspricht einem Gewebe. Für die Analyse der ZTL Klone JB4 und TIL26 wurden diese auf Objektträger aufgetragen. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung analog den Gewebeschnitten durchgeführt und der prozentuale Anteil an GMP-17⁺CD8⁺-Zellen berechnet. T1-RCC: 93 % (94 von 101 Zellen), T4-RCC: 88 % (97 von 110 Zellen), T5-RCC: 96 % (117 von 122 Zellen), T7-RCC: 96 % (160 von 167 Zellen), T8-RCC: 91 % (231 von 254 Zellen), Transplantat: 83 % (295 von 357 Zellen), Leber 2935: 90 % (147 von 163 Zellen), Leber 2690: 76 % (214 von 276 Zellen), JB4: 100 % (69 von 69 Zellen), TIL26: 100 % (70 von 70 Zellen). Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U-Test berechnet und ist als p-Wert angegeben.

differenzierten Effektorzellen als die CD8⁺-Population der Kontrollgewebe, obwohl bei letzteren eine gewebeerstörende zelluläre Aktivität auftrat und diese bei den Nierenzellkarzinomen offensichtlich ausbliebt (p = 0,072).

4.1.2 Nachweis von Perforin in Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten

Für eine lytische Aktivität von differenzierten Effektorzellen ist unter anderem die Präsenz von Perforin notwendig. Daher wurde untersucht, ob GMP-17⁺CD8⁺-TIL Perforin aufweisen und somit in der Lage wären, Tumorzellen abzutöten. Dazu wurden Gewebeschnitte von Nierenzellkarzinomen mit Antikörpern gegen CD8, GMP-17 und Perforin gefärbt und mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Je nach Gewebe wurden zwischen 66 und 231 GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten hinsichtlich der Expression von Perforin bewertet. In den untersuchten Nierenzellkarzinomgeweben wurden Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-Zellen, aber auch solche ohne Perforin gefunden. Offensichtlich können CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom trotz der Expression von lytischen Granula kein Perforin und damit kein oder wenig lytisches Potential besitzen. Abbildung 4.3 zeigt eine Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-Zelle (oben) sowie eine CD8⁺-Zelle, die trotz Expression von GMP-17 kein Perforin aufweist (unten). Der prozentuale Anteil an Perforin⁺-Zellen innerhalb der GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten wurde berechnet und ist in Abbildung 4.4 dargestellt (schwarze Symbole). Der Tumor T1-RCC zeigte einen Anteil an Perforin⁺-Zellen von 35 % (33 Perforin⁺-Zellen von 94 GMP-17⁺CD8⁺-Zellen), T4-RCC einen Anteil von 45 % (44 von 97 Zellen), T5-RCC einen Anteil von 56 % (66 von 117 Zellen), T7-RCC einen Anteil von 73 % (116 von 160 Zellen) und T8-RCC einen Anteil von 40 % (114 von 231 Zellen) innerhalb der differenzierten CD8⁺-Lymphozyten. Der Tumor T7-RCC weist den höchsten Anteil an Perforin⁺-Zellen innerhalb der Nierenzellkarzinome auf (73 %). Für die fünf Nierenzellkarzinome ergab sich ein medianer Anteil an GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten, die Perforin exprimieren, von 45 % (Spannweite: 35 % bis 65 %).

Die GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten der Kontrollgewebe wurden ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD8, GMP-17 und Perforin hinsichtlich der Präsenz von Perforin bewertet. Der prozentuale Anteil an Perforin⁺-Zellen wurde berechnet und ist in Abbildung 4.4 dargestellt (weiße Symbole). Das Transplantat hatte einen prozentualen

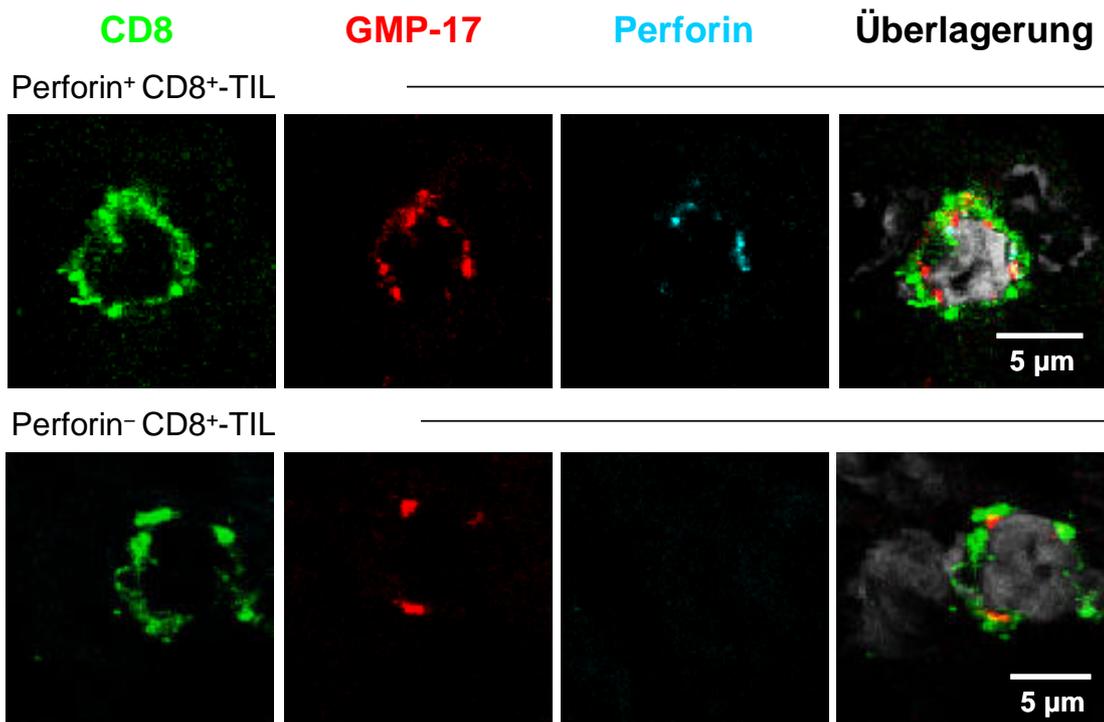


Abb. 4.3: Nachweis von Perforin in Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8⁺GMP-17⁺-Lymphozyten. Dreifachimmunfluoreszenzfärbung eines Gefrierschnittes des Nierenzellkarzinoms T8-RCC mit Antikörpern gegen CD8 (grün), GMP-17 (rot) und Perforin (blau). Die Zellkerne wurden mit DAPI (grau) gegengefärbt. Die Aufnahmen entstanden mittels konfokaler Lasermikroskopie. Dargestellt ist jeweils die Aufnahme einer einzelnen optischen Schnittebene einer Perforin⁺ (oben) und einer Perforin⁻ CD8⁺GMP-17⁺-Zelle.

Anteil an Perforin⁺-Zellen von 70 % (206 Perforin⁺-Zellen von 295 GMP-17⁺CD8⁺-Zellen), die Leber 2935 einen Anteil von 72 % (106 von 147 Zellen) und die Leber 2690 einen Anteil von 71 % (152 von 214 Zellen) innerhalb der GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten. Die Kontrollgewebe zeigten einen medianen Anteil an Perforin⁺-Zellen von 71 % (Spannweite: 70 % bis 72 %).

Die GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten der untersuchten fünf Nierenzellkarzinome zeigten keinen statistisch signifikant unterschiedlichen Anteil an Perforin⁺-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgeweben auf ($p = 0,152$). Wurde T7-RCC jedoch nicht berücksichtigt ergab sich für die vier anderen Nierenzellkarzinome ein statistisch signifikant geringerer Anteil an Perforin⁺-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgeweben ($p = 0,028$).

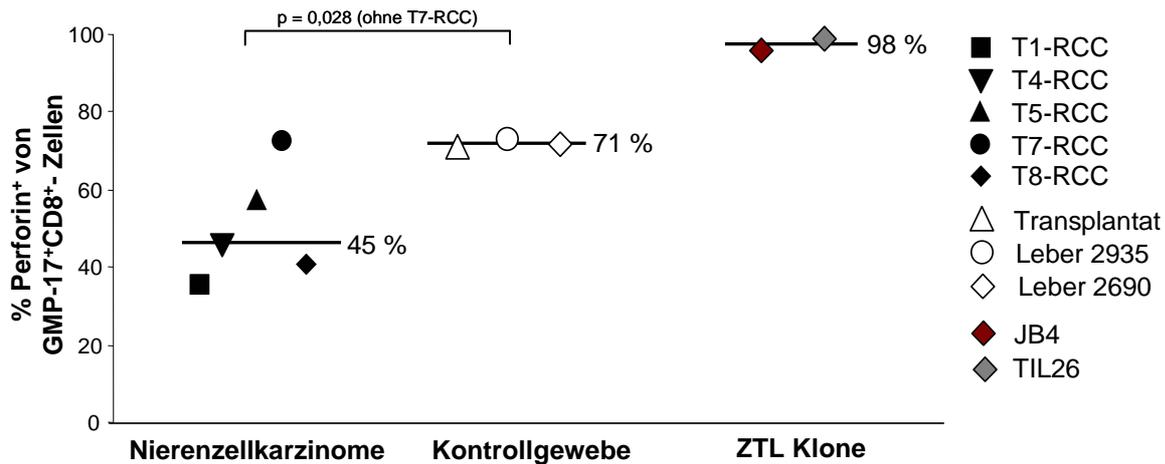


Abb. 4.4: Prozentualer Anteil Perforin⁺-Zellen innerhalb der GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten. Nach Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten aus Nierenzellkarzinomen (T1-RCC, T4-RCC, T5-RCC, T7-RCC und T8-RCC) und Kontrollgeweben (Transplantat, Leber 2935 und Leber 2690) mit Antikörpern gegen CD8, GMP-17 und Perforin wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie jeweils zwischen 4 und 9 Gesichtsfelder pro Gewebe aufgenommen. Anhand der Signale für CD8, GMP-17 und Perforin wurden die GMP-17⁺CD8⁺-Zellen in eine Perforin⁺ bzw. Perforin⁻ Gruppe eingeteilt und der prozentuale Anteil an Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten berechnet, der graphisch dargestellt ist. Jedes Symbol entspricht einem Gewebe. Für die Analyse der ZTL Klone JB4 und TIL26 wurden diese auf Objektträger aufgetragen. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung analog den Gewebeschnitten durchgeführt und der prozentuale Anteil an Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-Zellen berechnet. T1-RCC: 35 % (33 von 94 Zellen), T4-RCC: 45 % (44 von 97 Zellen), T5-RCC: 56 % (66 von 117 Zellen), T7-RCC: 73 % (116 von 160 Zellen), T8-RCC: 40 % (114 von 231 Zellen), Transplantat: 70 % (206 von 295 Zellen), Leber 2935: 72 % (106 von 147 Zellen), Leber 2690: 71 % (152 von 214 Zellen), JB4: 96 % (77 von 81 Zellen), TIL26 100 % (70 von 70 Zellen). Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U-Test (einseitige Alternativhypothese) berechnet und ist als p-Wert angegeben.

Beim ZTL Klon TIL26 waren alle Zellen (100 %) und beim ZTL Klon JB4 95 % der bewerteten GMP-17⁺CD8⁺-Zellen auch Perforin⁺ (Abbildung 4.4, rote Symbole für JB4 und graue Symbole für TIL26). Der Anteil an Perforin⁺-Zellen liegt bei ZTL Klonen damit wesentlich höher als bei gewebeinfiltrierenden GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten.

4.1.3 Nachweis der Tumorzellerkennung durch CD8⁺-Lymphozyten

Um zu untersuchen, ob im Gewebe aktive Tumorzellerkennung durch infiltrierende CD8⁺-Lymphozyten stattfindet, wurde die intrazelluläre Lokalisation von GMP-17 in den TIL analysiert. Ist eine Effektorzelle nicht in aktiver Zielzellerkennung, sollte sie eine zytoplasmatisch granuläre Lokalisation von GMP-17 aufweisen (Abbildung 4.5B). Kommt es zu

einer Zielzellerkennung, polarisieren die lytischen Granula innerhalb der T-Zelle zur Kontaktstelle mit der Zielzelle (Abbildung 4.5C). Darauf hin kommt es durch das Verschmelzen der lytischen Granula mit der Plasmamembran der Effektorzelle zur Ausbildung der lytischen Synapse (Abbildung 4.5D) und die zytotoxischen Effektormoleküle werden ausgeschüttet (19) (93) (20). Somit sollten Effektorzellen nach Zielzellerkennung ihre Granula in die Zytoplasmamembran integriert haben und eine synaptische Lokalisation des GMP-17 aufweisen. Diese sollte durch eine Kolo­kalisierung von GMP-17 mit dem Plasmamembranmolekül CD8 nachweisbar sein.

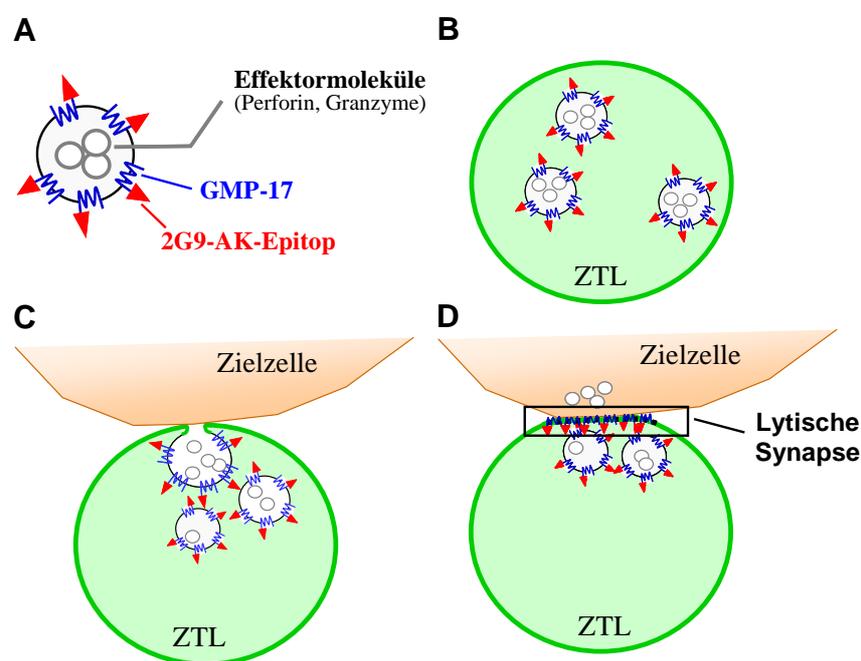


Abb. 4.5: Postulierte räumliche Verteilung der lytischen Granula innerhalb einer ZTL während der Ausbildung der lytischen Synapse bei Zielzellerkennung. **A.** Schematische Darstellung eines lytischen Granula mit Effektormolekülen und GMP-17. Das GMP-17-Epitop, welches von dem Antikörper 2G9 erkannt wird, ist als rotes Dreieck markiert. **B.** ZTL ohne Zielzellerkennung mit diffuser Verteilung der GMP-17⁺ Granula im Zytoplasma. **C.** Polarisierte Ausrichtung der Granula zur Zielzellkontaktstelle. **D.** Fusion der Granulamembran mit der T-Zell-Plasmamembran bei der es zur Ausschüttung der Effektormoleküle kommt. Die Region der Membranfusion wird als lytische Synapse bezeichnet. Durch Fluoreszenzdoppelfärbung mit Antikörpern gegen GMP-17 und CD8 sollte sich die genaue Lokalisation der Granula innerhalb der ZTL mittels konfokaler Lasermikroskopie nachweisen lassen. Bei Fusion der Granulamembran mit der Plasmamembran ist eine Kolo­kalisierung von CD8 und GMP-17 zu erwarten, die sich als Überlagerung der Fluoreszenzkanäle von CD8 und GMP-17 dargestellt.

4.1.3.1 *In vitro* Modellsystem zum Nachweis der Tumorzellerkennung

Der postulierte Vorgang der Zielzellerkennung durch Effektorlymphozyten wurde an einem Modellsystem *in vitro* geprüft. Hierbei wurde der *human leukocyte antigen* (HLA)-A2 alloreaktive ZTL Klon JB4 als Effektorzelle verwendet. JB4 wurde auf einen Zellrasen der HLA-A2⁺ Nierenzellkarzinomzelllinie RCC26 gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde in einem parallelen Ansatz die HLA-A2⁻ Nierenzellkarzinomzelllinie KT-195 als Negativkontrolle mitgeführt, da diese von JB4 nicht erkannt wird (83).

Um eine mögliche Verschmelzung der lytischen Granula mit der Zytoplasmamembran der ZTL nach Zielzellkontakt nachzuweisen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CD8 und GMP-17 durchgeführt. Die Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran der Effektorzelle bei Zielzellerkennung sollte zur Kolokalisation von GMP-17 mit CD8 führen, welche mittels konfokaler Lasermikroskopie anhand der Farbüberlagerung der für die Darstellung von CD8 und GMP-17 verwendeten Farbkanäle nachgewiesen wurde. Zur quantitativen Bewertung der Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran wurde zusätzlich das Fluoreszenzintensitätsprofil der Signale für CD8 und GMP-17 entlang einer von der T-Zell-Innenseite zur T-Zell-Außenseite gerichteten Strecke durch das Areal der Kolokalisation von GMP-17 mit CD8 erstellt. Ein Kontakt wurde erst dann als Fusion bewertet, wenn sich jenseits des Signals von GMP-17 kein CD8-Signal mehr befindet. Abbildung 4.6A zeigt exemplarisch GMP-17 mit Fusion von lytischen Granula mit der Plasmamembran nach Kontakt von JB4 mit RCC26. Das Oberflächenmembranprotein CD8 ist dabei grün und das Granulaprotein GMP-17 rot dargestellt. Die Verschmelzung von GMP-17 mit der Plasmamembran wird durch die gelb-orange Farbüberlagerung von CD8 mit GMP-17 an der Kontaktstelle der ZTL zur Tumorzelle deutlich. Die Fluoreszenzintensitätsprofile von CD8 und GMP-17 entlang der Linie durch die Kontaktstelle (Pfeil in Abbildung 4.6) überlappen und wurden als Fusionsereignis GMP-17 mit der Plasmamembran bewertet, weil rechts des GMP-17-Profiles kein CD8-Fluoreszenzsignal mehr nachweisbar ist. Abbildung 4.6B zeigt jeweils zwei JB4 in Kontakt mit KT-195. Entsprechend der definierten Kriterien handelt es sich hierbei um keine synaptische Kontakte. Obwohl sich in der unteren Abbildung eine gelbe Färbung zeigt und die Fluoreszenzprofile des GMP-17 und CD8 entlang des Pfeils zunächst überlappen, so ist entlang des Pfeils das Endsignal (rechts) lediglich CD8-Signal ohne GMP-17-Signal. Somit liegt keine Integration der lytischen Granula mit der Plasmamembran vor. Da KT-195 das von JB4

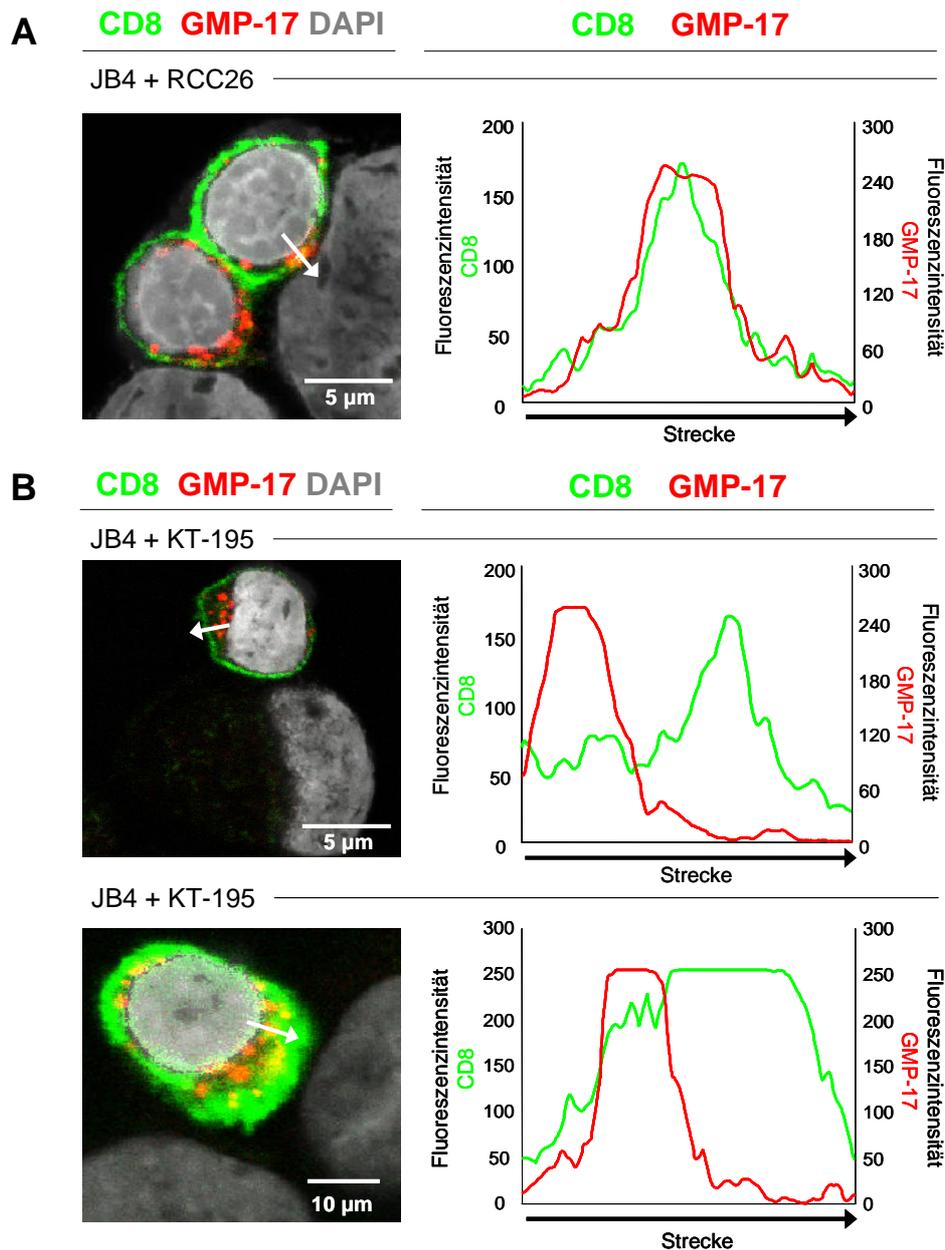


Abb. 4.6: Räumliche Verteilung des GMP-17 im ZTL Klon JB4 bei Kontakt mit RCC26 bzw. KT-195. JB4 wurde auf einen Zellrasen von RCC26 (HLA-A2⁺) bzw. KT-195 (HLA-A2⁻) gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 durchgeführt und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurde jeweils in 33 bis 37 ZTL die räumliche Verteilung des GMP-17 relativ zu CD8 ausgewertet. Dargestellt sind die Überlagerungen der drei Fluoreszenzkanäle von CD8 (grün), GMP-17 (rot) und DAPI (grau) einer optischen Schnittebene. Die Abbildung in A zeigt eine ZTL in Kontakt mit RCC26, in der GMP-17 an der Kontaktstelle in die Plasmamembran integriert ist. Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale von CD8 und GMP-17 führt an der Kontaktstelle zu einer sich in gelb-orange darstellenden Mischfarbe. Die Kolokalisation des GMP-17 mit CD8 zeigt sich zusätzlich im Fluoreszenzprofil (rechtes Diagrammes) entlang der Linie durch die Plasmamembran an der Tumorkontaktstelle (Pfeile) als Überlagerung der Fluoreszenzintensitätskurven von GMP-17 und CD8. Die beiden Abbildungen in B zeigen jeweils eine ZTL in Kontakt mit KT-195 mit zytoplasmatisch granulärer Lokalisation des GMP-17. Das Fluoreszenzintensitätsprofil entlang des Pfeils in der oberen Abbildung zeigt keine Überlagerung der Fluoreszenzintensitätskurven von GMP-17 und CD8. Die unter Abbildung zeigt ein Beispiel teilweiser Überlagerung der Fluoreszenzintensitätskurven von GMP-17 und CD8 entlang des Pfeils. Dennoch ist hier GMP-17 nicht in die Plasmamembran integriert, da das Signal von CD8 noch jenseits des Signals von GMP-17 liegt.

erkennende Molekül nicht besitzt, stellt KT-195 für JB4 keine Zielzelle dar. Nach Kontakt von JB4 mit KT-195 sollte sich daher auch keine lytische Synapse ausbilden. RCC26 dagegen stellt für JB4 eine Zielzelle dar und der Nachweis lytischer Synapsen ist zutreffend. Somit können mit den definierten Kriterien Kontakte mit lytischer Zielzellerkennung von solchen ohne Erkennung unterschieden werden. Eine Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran kann daher durch die postulierten Kriterien nachgewiesen werden.

Es wurden insgesamt 33 bis 36 JB4 pro Tumorzelllinie (RCC26 bzw. KT-195) ausgewertet. Nach 30-minütiger Kokultur wiesen 39 % der JB4 (14 der bewerteten 36 Zellen), die auf einen Zellrasen von RCC26 (HLA-A2⁺) gegeben wurden, wiesen eine membranständige synaptische Lokalisation von GMP-17 auf. Dagegen zeigten nur 9 % der JB4 (3 Zellen von 33 bewerteten Zellen), die auf einen Zellrasen von KT-195 (HLA-A2⁻) gegeben wurden, eine synaptische Lokalisation des GMP-17. In Abbildung 4.7 ist der prozentuale Anteil an JB4 mit synaptischem GMP-17 bei Kontakt mit RCC26 bzw. KT-195 graphisch dargestellt. In gleicher Vorgehensweise wurden zwei weitere ZTL Klone (TIL26 und TyrF8) analysiert und bestätigten dass Ergebnis.

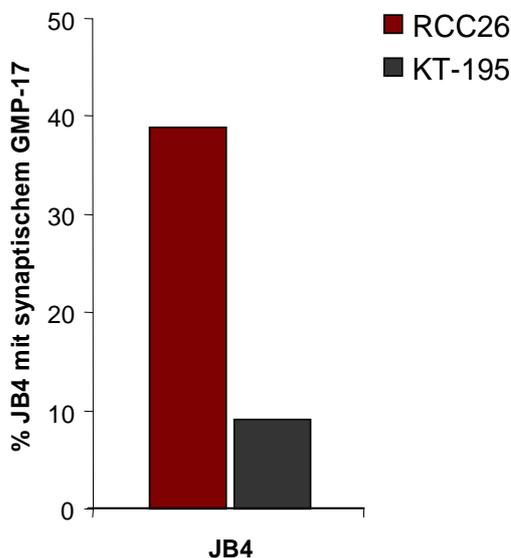


Abb. 4.7: Prozentualen Anteil an JB4 mit einer lytischen Synapse nach Inkubation mit RCC26 bzw. KT-195. Die ZTL Klon JB4 wurde jeweils für 30 min auf einen Zellrasen mit RCC26 (HLA-A2⁺) bzw. KT-195 (HLA-A2⁻) gegeben. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 durchgeführt. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden die ZTL, die sich in Kontakt mit einer Tumorzelle befanden, auf die Lokalisation von GMP-17 analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an JB4, der eine lytischen Synapse aufweist. JB4 auf RCC26: 39 % (14 Zellen von 36 Zellen), KT-195: 9 % (3 Zellen von 33 Zellen).

Das Ergebnis des Modellsystems zeigt, dass anhand der synaptischen Lokalisation des GMP-17 eine Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran und damit ein durch Zielzellerkennung ausgelöster Degranulationprozess in CD8⁺-T-Lymphozyten nachweisbar ist.

4.1.3.2 Nachweis der Tumorzellerkennung durch infiltrierende CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinomgewebe

Entsprechend dem *in vitro* Modellsystem wurden Gewebeschnitte von Nierenzellkarzinomen und Kontrollgeweben immunhistologisch gefärbt und die Lokalisation von GMP-17 in CD8⁺-Lymphozyten bestimmt. Abbildung 4.8 zeigt exemplarisch zwei CD8⁺-Zellen, eine mit Überlagerung (oben) und eine ohne Überlagerung (unten) der Signale von CD8 und GMP-17. Insgesamt wurden pro Gewebe zwischen 94 und 295 GMP-17⁺CD8⁺-Zellen bewertet und in Zellen mit synaptischem GMP-17 und Zellen ohne synaptischem GMP-17 eingeteilt. Die Zellen mit synaptischem GMP-17 stellen im Tumor T1-RCC einen Anteil von 34 % (32 von 94 Zellen), in T4-RCC einen Anteil von 48 % (47 von 97 Zellen), T5-RCC einen Anteil von 33 % (39 von 117 Zellen), T7-RCC einen Anteil von 44 % (71 von 160 Zellen) und T8-RCC 30 % (68 von 229 Zellen). Für die fünf untersuchten Nierenzelltumoren ergibt sich ein medianer prozentualer Anteil an CD8⁺-Lymphozyten mit synaptischem GMP-17 von 34 % (Spannweite: 30 % bis 44 %).

Die Bewertung der GMP-17-Lokalisation ergab, dass sich zahlreiche Nierenzellkarzinom-infiltrierende CD8⁺-Lymphozyten Kolokalisation von GMP-17 mit CD8 zeigten und sich somit entsprechend dem *in vitro* Modellsystem mit in einem durch Tumorzellerkennung ausgelösten Degranulationsprozess befinden.

In den Gewebeschnitten des Transplantats wurde ein Anteil an CD8⁺-Zellen mit synaptischem GMP-17 von 43 % (126 von 295 Zellen), in der Leber 2935 von 46 % (68 von 147 Zellen) und in der Leber 2690 von 52 % (111 von 214 Zellen) detektiert (Abbildung 4.9, weiße Symbole).

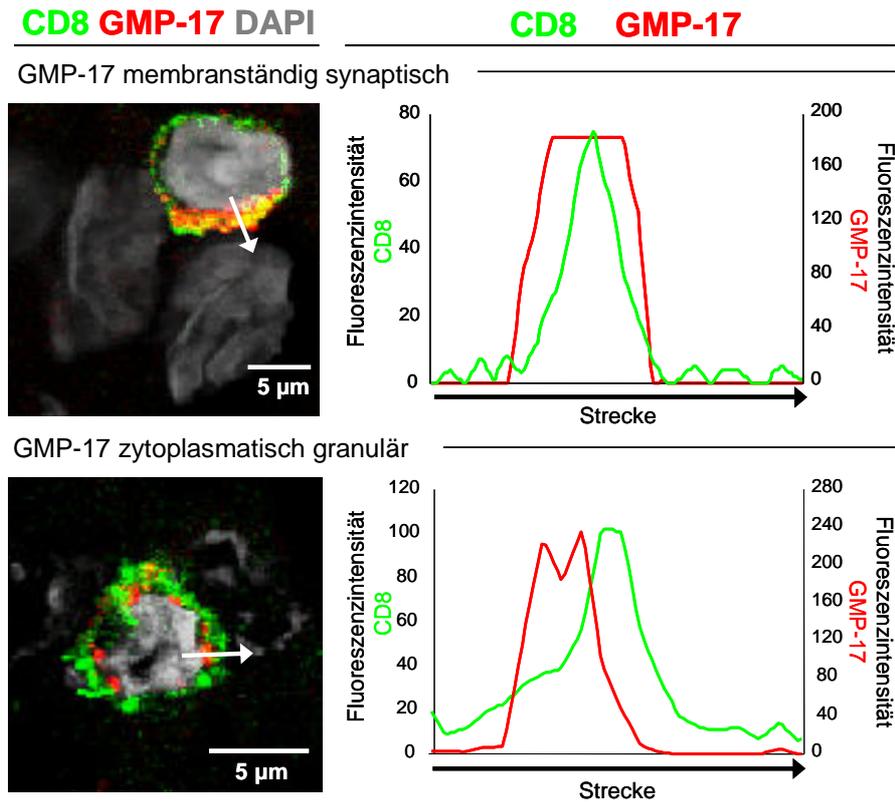


Abb. 4.8: Räumliche Verteilung des GMP-17 in Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten. Nach Immunfluoreszenzfärbung eines Gefrierschnittes des Nierenzellkarzinoms T8-RCC mit Antikörpern gegen CD8 (grün) und GMP-17 (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (grau), wurden Aufnahmen mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt. Dargestellt sind die Überlagerungen der Fluoreszenzsignale von CD8, GMP-17 und DAPI einer optischer Schnittebene (links). Kolokalisation von GMP-17 mit CD8 ergibt eine gelb-orange Mischfarbe. Die obere Abbildung zeigt eine CD8⁺-Zelle mit zur Tumorkontaktstelle ausgerichtetem GMP-17. Hier zeigt sich auch die gelb-orange Mischfarbe. Die untere Abbildung zeigt eine CD8⁺-Zelle mit zytoplasmatisch granulärer Lokalisation des GMP-17 (keine gelb-orange Mischfarbe). Auf der rechten Seite sind Fluoreszenzintensitätsprofile von CD8 (grün) und GMP-17 (rot) entlang den Pfeilen dargestellt.

Betrachtet man die Tumorzellen differenzierter, so zeigten sich zwei Gruppen: T1-RCC, T5-RCC und T8-RCC mit einem Anteil an synaptischen GMP-17⁺-Zellen unter 35 % und T4-RCC und T7-RCC mit einem Anteil an diesen Zellen über 35 %. T4-RCC und T7-RCC liegen mit 44 % bzw. 47 % im Bereich der Kontrollgewebe. Dagegen lagen die restlichen Tumoren unter den Kontrollgeweben, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ($p = 0,1$). Insgesamt als Gruppe zeigten die fünf Tumoren ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zum Kontrollgewebe ($p = 0,25$).

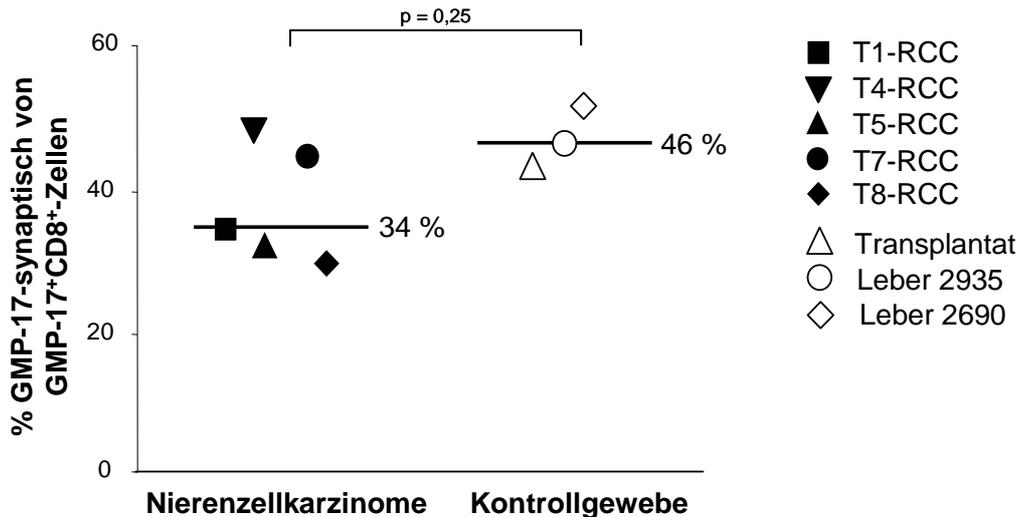


Abb. 4.9: Prozentualer Anteil der CD8⁺-Lymphozyten mit synaptischer Lokalisation des GMP-17 innerhalb der GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten. Nach Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten aus Nierenzellkarzinomen (T1-RCC, T4-RCC, T5-RCC, T7-RCC und T8-RCC) und Kontrollgeweben (Transplantat, Leber 2935 und Leber 2690) mit Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie jeweils zwischen 4 und 9 Gesichtsfelder aufgenommen. Anhand der Signale für CD8 und GMP-17 wurden die GMP-17⁺CD8⁺-Zellen in Gruppen mit und ohne membranständiger synaptischer Lokalisation des GMP-17 eingeteilt und der prozentuale Anteil an Zellen mit lytischer Synapse berechnet, der graphisch dargestellt ist. Jedes Symbol entspricht einem Gewebe. T1-RCC: 34 % (32 von 94 Zellen), T4-RCC: 48 % (47 von 97 Zellen), T5-RCC: 33 % (39 von 117 Zellen), T7-RCC: 44 % (71 von 160 Zellen), T8-RCC: 30 % (68 von 229 Zellen), Transplantat: 43 % (126 von 295 Zellen), Leber 2935: 46 % (68 von 147 Zellen), Leber 2690: 52 % (111 von 214 Zellen). Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U-Test berechnet und ist als p-Wert angegeben.

4.1.4 Nachweis von Perforin in CD8⁺-Lymphozyten mit synaptischem GMP-17

Der Nachweis von CD8⁺-TIL mit synaptischer Lokalisation des GMP-17 lässt darauf schließen, dass in den Nierenzellkarzinomen Tumorzellerkennung stattfindet. Um Tumorzellen lysieren zu können, müssen diese CD8⁺-Lymphozyten lytische Effektormoleküle besitzen. Ein für den lytischen Prozess wichtiges Effektormolekül ist das Perforin. Perforin liegt in den lytischen Granula gespeichert vor und wird bei der Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran der Effektorzelle in die Zielzelle übertragen. Zusätzlich zur Beurteilung der räumlichen Lokalisation des GMP-17 wurde in den Geweben daher auch die Präsenz von Perforin in den CD8⁺-Lymphozyten mit synaptischem GMP-17 bestimmt. Abbildung 4.10 zeigt den prozentualen Anteil an Perforin⁺-Zellen von den CD8⁺-Zellen mit synaptischem GMP-17 der

Tumoren an (schwarze Symbole). In den untersuchten Nierenzellkarzinomen ergab sich im Medianen ein Anteil an Perforin⁺-Zellen innerhalb der CD8⁺-Zellen mit synaptischem GMP-17 von 69 % (Spannweite: 59 % bis 82 %). T1-RCC hatte einen Anteil an diesen Zellen von 69 % (22 von 32 Zellen), T4-RCC einen Anteil von 64 % (30 von 47 Zellen), T5-RCC einen Anteil von 77 % (29 von 38 Zellen), T7-RCC einen Anteil von 82 % (58 von 71 Zellen) und T8-RCC einen Anteil von 59 % (40 von 68 Zellen).

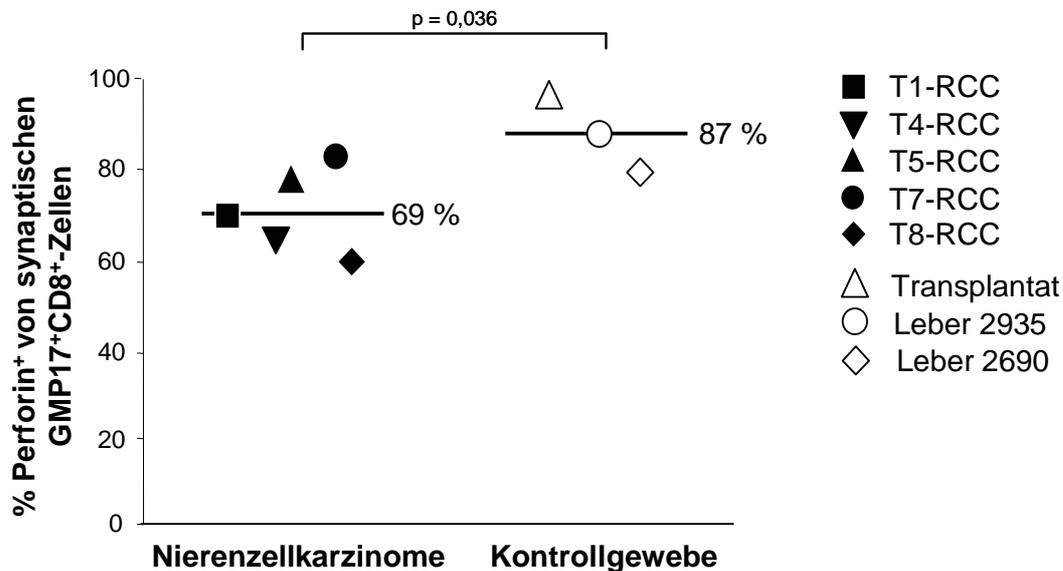


Abb. 4.10: Prozentualer Anteil an Perforin⁺ Zellen von CD8⁺-Lymphozyten mit synaptischem GMP-17. Nach Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten aus Nierenzellkarzinomen (T1-RCC, T4-RCC, T5-RCC, T7-RCC und T8-RCC) und Kontrollgeweben (Transplantat, Leber 2935 und Leber 2690) mit Antikörpern gegen CD8, GMP-17 und Perforin wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie jeweils zwischen 4 und 9 Gesichtsfelder aufgenommen. Anhand der Signale für CD8, GMP-17 und Perforin wurden die CD8⁺-Zellen mit synaptischem GMP-17 in Perforin⁻ und Perforin⁺ Gruppen eingeteilt und der prozentuale Anteil an Perforin⁺ Zellen berechnet, der graphisch dargestellt ist. Jedes Symbol entspricht einem Gewebe. T1-RCC: 69 % (22 von 32 Zellen), T4-RCC: 64 % (30 von 47 Zellen), T5-RCC: 77 % (29 von 38 Zellen), T7-RCC: 82 % (58 von 71 Zellen), T8-RCC: 59 % (40 von 68 Zellen), Transplantat: 94 % (119 von 126 Zellen), Leber 2935: 87 % (59 von 68 Zellen), Leber 2690: 78 % (87 von 111 Zellen). Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U-Test (einseitige Alternativhypothese) berechnet und ist als p-Wert angegeben.

Das Transplantat zeigte einen Anteil von 94 % (119 von 126 Zellen), die Leber 2935 einen Anteil von 87 % (59 von 68 Zellen) und die Leber 2690 einen Anteil von 78 % (87 von 111 Zellen). Die Kontrollgewebe zeigten einen Anteil an Perforin⁺CD8⁺-Zellen innerhalb der Zellen mit synaptischem GMP-17 von 87 % (Spannweite: 78 % bis 94 %). Die beiden Nierenzellkarzinome T5-RCC und T7-RCC liegen mit einem prozentualen Anteil an Perforin⁺-Zellen von den synaptischen GMP-17⁺CD8⁺-Zellen von 77 % bzw. 82 % innerhalb des Bereiches der Kontrollgewebe. Im Durchschnitt ist der Anteil an diesen Zellen in den Nierenzellkarzinomen jedoch statistisch signifikant niedriger als bei den Kontrollgeweben ($p = 0,036$).

4.1.5 Lytisches Reaktionsprofil der infiltrierenden GMP-17⁺CD8⁺-Effektorzellpopulation

Für eine erfolgreiche Zerstörung der Tumorzellen muss eine CD8⁺-T-Zelle gleichzeitig mindestens zwei Eigenschaften erfüllen: Tumorzellerkennung und Expression von lytischen Effektormolekülen, wie Perforin. Einer CD8⁺-Lymphozytenpopulation kann man somit ein „lytisches Reaktionsprofil“ zuweisen, indem der prozentuale Anteil von GMP-17⁺CD8⁺-Zellen, die sowohl Perforin als auch synaptisches GMP-17 besitzen, berechnet. Der Anteil dieser Zellen für die Nierenzellkarzinome und Kontrollgewebe ist in Abbildung 4.11 dargestellt (schwarze Symbole). Die Berechnung ergab für die Nierenzellkarzinom-infiltrierende GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozytenpopulation Werte zwischen 17 % und 36 % (medianer Anteil 25 %). Für T1-RCC war dies 23 % (22 von 94 Zellen), T4-RCC 31 % (30 von 97 Zellen), T5-RCC 25 % (29 von 117 Zellen), T7-RCC 36 % (58 von 160 Zellen) und T8-RCC 17 % (40 von 213 Zellen). Alle Kontrollgewebe hatten Werte um 40 % (Spannweite: 40 % bis 41 %). Für den Tumor T7-RCC ergab sich somit ein den Kontrollgeweben vergleichbarer Wert (36 %). Vergleicht man den medianen Anteil der fünf Nierenzellkarzinome mit dem der Kontrollgewebe, so zeigt sich, dass die Nierenzellkarzinom-infiltrierende CD8⁺-Lymphozytenpopulation ein deutlich geringeres lytisches Profil gegenüber den Kontrollgeweben haben ($p = 0,036$).

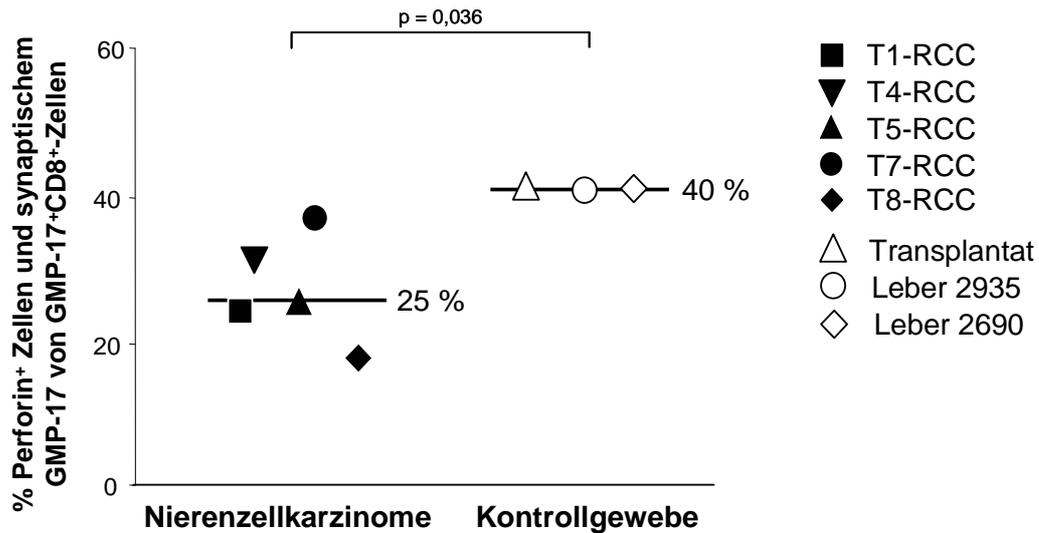


Abb. 4.11: Prozentualer Anteil an Perforin⁺-Zellen mit synaptischer Lokalisation des GMP-17 innerhalb der CD8⁺-Lymphozyten. Nach Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten aus Nierenzellkarzinomen (T1-RCC, T4-RCC, T5-RCC, T7-RCC und T8-RCC) und Kontrollgeweben (Transplantat, Leber 2935 und Leber 2690) mit Antikörpern gegen CD8, GMP-17 und Perforin wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie jeweils zwischen 4 und 9 Gesichtsfelder aufgenommen. Anhand der Signale für CD8, GMP-17 und Perforin wurden die Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-Zellen in Gruppen mit und ohne synaptischer Lokalisation des GMP-17 eingeteilt und der prozentuale Anteil an Perforin⁺ Zellen, die gleichzeitig eine lytische Synapse aufweisen, berechnet. Dieser ist graphisch dargestellt. Jedes Symbol entspricht einem Gewebe. T1-RCC: 23 % (22 von 94 Zellen), T4-RCC: 31 % (30 von 97 Zellen), T5-RCC: 25 % (29 von 117 Zellen), T7-RCC: 36 % (58 von 160 Zellen), T8-RCC: 17 % (40 von 231 Zellen), Transplantat: 40 % (119 von 295 Zellen), Leber 2935: 40 % (59 von 147 Zellen), Leber 2690: 41 % (87 von 214 Zellen). Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U-Test berechnet und ist als p-Wert angegeben.

4.1.6 Lokalisation des GMP-17 in den gewebeinfiltrierenden Perforin⁺ und Perforin⁻ GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten

Perforin⁻CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom besitzen lytische Granula, dürften aber keine oder nur sehr geringe lytische Kapazität aufweisen. Durch Bewertung der subzellulären Lokalisation des GMP-17 wurde bestimmt, ob Perforin⁻GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten Tumorzellen erkennen und ein Degranulationsprozess trotz Abwesenheit von Perforin stattfindet. Die im Gewebe befindlichen Perforin⁻ bzw. Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten wurden auf synaptische Lokalisation des GMP-17 bewertet. Abbildung 4.12 gibt den prozentualen Anteil an Zellen mit synaptischem GMP-17 innerhalb der Perforin⁻ bzw. Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-

Lymphozytenpopulation bei den Nierenzellkarzinome (schwarze Symbole) und den Kontrollgeweben (weiße Symbole) an.

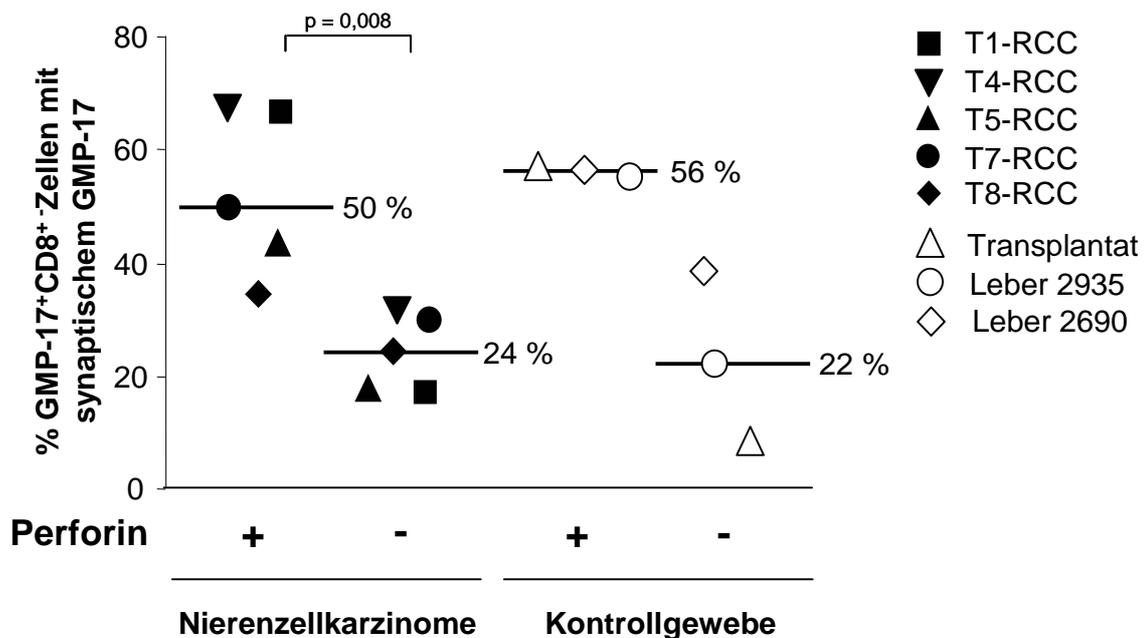


Abb. 4.12: Prozentualer Anteil an Zellen mit synaptischem GMP-17 von infiltrierenden Perforin⁺ bzw. Perforin⁻ GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten. Gewebeschnitte aus Nierenkarzinom- und Kontrollgeweben wurden immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD8, GMP-17 und Perforin gefärbt. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden jeweils 4 bis 9 Gesichtsfelder aufgenommen. Anhand der Signale für CD8, GMP-17 und Perforin wurden Perforin⁺ bzw. Perforin⁻ GMP-17⁺CD8⁺-Zellen in Gruppen mit und ohne synaptischem GMP-17 eingeteilt und der prozentuale Anteil an Zellen mit synaptischem GMP-17 berechnet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen mit synaptischem GMP-17 innerhalb von Perforin⁺ bzw. Perforin⁻-Zellen. Jedes Symbol entspricht einem Gewebe. **Perforin⁺-Zellen:** T1-RCC: 67 % (22 von 33 Zellen), T4-RCC: 68 % (30 von 44 Zellen), T5-RCC: 44 % (29 von 66 Zellen), T7-RCC: 50 % (58 von 116 Zellen), T8-RCC: 35 % (40 von 114 Zellen), Transplantat: 56 % (119 von 211 Zellen), Leber 2935: 56 % (59 von 106 Zellen), Leber 2690: 57 % (87 von 152 Zellen). **Perforin⁻-Zellen:** T1-RCC: 16 % (10 von 61 Zellen), T4-RCC: 32 % (17 von 53 Zellen), T5-RCC: 18 % (9 von 51 Zellen), T7-RCC: 30 % (13 von 44 Zellen), T8-RCC: 24 % (28 von 117 Zellen), Transplantat: 8 % (7 von 84 Zellen), Leber 2935: 22 % (9 von 41 Zellen), Leber 2690: 39 % (24 von 62 Zellen). Der horizontale Balken gibt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U-Test berechnet und ist als p-Wert angegeben.

Perforin⁻-Zellen zeigten sowohl in den Nierenzellkarzinomen als auch in den Kontrollgeweben kaum synaptische Lokalisation des GMP-17 (medianer Anteil Tumoren: 24 %, Spannweite: 16 % bis 32 %); medianer Anteil Kontrollgewebe 22 %, Spannweite: 8 % bis 39 %). Im Gegensatz dazu zeigten die Perforin⁺-Zellen einen medianen Anteil an Zellen mit synaptischem GMP-17 in den Tumoren 50 % (Spannweite: 35 % und 68 %) und in dem Kontrollgeweben 56 % (Spannweite: 56 % bis 57 %). Perforin⁻-Zellen haben offensichtlich deutlich weniger lytische Synapsen als Perforin⁺-Zellen. Der Unterschied im Anteil an Zellen mit synaptischem GMP-17 zwischen Perforin⁻ und Perforin⁺ GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten ist bei den Nierenzellkarzinomen statistisch signifikant ($p = 0,008$). Die funktionelle Kapazität Perforin⁻-Lymphozyten wird in Kapitel 4.2 mithilfe eines *in vitro* Modellsystems evaluiert.

4.2 Einfluss von Tumorzellen auf Effektormoleküle und Effektorfunktion von zytotoxischen T-Lymphozyten *in vitro*

Die Analyse der im Nierenzellkarzinom befindlichen CD8⁺-Lymphozyten anhand der Marker GMP-17 und Perforin ergab, dass nahezu alle CD8⁺-Lymphozyten Effektorzellen (GMP-17⁺) sind, aber nur etwa die Hälfte das lytische Effektormolekül Perforin exprimieren (siehe Kapitel 4.1, Abb. 4.2 und 4.4). Durchflusszytometrische Analysen von aus Nierenzellkarzinomen isolierten TIL zeigten, dass viele Zellen auch Granzym B⁻ sind, wohingegen die meisten Zellen Granzym A besaßen (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). Diese Diskrepanz in der Expression der Effektormoleküle ist konträr zu den Vorgängen einer normalen Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen: Im normalen Differenzierungsprogramm der ZTL wird Granzym A zeitgleich mit Perforin induziert (40). Da die CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom Granzym A und GMP-17 besitzen, kann man davon ausgehen, dass sie das Differenzierungsprogramm zu Effektorzellen durchlaufen haben. Offensichtlich aber hat die Hälfte der CD8⁺-Lymphozyten entweder das Perforin nicht induziert oder Perforin nach der Differenzierung verloren. Mit Hilfe eines *in vitro* Modellsystems wurde untersucht, ob die Anwesenheit von Tumorzellen zum Verlust von Perforin und Granzym B führen kann. Würde gleichzeitig Granzym A erhalten bleiben, also der Phänotyp der TIL entstehen, so könnte dieser Mechanismus auch *in vivo* stattgefunden haben.

4.2.1 Verlust von Perforin in zytotoxischen T-Lymphozyten durch Tumorzellüberschuss

Um den Einfluss von Tumorzellen auf den Gehalt des zytotoxischen Effektormoleküls Perforin in ZTL zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modellsystem gewählt. Dabei wurde der ZTL Klon JB4 und die HLA-A2⁺ Nierenzellkarzinomzelllinie RCC26 als Zielzelle gewählt. Der Gehalt an Perforin in den ZTL wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Koinkubation mit den Tumorzellen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) ermittelt. Um die ZTL im Kokulturgemisch identifizieren zu können, wurden die ZTL vor Beginn der Inkubation mit den Tumorzellen mit dem lipophilen Fluoreszenzmolekül DiD markiert, der sich in die Plasmamembran von Zellen einlagert. Die DiD-Markierung zeigte keine Beeinträchtigung der Effektorfunktion der ZTL (siehe Kapitel 3.11.4). Um den Einfluss der Tumorzellzahl auf den Perforingehalt der ZTL zu bestimmen, wurde der ZTL Klon JB4 in zwei verschiedenen

Verhältnissen mit RCC26 inkubiert. Zum einen wurden gleiche Anteile der ZTL und Tumorzellen (Verhältnis 1:1, hier 1x bezeichnet) gemischt. Zum anderen wurde ein zehnfacher Tumorüberschuss (Verhältnis 10:1, hier 10x bezeichnet) verwendet, welches die *in vivo* Bedingungen des Tumormilieus besser widerspiegelt. Dabei wurde die Anzahl an ZTL und das Kulturvolumen beibehalten und die Tumorzellzahl erhöht, so dass zusätzlich zur Tumorzellzahl die Zelldichte stark erhöht war. Parallel wurden die ZTL ohne Tumorzellen inkubiert, um Veränderungen des Gehalts an Perforin unabhängig von Tumorzellen zu sehen. Die Inkubation wurden zu den Zeitpunkten zwei Stunden, sechs Stunden, 24 Stunden und 35 Stunden gestoppt, sowie gleich nach dem Start der Inkubation (null Stunden). Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden sie mit einem Perforin-spezifischen Antikörper sowie mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper einer intrazellulären FACS-Färbung unterzogen. Zu jedem Ansatz wurde parallel ein Ansatz mit einem Kontrollantikörper

mitgeführt, der denselben Isotypen wie der Perforin-spezifische Antikörper hat, jedoch keine Spezifität für Perforin besitzt. Für die Analyse des Perforingehalts in den ZTL wurden die ZTL mittels elektronischer Auswahlfenster ausgewählt. Im ersten Auswahlschritt wurde nur die kleinere Zellpopulation (Lymphozyten) anhand der geringen Vorwärtsstreuung (FSC) und der niedrigen Seitwärtsstreuung (SSC) ausgewählt (Abbildung 4.13A).

Anschließend wurden die toten Zellen anhand der Fluoreszenzintensität von 7-Aminoactinomycin D (7AAD) ausgeschlossen (Abbildung 4.13B). Des Weiteren wurden Zelldubletten ausgeschlossen und DiD⁺ Zellen ausgewählt (Abbildung 4.13C und D). Es wurde sowohl der prozentuale Anteil an Perforin⁺-T-Zellen sowie die

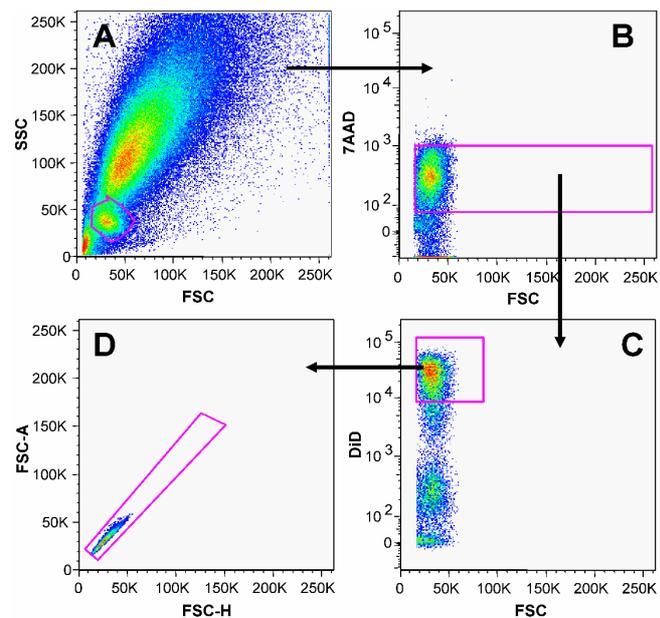


Abb. 4.13: Eingrenzung der Lymphozytenpopulation in Kokulturanalysen von ZTL mit Tumorzellen mittels elektronischer Auswahlfenster. Dargestellt ist das am Durchflusszytometer LSR II aufgenommene Zellgemisch aus ZTL und Tumorzellen. Die ZTL wurden vor Kokulturation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiD markiert. **A.** Auswahl der Lymphozytenpopulation anhand deren geringer Größe (FSC) und niedriger Granularität (SSC). **B.** Eingrenzung auf DiD⁺-Zellen. **C.** Ausschluss von toten Zellen durch Auswahl von 7AAD⁻-Zellen. **D.** Ausschluss von Dubletten anhand FSC-A- und FSC-H-Charakteristika.

mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der T-Zellen bestimmt, die den relativen Gehalt an Perforin der T-Zellpopulation angibt.

Abbildung 4.14 zeigt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Perforin in den ZTL als Histogramm mit logarithmischer Skalierung. Die jeweiligen Anteile an Perforin⁺-ZTL sowie die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von Perforin sind in den Histogrammen angegeben. Bei Kultur der ZTL ohne Tumorzellen blieb Perforin in den ZTL während der gesamten Inkubationszeit erhalten mit leichter Abnahme von Perforin⁺-Zellen gegen Ende der Inkubationszeit (97 % bei 0 h, 81 % bei 35 h). Bei Kokultur mit einer niedrigen Anzahl an Tumorzellen (1x) nahm der Gehalt an Perforin in den ZTL kontinuierlich bis sechs Stunden ab (MFI 534, MFI 359 bzw. MFI 295), was auf eine Ausschüttung des gespeicherten Perforins durch Zielzellerkennung zurückgeführt werden kann. Konsistent mit der Literatur, dass eine einzelne ZTL Perforin nicht vollständig ausschüttet, entstand dabei ein nur sehr geringer prozentualer Anteil an Perforin⁻-ZTL (25). Nach sechs Stunden stieg der Gehalt an Perforin wieder, was für eine Nachsynthese von Perforin und einem Wiederauffüllen der Granulaspeicher spricht. Wurden die ZTL mit einem Überschuss an Tumorzellen (10x) inkubiert, nahm der Gehalt an Perforin ebenfalls ab, konsistent mit Zielzellerkennung und Ausschüttung von Perforin. Im Gegensatz zu der Kokultur mit niedriger Tumorzellzahl (1x) nahm der Gehalt an Perforin in den ZTL nicht wieder zu, sondern nahm kontinuierlich ab und nach 35 Stunden Inkubation waren fast alle ZTL Perforin⁻ (7 % Perforin⁺-ZTL). Offensichtlich kann die Anwesenheit vieler Tumorzellen (10x) zum Verlust von Perforin im ZTL Klon JB4 führen, so dass eine Perforin⁻ T-Zellpopulation entsteht.

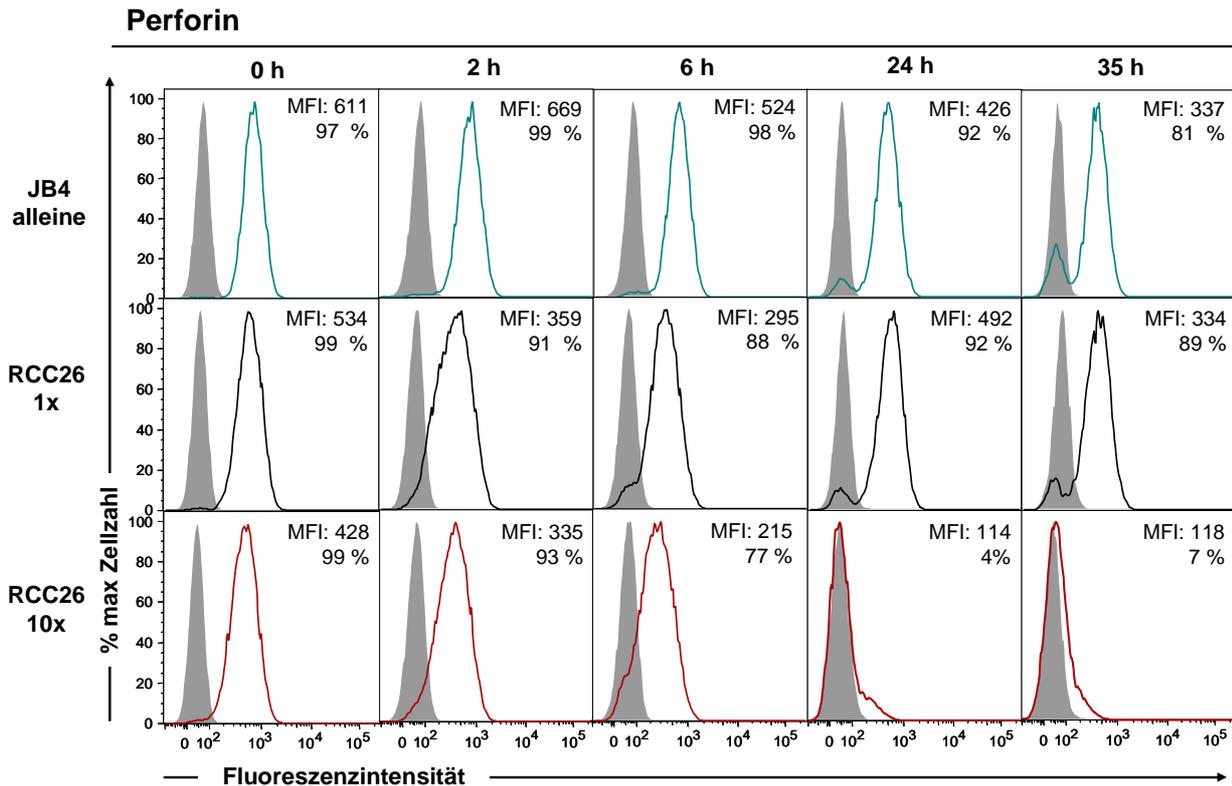


Abb. 4.14: Perforingehalt im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde alleine, mit niedriger (1x) oder hoher (10x) Zellzahl der HLA-A2⁺-Nierenzellkarzinomlinie RCC26 koinkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von Perforin als Histogramme mit logarithmischer Skalierung zu den angegebenen Zeitpunkten in den ZTL, die alleine (obere Reihe), mit niedriger (1x, mittlere Reihe) bzw. hoher Tumorzellzahl (10x, untere Reihe) inkubiert wurden. Die MFI und der prozentuale Anteil an Perforin⁺-ZTL sind im jeweiligen Histogramm angegeben. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar, dessen MFI von der spezifischen MFI abgezogen wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

Parallel zu Perforin wurde der Gehalt an Granzym A und Granzym B in den ZTL mittels spezifischer Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensitäten von Granzym A und Granzym B zu den angegebenen Zeitpunkten sind als Histogramme in Abbildung 4.15 dargestellt. Um die Veränderung des Perforingehalts in den ZTL über die Zeit mit dem Gehalt an Granzym A und Granzym B sowie die verschiedenen Kokulturen zu vergleichen, wurden die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten auf die Intensität zu Beginn der Inkubation normiert und in Abbildung 4.16 als relative Änderung gemeinsam dargestellt.

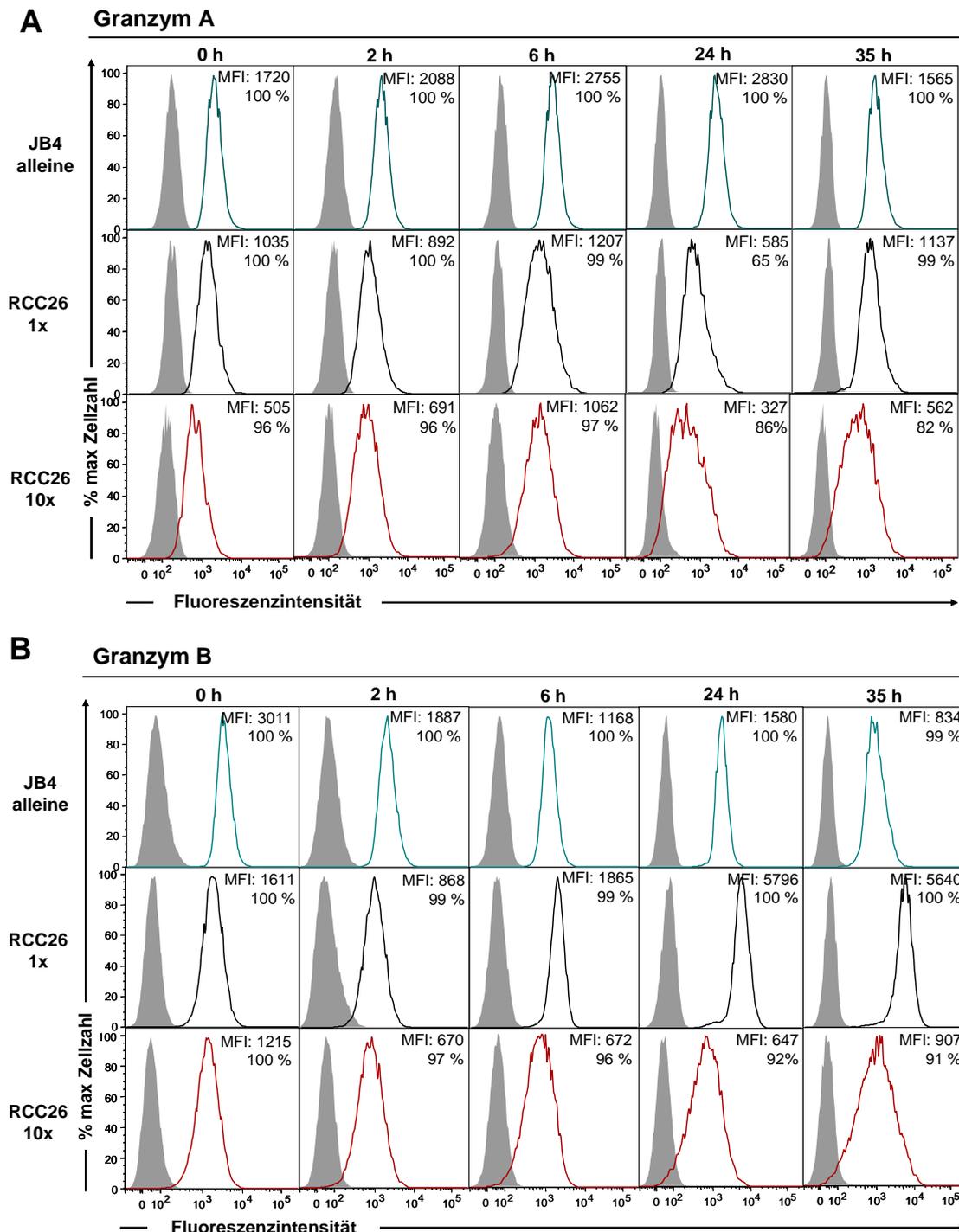


Abb. 4.15: Expression von Granzym A und Granzym B im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde alleine, mit niedriger (1x) oder hoher (10x) Zellzahl der HLA-A2⁺ Nierenzellkarzinomlinie RCC26 koinkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Granzym A und Granzym B durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von Granzym A (A) und Granzym B (B) als Histogramme mit logarithmischer Skalierung zu den angegebenen Zeitpunkten in den ZTL, die alleine (obere Reihe), mit niedriger (1x, mittlere Reihe) bzw. hoher Tumorzellzahl (10x, untere Reihe) inkubiert wurden. Die MFI und der prozentuale Anteil an Effektormolekül⁺-ZTL sind im jeweiligen Histogramm angegeben. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar, dessen MFI von der spezifischen MFI abgezogen wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

Wurden die ZTL mit einer niedrigen Zellzahl an RCC26 (1x) inkubiert, nahm der Gehalt an Perforin und Granzym B in den ZTL über die ersten zwei Stunden um die Hälfte ab (relative MFI von 1,0 auf 0,5, Abbildung 4.14, schwarze Symbole), was auf eine gemeinsame Ausschüttung der beiden Proteine durch Zielzellerkennung entspricht. Bis sechs Stunden nahm der Perforingehalt weiterhin ab, während Granzym B drastisch anstieg und nach 24 Stunden das Vierfache des Ausgangswertes erreichte. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in den ZTL durch die Zielzellerkennung eine starke Neusynthese von Granzym B induziert wird. Der Perforingehalt in den ZTL stabilisierte sich nach 35 Stunden Koinkubation um einen Wert etwas unterhalb des Ausgangswertes. Der Gehalt an Granzym A in den ZTL blieb während der Inkubation der ZTL mit einer niedrigen Anzahl an RCC26 (1x) über die Inkubationszeit weitgehend konstant und der prozentuale Anteil an Granzym A⁺-ZTL blieb bei annähernd 100 %.

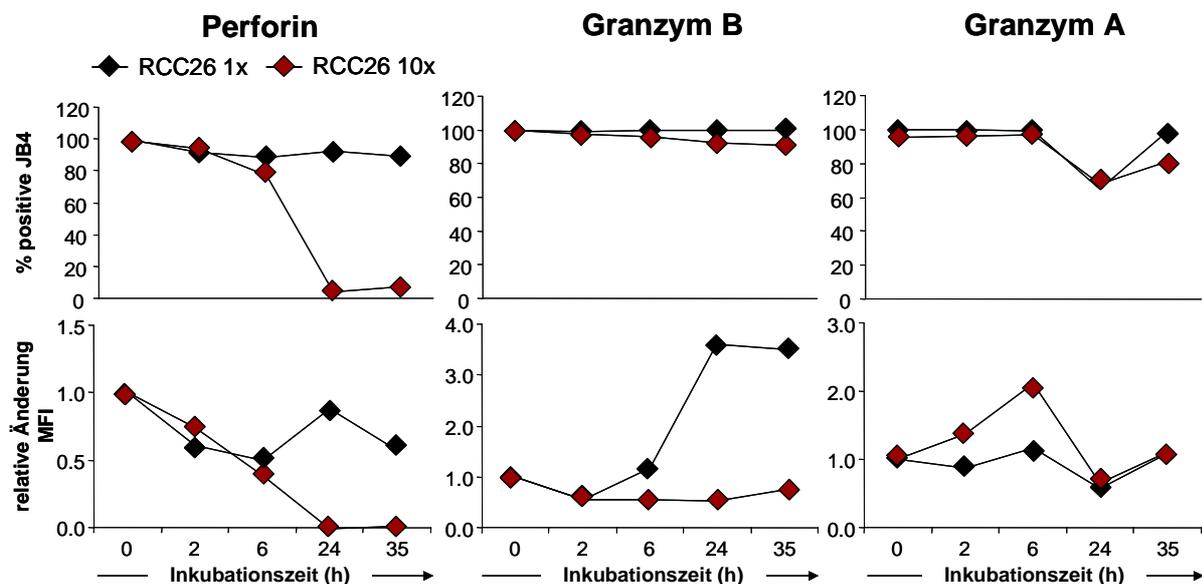


Abb. 4.16: Anteil an Perforin⁺-, Granzym A⁺- und Granzym B⁺-Zellen sowie die relative Änderung des Gehalts an Effektormolekülen im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde mit niedriger (RCC26 1x, schwarz) bzw. hoher (RCC26 10x, rot) Zellzahl der HLA-A2⁺-Nierenzellkarzinomzelllinie RCC26 koinkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin, Granzym A und Granzym B durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Effektormolekül⁺-ZTL (obere Reihe) sowie die Änderung der MFI von Perforin (links), Granzym A (rechts) und Granzym B (Mitte) zu den angegebenen Zeitpunkten normiert auf den Ausgangswert bei 0 h (untere Reihe). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

Wurden die ZTL mit einem zehnfachen Überschuss an Tumorzellen (10x) kultiviert, nahm der Gehalt an Perforin und Granzym B in den ZTL über die ersten zwei Stunden ab (Abbildung 4.14, rote Symbole). Anders als bei der Kokultur mit niedriger Tumorzellzahl (1x) nahm Perforin in den ZTL weiterhin ab, so dass ab 24 Stunden Koinkubation wie bereits erwähnt keine Perforin⁺-ZTL mehr vorhanden waren. Die ZTL blieben nach wie vor Granzym B⁺, allerdings blieb die Induktion der Synthese von Granzym B aus. Bei hoher Tumorzellzahl (10x) erhalten ZTL das Signal Granzym B auszuschütten, aber entgegen der Beobachtung bei niedriger Tumorzellzahl (1x) bleibt bei hoher Tumorzellüberschuss die Neusynthese von Granzym B aus. Der Gehalt an Granzym A in den ZTL zeigte über den zeitlichen Verlauf keine wesentlichen Änderungen.

Der Verlust von Perforin in ZTL durch Koinkubation mit einem Überschuss an Tumorzellen wurde auch mit andern Tumorzelllinien (Melanomzelllinie Mel624.38 und hämatopoetische Zelllinie K-562-A2) bestätigt und ist kein alleiniges Charakteristikum von Nierenzellkarzinomzelllinien. In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse der Kokultur des ZTL Klons JB4 mit der HLA-A2⁺-Melanomzelllinie Mel624.38 gezeigt. Für Perforin ergab sich ein identisches Bild mit Abnahme des Gehalts an Perforin innerhalb der ZTL und Abnahme des prozentualen Anteils an Perforin⁺-ZTL bei Tumorüberschuss (Abbildung 4.17, gelbe Symbole). Bei Granzym B zeigte sich bei Tumorüberschuss keine Abnahme des Gehalts, sondern es kam gleich zu einem Anstieg. Möglicherweise ist die Nachsynthese von Granzym B in ZTL bei Koinkubation mit Mel624.38 schneller als bei Koinkubation mit RCC26. Bei Tumorüberschuss (10x) blieb ebenfalls, wie bei Koinkubation mit RCC26 beobachtet, die starke Induktion des Gehalts an Granzym B nach sechs Stunden Koinkubation aus. Granzym A zeigte wiederum keine wesentlichen Änderungen. Die ZTL blieben während der gesamten Koinkubation zu 100 % Granzym A⁺ sowie Granzym B⁺.

Die Analyse des Gehalts an Effektormolekülen in ZTL nach Kokultur mit Tumorzellen zeigte in Anwesenheit einer hohen Tumorzellzahl, dass Perforin⁻-ZTL entstehen. Anders als bei den TIL der Nierenzellkarzinome beobachtet, waren alle mit Tumorüberschuss kultivierten ZTL nach 35 Stunden weiterhin Granzym B⁺.

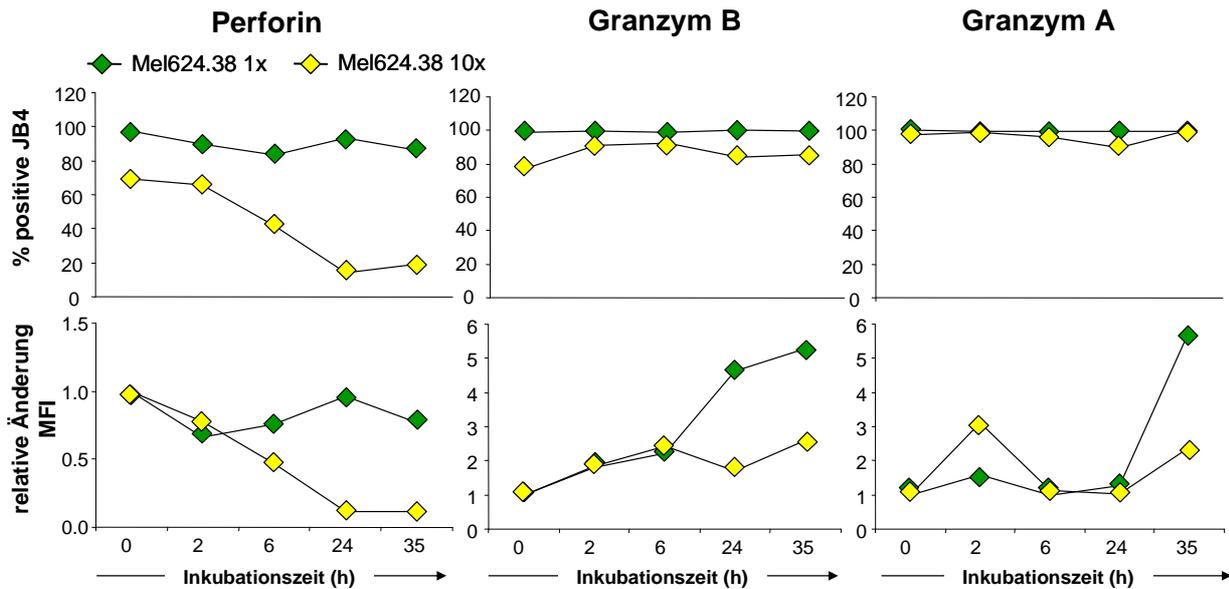


Abb. 4.17: Anteil an Perforin⁺-, Granzym A⁺- und Granzym B⁺-Zellen, sowie die relative Änderung des Gehalts an Effektormolekülen im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie Mel624.38.

Der ZTL Klon JB4 wurde mit niedriger (Mel624.38 1x, grün) oder hoher (Mel624.38 10x, gelb) Zellzahl der HLA-A2⁺-Melanomzelllinie Mel624.38 inkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin, Granzym A und Granzym B durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Effektormolekül⁺-ZTL (oben) sowie die Änderung von Perforin (links), Granzym A (rechts) und Granzym B (Mitte) zu den angegebenen Zeitpunkten der MFI normiert auf den Ausgangswert bei 0 h (unten).

4.2.2 Nachweis der Degranulation zytotoxischer T-Lymphozyten durch Stimulierung mit hoher und niedriger Tumorzellzahl

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass der ZTL Klon JB4 durch Koinkubation mit einem Überschuss der Tumorzelllinie (10x) RCC26 oder Mel624.38 Perforin⁻ wird. Um zu zeigen, ob der Perforinverlust als Folge eines durch seriellen Abtöten vieler Tumorzellen mit kontinuierlichem Entleeren der lytischen Granula erfolgt, dem ein Auffüllen der Granula nicht nachkommt, wurde während der Inkubation mit einem Überschuss an Zielzellen (10x) die Degranulation der ZTL gemessen. Hierzu wurde eine FACS-basierte Methode angewandt, bei der die zwei Proteine CD107a und CD107b auf der T-Zelloberfläche nachgewiesen werden. CD107a und CD107b sind Membranproteine der Lysosomen und daher auch Bestandteil lytischer Granula von ZTL. Kommt es bei Zielzellerkennung zur Granulaausschüttung gelangen die CD107-Moleküle an die Oberfläche der ZTL. Durch Zugabe fluoreszenzmarkierter

Antikörper gegen CD107a und CD107b während der Koinkubation mit Zielzellen werden alle auf die Oberfläche gelangten Moleküle markiert (siehe Methoden Abbildung 3.4). Die resultierende Fluoreszenzintensität der ZTL ist somit proportional zum Ausmaß der Degranulation.

Zur Kokultur von ZTL mit niedriger (1x) und hoher (10x) Zellzahl an RCC26 wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD107a und CD107b gegeben. Parallel wurde ein Ansatz mitgeführt, bei dem die ZTL mit einer niedrigen Anzahl an RCC26 aber mit Zellen der HLA-A2⁻-Tumorzelllinie KT-195 inkubiert wurden (RCC26 1x + KT-195 9x), so dass die Gesamtzellzahl dem Ansatz mit hoher Zellzahl an RCC26 (RCC26 10x) entsprach. Dies sollte klären, ob sich die zusätzliche Präsenz von Tumorzellen, die das Zielmolekül für JB4 nicht exprimieren, auf die Degranulation der ZTL auswirkt. Ebenfalls wurden die ZTL alleine ohne Tumorzellen inkubiert. Abbildung 4.18 zeigt die Fluoreszenzintensität von CD107a/b der ZTL zu Beginn und nach vier Stunden Koinkubation. Wurden die ZTL alleine inkubiert, zeigte sich eine schwache Fluoreszenzintensität von CD107a/b (MFI 40), was der spontanen Mobilisierung der lytischen Granula zu Oberfläche entspricht (94). Eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität von CD107a/b zeigte sich, wenn die ZTL mit Zielzellen (RCC26 1x) inkubiert wurden (MFI 841). Diese Zunahme war vergleichbar in den beiden Ansätzen mit niedriger Zellzahl an RCC26, unabhängig von der Präsenz von HLA-A2⁻-Tumorzellen (MFI 841 bei RCC26 1x vs. MFI 746 bei RCC26 1x + KT-195 9x). Dies zeigt, dass eine hohe Tumorzellzahl die durch Zielzellerkennung ausgelöste Degranulation nicht blockiert.

Wurden die ZTL mit einem Überschuss an RCC26 (10x) inkubiert, war die gemessene Fluoreszenzintensität höher (MFI 1025), was eine stärkere Degranulation einer einzelnen ZTL bedeutet. Somit ist denkbar, dass die ZTL bei lang andauernder Koinkubation mit einem Tumorzellüberschuss ihre Granula stärker entleeren und gegebenenfalls Perforin⁻ werden können.

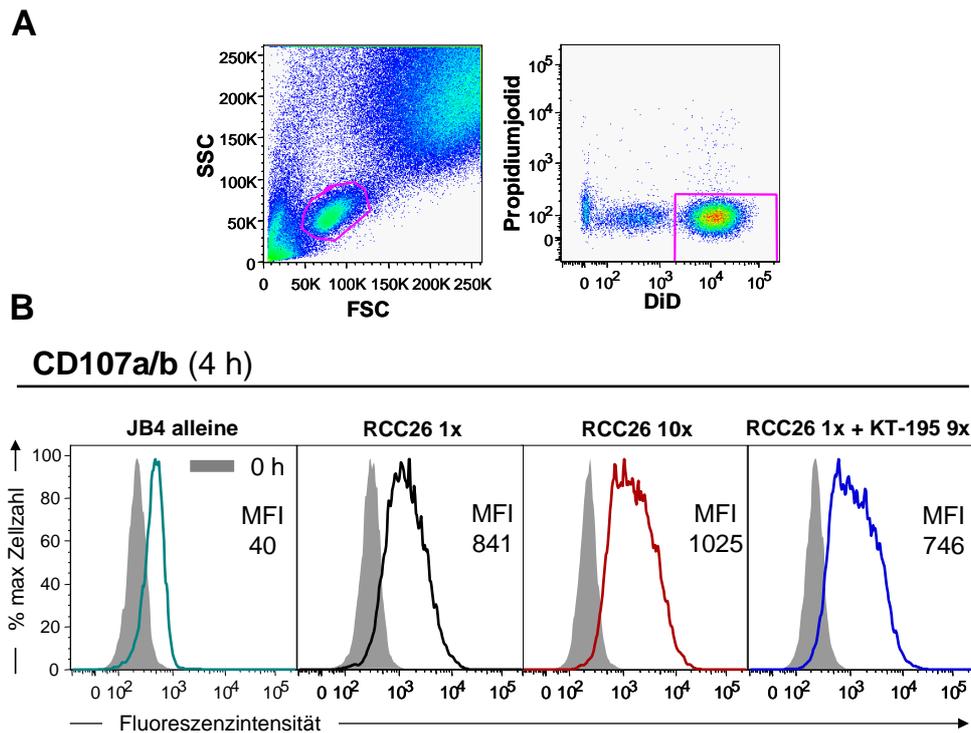


Abb. 4.18: Nachweis der CD107-Oberflächenmobilisierung von JB4 nach Zielzellerkennung. Der ZTL Klon JB4 wurde ohne oder mit den angegebenen Tumorzellen für 4 h zusammen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD107a und CD107b inkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. **A.** Darstellung der für die Analyse verwendeten Auswahlstrategie. Es wurde nur die T-Zellpopulation (links) sowie DiD⁺ lebende (Propidiumjodid⁻) ZTL (rechts) berücksichtigt. **B.** Darstellung der CD107a/b-Fluoreszenzintensitäten des ZTL Klons JB4, der ohne Tumorzellen (grün), mit niedriger (schwarz), mit hoher Zellzahl an RCC26 (rot) bzw. mit niedriger Zellzahl an RCC26 plus einem neunfachen Überschuss an KT-195 (blau) inkubiert wurde. Angegeben ist die jeweilige MFI nach 4 h Inkubation, wobei die MFI des Isotypkontrollantikörpers abgezogen ist. Die graue Kurve stellt jeweils die Intensität von CD107a /b der ZTL zum Zeitpunkt 0 h dar.

4.2.3 Modulation des Gehalts an Effektormolekülen in zytotoxischen T-Lymphozyten durch Tumorzellen unabhängig von Zielzellerkennung

Um zu zeigen, ob der Verlust des Perforins im ZTL Klon JB4 durch Zielzellerkennung und daher Stimulierung des T-Zell-Rezeptors (TZR) ausgelöst wurde, wurde die ZTL mit unterschiedlichen Mengen an Tumorzellen der HLA-A2⁻-Nierenzellkarzinomzelllinie KT-195 koinkubiert. Diese stellt für JB4 keine Zielzelle dar und stimuliert keine Degranulation des ZTL Klons JB4. Gemessene Änderungen im Gehalt an Effektormolekülen in JB4 können daher nicht auf TZR-Signal-induzierte Degranulation beruhen.

Die Fluoreszenzintensitäten von Perforin in den ZTL während der Inkubation mit KT-195 sind in Histogrammen im Anhang in Abbildung 9.1 bzw. die von Granzym A und Granzym B in Abbildung 9.2 dargestellt. Die relative Änderung des Perforins, Granzym A und Granzym B, sowie der Anteile der Effektormolekül⁺-ZTL sind in Abbildung 4.20 zusammengefasst. Bei Inkubation mit einer niedrigen Zellzahl an KT-195 (1x) nahm der Gehalt an Perforin und Granzym B während der ersten zwei Stunden der Koinkubation nicht ab, im Einklang mit dem Wissen, dass KT-195 keine Degranulation der ZTL auslöst (Vergleiche dazu Abnahme ausgelöst durch Zielzellerkennung Abb. 4.16). Der Gehalt an Perforin und Granzym B in den ZTL nahm zum Ende der Koinkubationsdauer nur leicht ab. Alle ZTL blieben über die gesamte Inkubationsdauer Perforin⁺ und Granzym B⁺. Es erfolgte keine Induktion des Granzym B, wie es bei der Koinkubation mit den HLA-A2⁺-Zelllinien RCC26 und Mel624.38 in Kapitel 4.2.1 beobachtet wurde (siehe Abb. 4.16 und Abb. 4.17). Der Gehalt an Granzym A blieb über die Koinkubationszeit konstant und alle ZTL blieben über die gesamte Inkubationsdauer zu 100 % Granzym A⁺. Wurden die ZTL hingegen mit einem zehnfachen Überschuss an KT-195 (10x) inkubiert, nahm der Gehalt an Perforin und auch der Anteil an Perforin⁺-ZTL ab einer Inkubationsdauer von zwei Stunden kontinuierlich ab, so dass nach 35 Stunden nur noch 22 % Perforin⁺-Zellen vorhanden waren. Auch nahm der Gehalt an Granzym B in den ZTL ab und es entstanden Granzym B⁻-ZTL. Granzym A wurde dagegen in den ZTL bei Koinkubation mit einem Überschuss an KT-195 induziert.

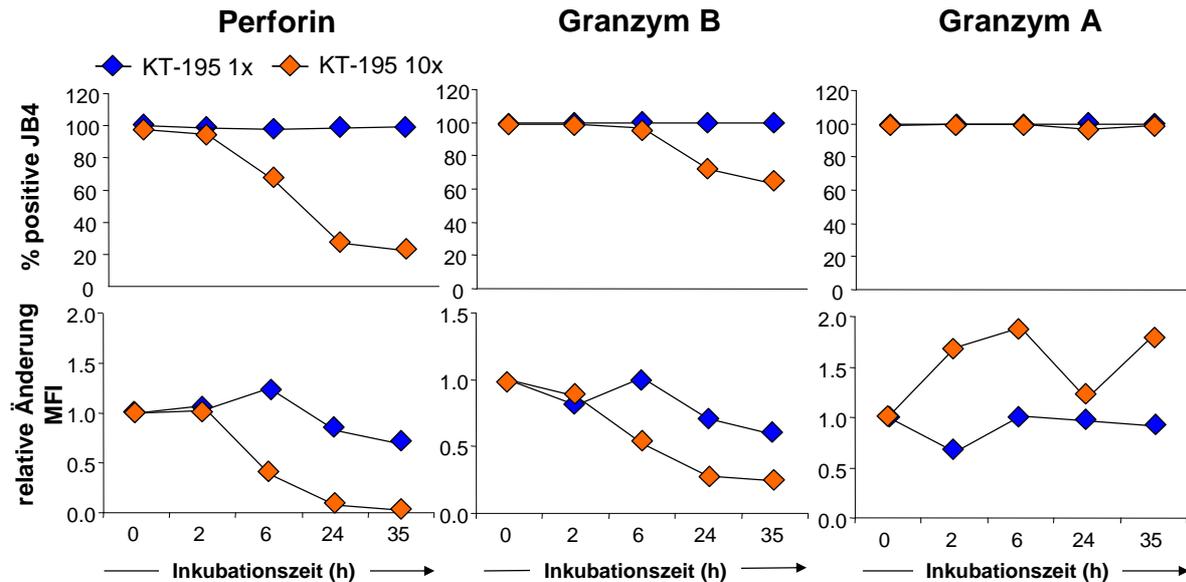


Abb. 4.19: Anteil an Perforin⁺-, Granzym A⁺- und Granzym B⁺-Zellen, sowie die relative Änderung des Gehalts im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie KT-195. Der ZTL Klon JB4 wurde mit einer niedrigen (1x, blau) bzw. hohen (10x, orange) Zellzahl der HLA-A2⁻-Nierenzellkarzinomzelllinie KT-195 koinkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin, Granzym A und B durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Effektormolekül⁺-ZTL (oben), sowie die Änderung der MFI von Perforin (links), Granzym A (rechts) und Granzym B (Mitte) zu den angegebenen Zeitpunkten normiert auf den Ausgangswert bei 0 h (unten). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

Der Perforinverlust in ZTL auch ohne TZR-Stimulierung wurde mit einer weiteren Tumorzelllinie bestätigt. Dazu wurde K-562, eine erythromyeloische Leukämiezelllinie verwendet, welche keine Haupthistokompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse I Moleküle exprimiert und für JB4 keine Zielzelle darstellt (95). Parallel dazu wurde die HLA-A2-Transfektante der Zelllinie K-562 (K-562-A2) eingesetzt, die von JB4 erkannt wird. Die Inkubation von JB4 mit der Zelllinie K-562 wurde nur mit einem zehnfachen Überschuss an Tumorzellen (K-562 10x) durchgeführt. Abbildung 4.20 zeigt, dass bei Koinkubation der ZTL mit zehnfachem Überschuss an K-562 ein Verlust des Perforins in den ZTL unabhängig von der Zielstruktur HLA-A2 erfolgte. Der Gehalt an Granzym B in den ZTL nahm ebenfalls bei Kokultur mit zehnfachem Überschuss an K-562 ab. Anhand der starken Induktion von Granzym B in den ZTL bei Kokultur mit niedriger Zellzahl an K-562-A2 lässt sich erkennen, dass die Zielstruktur HLA-A2 von JB4 erkannt wird. Die Veränderungen im

Gehalt an Granzym A in den ZTL waren bei allen drei Koinkubationen vergleichbar mit etwas höherem Gehalt an Granzym A in den ZTL bei Koinkubation mit K-562.

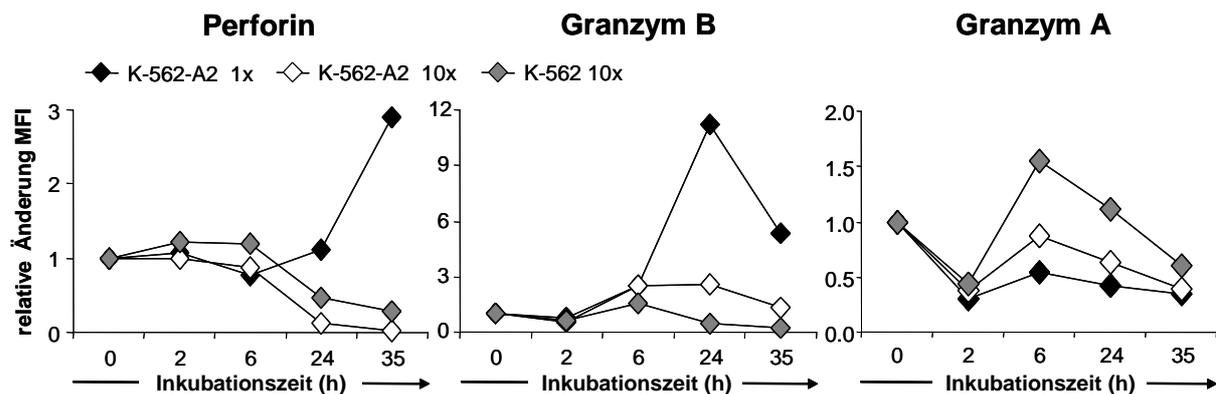


Abb. 4.20: Relative Änderung des Gehalts an Perforin, Granzym A und Granzym B im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie K-562-A2 bzw. K-562. Der ZTL Klon JB4 wurde mit niedriger (K-562-A2 1x, schwarz) oder hoher (K-562-A2 10x, weiß) Zellzahl der HLA-A2⁺ Erythroleukämie-Zelllinie K-562-A2 bzw. mit hoher Zellzahl der HLA-A2⁻ Zelllinie K-562 (K-562 10x, grau) inkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin, Granzym A und Granzym B durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die Änderung der MFI von Perforin (links), Granzym A (rechts) und Granzym B (Mitte) zu den angegebenen Zeitpunkten normiert auf den Ausgangswert bei 0 h.

Diese Beobachtungen zeigen, dass unabhängig von einer Stimulation des TZR bei Koinkubation des ZTL Klons JB4 mit einem Überschuss an Tumorzellen (10x) Perforin⁻-ZTL entstanden. Im Falle der Koinkubation von JB4 mit KT-195 entstanden sogar Granzym B⁻-ZTL, während alle ZTL Granzym A⁺ blieben. Der durch Tumorzellüberschuss induzierte Verlust von Perforin, sowie das Ausbleiben der Induktion von Granzym B bei Zielzellen, sind offensichtlich ein generelles Phänomen unabhängig vom Tumortyp. Diese Ergebnisse bestätigt wurden auch mit dem HLA-A2 restringierten Tyrosinaseptid-spezifischen ZTL Klon TyrF8 bestätigt. Dieses Experiment wurde von P. Prinz unter Anleitung durchgeführt und ist im Anhang dargestellt (Kapitel 7.4).

4.2.4 Modulation des Gehalts an RANTES in zytotoxischen T-Lymphozyten durch Inkubation mit Tumorzellen

Das Chemokin RANTES (CCL5) wird während der Entwicklung von naiven T-Lymphozyten zu reifen zytotoxischen Effektorzellen zeitgleich mit den Effektormolekülen Perforin, Granzym A und Granzym B gebildet (40). Eine weitere Gemeinsamkeit mit den Effektormolekülen besteht in der Speicherung von RANTES in speziellen intrazellulären Kompartimenten und der spezifischen Ausschüttung nach Stimulierung des TZR (42). Des Weiteren wurde gezeigt, dass RANTES zusammen mit Perforin und Granzym A von aktivierten virusspezifischen CD8⁺-T-Lymphozyten ausgeschüttet wird (41). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ZTL Klone JB4 und TyrF8 exprimieren RANTES, wohingegen Jurkat, eine CD4⁺-T-Zell-Leukämie, RANTES nicht exprimiert (Abbildung 4.21).

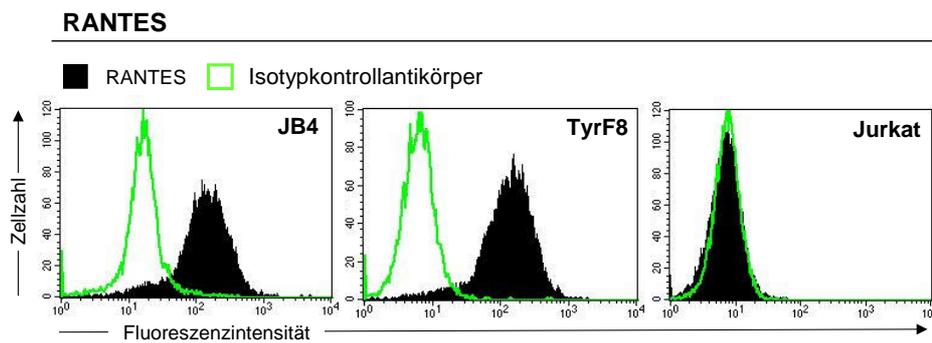


Abb. 4.21: Nachweis von intrazellulärem RANTES in den ZTL Klonen JB4 und TyrF8 sowie in der CD4⁺-Zelllinie Jurkat. JB4, TyrF8 und Jurkat wurden mit einem Antikörper gegen RANTES und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper gefärbt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität von RANTES mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von RANTES in JB4, TyrF8 bzw. Jurkat (schwarze ausgefüllte Kurven) während die grünen offenen Kurven die Intensität des Isotypantikörpers darstellen.

Wegen der Gemeinsamkeiten zwischen RANTES und den Effektormolekülen wurde auch die Modulation des Gehalts an RANTES in ZTL während der Koinkubation mit Tumorzellen untersucht. Hierbei wurde der ZTL Klon JB4 mit verschiedenen Tumorzelllinien sowie alleine über eine Zeitspanne von 35 Stunden inkubiert. Es wurden die HLA-A2⁺-Tumorzelllinien RCC26, K-562-A2 und Mel624.38, sowie die HLA-A2⁻-Tumorzelllinien KT-195 und K-562 verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten von RANTES in den ZTL während der Koinkubation

mit der Tumorzelllinie RCC26 sowie ohne Tumorzellen sind in Histogrammen in Abbildung 9.3 im Anhang dargestellt. Zur Zusammenstellung der Ergebnisse wurde die relative Änderung des Gehalts an RANTES berechnet und ist in Abbildung 4.22 dargestellt. Wurden die ZTL ohne Tumorzellen inkubiert, nahm der Gehalt an RANTES in den ZTL zu Beginn der Inkubation geringfügig ab, blieb aber weitgehend konstant mit geringfügiger Zunahme zum Ende der Inkubationszeit (Abbildung 4.22, weiße Symbole). Wurden die ZTL hingegen mit den HLA-A2⁺-Zelllinien RCC26, K-562-A2 oder Mel624.38 inkubiert (Abbildung 4.21, linke Diagramme), nahm der Gehalt an RANTES innerhalb von zwei Stunden stark ab, unabhängig vom Verhältnis der ZTL zur Tumorzelle. Diese Abnahme kann auf Ausschüttung des gespeicherten RANTES zurückzuführen sein. Während der Koinkubation der ZTL mit niedriger Tumorzellzahl (1x) stabilisierte sich der Gehalt an RANTES, wobei bei Koinkubation mit K-562-A2 der Ausgangswert sogar überschritten wurde. Wurden die ZTL mit einem Überschuss an HLA-A2⁺-Tumorzelllinien (10x) koinkubiert, nahm der Gehalt an RANTES kontinuierlich bis zum Ende der Inkubationszeit ab. Bei Koinkubation der ZTL mit der Melanomzelllinie Mel624.38 erreichte RANTES nach vorübergehender starker Abnahme wieder den Ausgangswert. Eine Steigerung von RANTES über den Ausgangswert, wie es während der

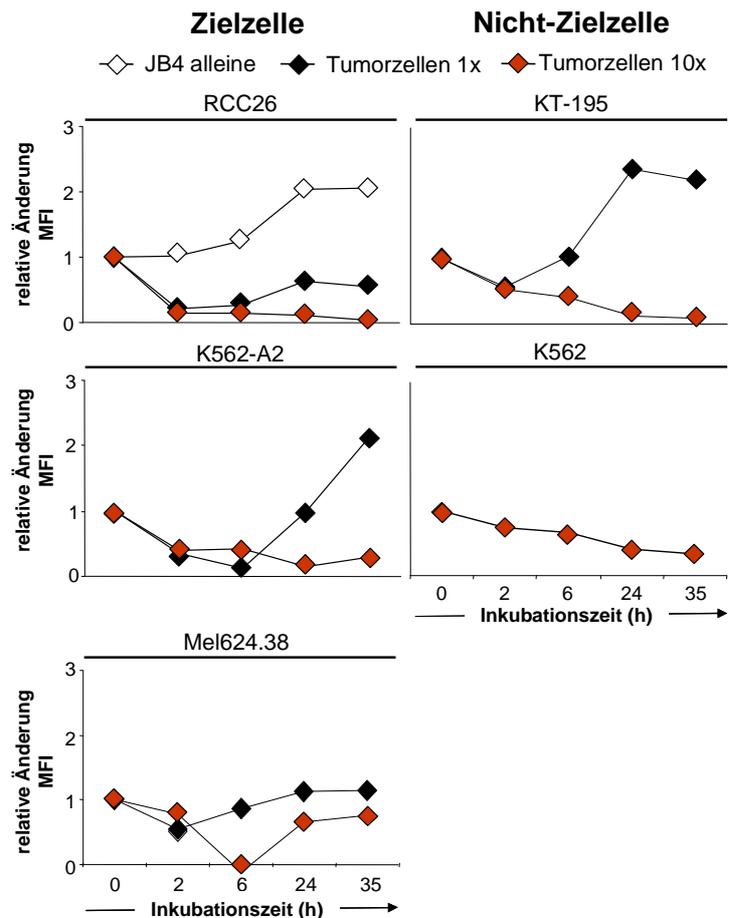


Abb. 4.22: Relative Änderung des Gehalts an RANTES im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit verschiedenen Tumorzelllinien. Der ZTL Klon JB4 wurde ohne, mit niedriger (1x, schwarz) oder hoher (10x, braun) Zellzahl an verschiedenen Tumorzellen inkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen RANTES durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die Änderung der MFI von RANTES zu den angegebenen Zeitpunkten der ZTL normiert auf den Ausgangswert bei 0 h. Gezeigt sind die Inkubationen mit der HLA-A2⁺-Tumorzelllinie RCC26, K-562-A2 und Mel624.38 bzw. mit den HLA-A2⁻-Tumorzelllinien KT-195 und K-562. JB4 wurde mit K-562 nur im Verhältnis von 1:10 (10x) inkubiert.

Koinkubation der ZTL mit niedriger Zellzahl (1x) an Mel624.38 detektiert wurde, trat aber nicht ein.

Niedrige Zellzahlen von HLA-A2⁻-Tumorzelllinien (KT-195 und K-562) induzierten nur einen geringen Abfall an RANTES innerhalb der ersten Stunden, der vermutlich auf einer spontanen Ausschüttung von RANTES beruht (Abbildung 4.21, rechte Diagramme). HLA-A2⁻-Tumorzellen im Überschuss (10x) induzierten eine kontinuierliche Abnahme des Gehalts an RANTES, so dass nach 35 Stunden nur noch sehr wenig RANTES in den ZTL vorlag.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Überschuss an Tumorzellen, unabhängig von der Präsenz der Zielstruktur für den ZTL Klon JB4 eine kontinuierliche Abnahme des Gehalts an RANTES in den ZTL induzierte, so dass nach 35 Stunden nur noch eine sehr geringe Menge an RANTES in den ZTL vorlag.

4.3 Funktionelle Kapazität von Perforin⁻ T-Effektorlymphozyten

In Kapitel 4.2.1 wurde gezeigt, dass Perforin⁺-ZTL in einem *in vitro* Modellsystem durch Koinkubation mit einem Überschuss an Tumorzellen in Perforin⁻-ZTL umgewandelt werden können. Dabei blieben die ZTL weiterhin Granzym A⁺ und Granzym B⁺. Da Perforin für die lytische Effektorfunktion von ZTL entscheidend ist, wurde untersucht, ob die induzierte Perforin-Defizienz die Effektorfunktion des ZTL Klon JB4 beeinträchtigt.

4.3.1 Verringerte Zytotoxizität des Perforin⁻-ZTL Klon JB4

Um die Konsequenz des Fehlens von Perforin für die Zellyse von Zielzellen zu untersuchen, wurde der ZTL Klon JB4, welcher aufgrund der Koinkubation mit einem Überschuss an RCC26 (10x) Perforin⁻ wurde, in einen Chromfreisetzungstest eingesetzt. Parallel dazu wurden ZTL, die mit einer niedrigen Tumorzellzahl (1x) inkubiert worden waren, und JB4 aus der normalen Kultur eingesetzt. Diese ZTL blieben nach Kapitel 4.2.1 Perforin⁺ (siehe Abbildung 4.16). Anhand der zuvor durchgeführten DiD-Markierung, wurden die ZTL nach der Koinkubation mittels FACS-Sortierung aus dem Zellgemisch angereichert. Die FACS-Sortierung veränderte den Gehalt an Perforin in den ZTL nicht (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.24 ist die spezifische Zellyse von RCC26 durch den ZTL Klon JB4 aus den verschiedenen Koinkubationsansätzen dargestellt. JB4, die ohne Tumorzellen vorinkubiert worden waren, zeigten die höchste spezifische Zellyse. Die mit einer niedrigen Tumorzellzahl (1x) vorinkubierten ZTL, wiesen eine etwas geringere spezifische Zellyse auf als die ohne Tumorzellen vorinkubierten ZTL. Die mit einem Überschuss (10x) an RCC26 koinkubierten T-Zellen hatten die geringste lytische Aktivität.

Da die Zellausbeute an ZTL bei der FACS-Sortierung immer sehr gering war, wurde in einem anderen experimentellen Ansatz die lytische Kapazität der ZTL aus den Koinkubationsansätzen ohne Sortierung analysiert. Dazu wurde der gesamte Kokulturansatz inklusive der ZTL, der apoptotischen Tumorzellen und der gegebenenfalls noch lebenden Tumorzellen für vier Stunden auf einen Zellrasen an RCC26 gegeben. Die Tumorzellen wurden zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein markiert. Anschließend wurden die Effektorzellen und die lysierten

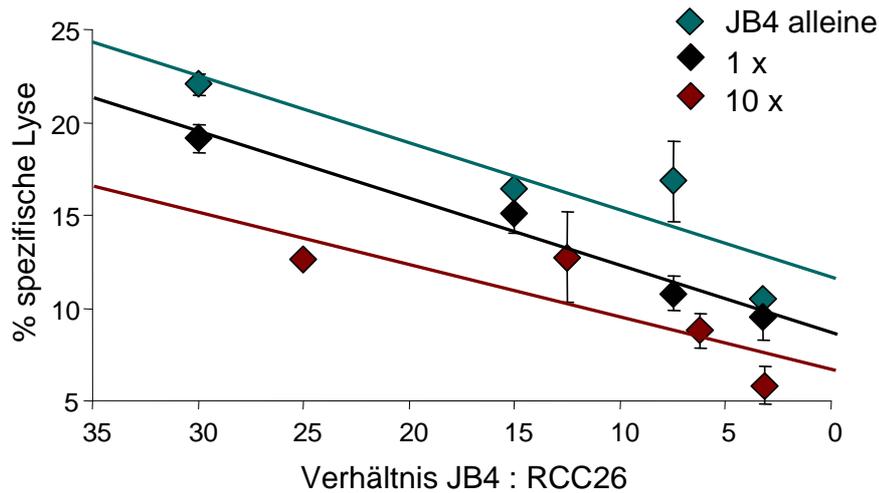


Abb. 4.24: Zelllyse von RCC26 durch den ZTL Klon JB4 nach 35 h Vorinkubation mit Tumorzellen. Nach DiD-Markierung wurde der ZTL Klon JB4 mit niedriger (1 x) bzw. hoher Zellzahl (10 x) der Tumorzelllinie RCC26 für 35 h inkubiert. Nach Koinkubation mit den Tumorzellen wurden die ZTL basierend auf der DiD-Markierung sortiert und für 4 h in einen Chromfreisetzungstest eingesetzt. Zusätzlich wurden JB4 ohne Vorinkubation mit Tumorzellen als Kontrolle mitgeführt. Dargestellt ist die spezifische Lyse von RCC26 durch JB4, die zuvor mit niedriger (schwarz) bzw. hoher Zellzahl (rot) an RCC26 vorinkubiert worden waren, sowie JB4 ohne Vorinkubation mit RCC26 (grün). Angegeben ist jeweils der Mittelwert der spezifischen Lyse (in Prozent) von Duplikaten \pm Mittelwertabweichung. Aufgrund der niedrigen Ausbeute an ZTL nach Koinkubation mit hoher Tumorzellzahl wurden andere Effektor zu RCC26 Verhältnisse gewählt. Die Geraden wurden mittels linearer Regression aus den Daten ermittelt.

Tumorzellen gewaschen und die Fluoreszenzintensität gemessen. Da lysierte Tumorzellen gewaschen wurden, war die verbliebene Fluoreszenzintensität umgekehrt proportional zur lytischen Aktivität der Effektorzellen. Die spezifische Zelllyse der Tumorzellen durch die T-Zellen wurde berechnet (siehe Kapitel 3.5.2) in Abbildung 4.25 dargestellt. ZTL ohne Vorinkubation mit Tumorzellen und ZTL, die mit einer niedrigen Zellzahl an RCC26 (1x) vorinkubiert worden waren, zeigten eine identische lytische Aktivität. Im Gegensatz dazu wiesen JB4 nach einer Vorinkubation mit einem Überschuss an RCC26 (10x) eine wesentlich geringere lytische Aktivität auf (15 %). Dies entspricht dem Ergebnis des Chromfreisetzungstests mit sortierten ZTL.

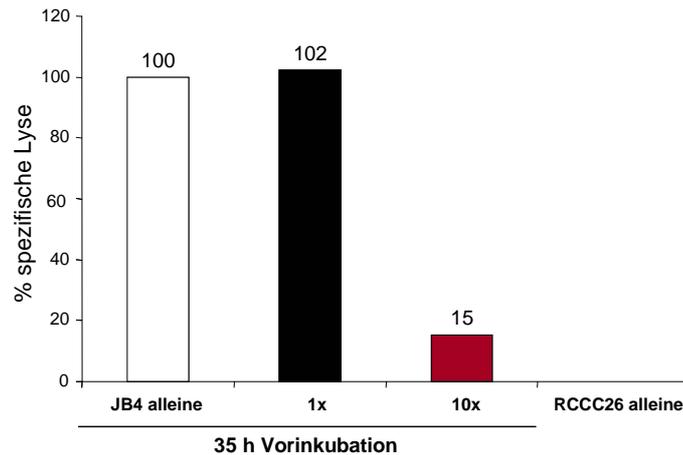


Abb. 4.25: Zelllyse von RCC26 durch den ZTL Klon JB4 nach 35 h Vorinkubation mit Tumorzellen. Nach Vorinkubation ohne, mit niedriger (1x) bzw. hoher Zellzahl von RCC26 (10x) wurde der ZTL Klon JB4 für 4 h auf einen Zellrasen Calcein-markierter RCC26 in einem Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 10:1 gegeben. Nach 4 h wurden tote RCC26 wegwaschen und eine Messung bei 535 nm durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität ist umgekehrt proportional zur Zelllyse durch die ZTL. Dargestellt ist die spezifische Zelllyse (in Prozent) von RCC26 durch JB4, die zuvor alleine (weiß), mit niedriger (schwarz) bzw. hoher Tumorzellzahl (rot) vorinkubiert worden waren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Perforin⁻-ZTL eine geringe lytische Aktivität besitzen. Gründe für eine verminderte Zytotoxizität können auf dem Fehlen lytischer Granula, auf einer gestörten Degranulationsfähigkeit, auf einer gestörten Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran oder einer gestörten TZR-Signalweiterleitung beruhen.

4.3.1.1 Nachweis lytischer Granula im Perforin⁻-ZTL Klon JB4

Die geringe lytische Aktivität des Perforin⁻ ZTL Klons JB4 könnte im Mangel an lytischen Granula liegen. Daher wurde der ZTL Klon JB4 nach Koinkubation mit einem Überschuss an Tumorzellen auf die Präsenz des Perforins und des lytischen Granulamembranproteins GMP-17 mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Zusätzlich zu den Antikörpern gegen Perforin und GMP-17 wurde ein CD8-spezifischer Antikörper mitgeführt, um die ZTL von den Tumorzellen unterscheiden zu können. Wie Abbildung 4.26

zeigt, waren alle mit Tumorüberschuss vorinkubierten ZTL GMP-17⁺ und Perforin⁻ (100 %, 20 der 20 untersuchten ZTL). Alle mit wenigen Tumorzellen (1x) vorinkubierten ZTL wiesen GMP-17 (42 von 44 Zellen) auf. Von diesen waren 96 % (42 von 44 ZTL) Perforin⁺.

Auch wenn das Effektormolekül Perforin fehlte, besaßen die Effektorzellen weiterhin lytische Granula. Das Fehlen von lytischen Granula kann daher als Ursache für die gestörte Zytotoxizität der Perforin⁻-ZTL ausgeschlossen werden.

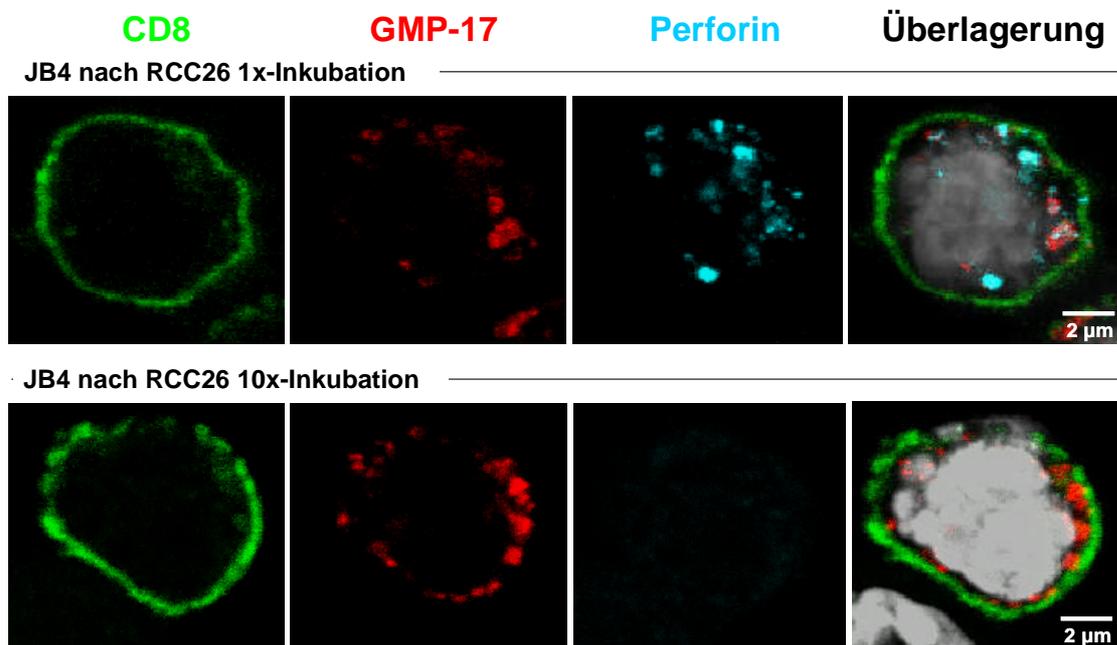


Abb. 4.26: Nachweis von GMP-17 und Perforin im ZTL Klon JB4 nach 35 h Inkubation mit niedriger bzw. hoher Zellzahl an RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde für 35 h mit niedriger bzw. hoher Zellzahl an RCC26 inkubiert nach dem Auftropfen auf Objektträger mit Antikörpern gegen CD8, GMP-17 und Perforin gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die ZTL wurden anschließend mittels konfokaler Lasermikroskopie auf die Präsenz von GMP-17 und Perforin analysiert. Die Abbildungen zeigen jeweils exemplarisch eine ZTL nach Vorinkubation mit niedriger (1x, oben) bzw. hoher (10x, unten) Tumorzellzahl. Dargestellt ist jeweils eine optische Schnittebene der ZTL mit CD8 (grün), GMP-17 (rot) und Perforin (blau). Im Überlagerungsbild sind die Zellkerne in grau dargestellt.

4.3.1.2 Analyse der Degranulationsfähigkeit des Perforin⁻-ZTL Klon JB4 nach Stimulierung mit Zielzellen

Um zu klären, ob Perforin⁻-ZTL in der Degranulation der lytischen Granula gestört sind, wurde ein durchflusszytometriebasierter Degranulationsversuch durchgeführt. Hierbei wurden während der Stimulierung der ZTL mit Zielzellen fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen die lysosomalen Membranproteine CD107a und CD107b zugegeben. Perforin⁻-ZTL wurden durch Koinkubation mit einem Überschuss an RCC26 (10x) induziert. Parallel wurden ZTL ohne Tumorzellen bzw. mit einer niedrigen Zellzahl an RCC26 (1x) vorinkubierte ZTL untersucht. Der Gehalt an Perforin in den ZTL wurde vor Einsatz in den Degranulationsversuch bestimmt (Abbildung 4.27A). Nach Vorinkubation wurden die ZTL einer erneuten vierstündigen Stimulierung mit RCC26 unter Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD107a und CD107b unterzogen. Durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität von CD107a/b wurde nachgewiesen in welchem Ausmaß die ZTL degranuliert haben. Abbildung 4.27B zeigt die Fluoreszenzintensität von CD107a/b zu Beginn des Degranulationsversuchs (0 h) und nach der Stimulierung mit RCC26 (4 h). Sowohl die ZTL, die alleine als auch die, die mit einer niedrigen Zellzahl an RCC26 (1x) vorinkubiert worden waren, zeigten eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von CD107a/b und einen erhöhten Anteil an CD107a/b⁺-ZTL (63 % bzw. 64 %) nach der Stimulierung. Im Gegensatz dazu wiesen die Effektorzellen, die mit einer hohen Zellzahl an RCC26 (10x) vorinkubiert worden waren, eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität auf. Der geringere Anteil an mit Tumorüberschuss vorinkubierten JB4, welche CD107a/b⁺ wurden (21 %), entspricht vermutlich dem Anteil an Effektorzellen, die nach der Vorinkubation noch Perforin⁺ waren (16 %, siehe Abbildung 4.27A). Das Ergebnis des Degranulationsversuchs zeigt, dass Perforin⁻-Effektorzellen eine geringe Degranulationsfähigkeit nach Zielzellerkennung aufwiesen.

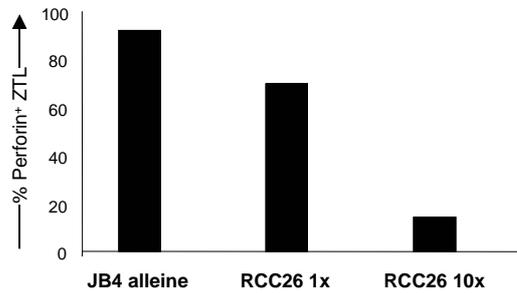
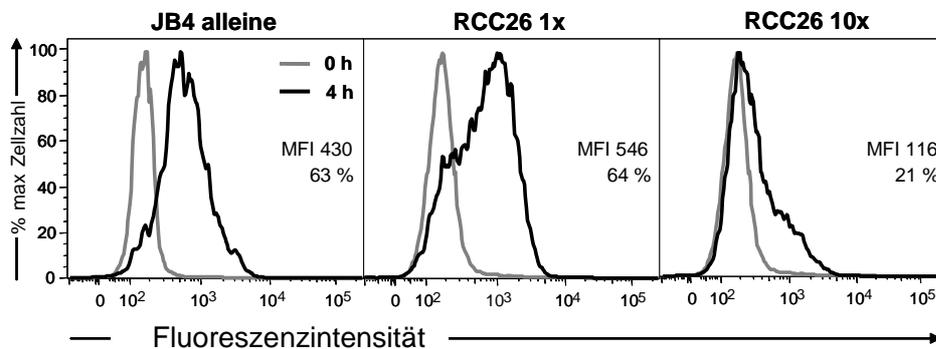
A ZTL Klon JB4 nach 35 h Vorinkubation**B Degranulationkapazität von vorinkubierten JB4**

Abb. 4.27: Prozentualer Anteil an Perforin⁺-ZTL nach Koinkubation ohne, mit niedriger bzw. hoher Zellzahl an RCC26 und anschließender Analyse der Degranulationsfähigkeit nach erneuter Stimulierung mit Zielzellen. Der ZTL Klon JB4 wurde ohne, mit niedriger (1x) bzw. hoher Zellzahl (10x) an RCC26 für 35 h inkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. **A.** Nach der Inkubation wurden die ZTL auf den Gehalt an Perforin analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Perforin⁺-ZTL nach Inkubation ohne Tumorzellen, mit niedriger bzw. hoher Tumorzellzahl. In die Auswertung wurden nur lebende ZTL einbezogen. **B.** Vorinkubierte ZTL wurden zusammen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD107a und CD107b erneut mit RCC26 für 4 h inkubiert und die Fluoreszenzintensität von CD107a/b durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von CD107a/b. Die MFI und der Anteil an CD107a/b⁺-ZTL sind im jeweiligen Histogramm angegeben. Von den Werten der MFI wurde die MFI des parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers abgezogen.

4.3.1.3 Gestörte Fusion lytischer Granula mit der Plasmamembran nach Kontakt mit Zielzellen im Perforin⁻-ZTL Klon JB4

Um die Verschmelzung der lytischen Granula mit der Plasmamembran im Perforin⁻-ZTL Klon JB4 nach Kontakt mit Zielzellen zu untersuchen, wurden ZTL, die ohne, mit niedriger (1x) bzw. hoher (10x) Zellzahl an RCC26 vorinkubiert worden waren, wurden für 30 min bei 37°C auf einen Zellrasen von RCC26 gegeben. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CD8 und GMP-17 durchgeführt und die ZTL mittels konfokaler Lasermikroskopie auf die intrazelluläre Lokalisation von GMP-17 ausgezählt (siehe Kapitel 4.1.3). Wurden die ZTL mit wenigen Tumorzellen vorinkubiert (1x), zeigten 55 % (17 von 31 Zellen) der Effektorzellen eine Fusion von GMP-17 mit der Plasmamembran. Dagegen zeigten nur 10 % (4 von 42 Zellen) der Effektorzellen, die mit einem zehnfachen Überschuss an RCC26 (10x) vorinkubiert worden waren, eine synaptische Lokalisation von GMP-17. In Abbildung 4.28 (links) ist exemplarisch eine mit wenigen Tumorzellen (1x) vorinkubierte ZTL gezeigt, die eine synaptische Lokalisation des GMP-17 aufweist. Effektorzellen, die mit einem zehnfachen Überschuss an Tumorzellen (10x) vorinkubiert worden waren, zeigten in der Mehrheit (90 %) eine zytoplasmatisch granuläre Verteilung des GMP-17. Eine solche Effektorzelle ist exemplarisch in Abbildung 4.28 (rechts) dargestellt.

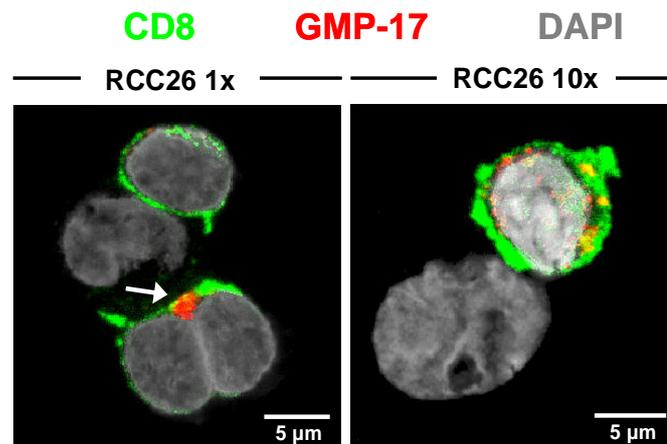


Abb. 4.28: Räumliche Verteilung des GMP-17 in JB4 nach Vorinkubation mit Tumorzellen bei erneutem Kontakt mit RCC26. JB4 wurden nach Koinkubation mit niedriger (1x) bzw. hoher (10x) Zellzahl von RCC26 auf einen Zellrasen von RCC26 gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD8 und GMP-17 durchgeführt und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurde in 31 bis 42 T Zellen die räumliche Verteilung des GMP-17 relativ zu CD8 ausgewertet. Dargestellt sind die Überlagerungen der drei Fluoreszenzkanäle von CD8 (grün), GMP-17 (rot) und DAPI (grau) einer optischen Schnittebene. Die linke Abbildung zeigt exemplarisch eine T-Zelle in Nachbarschaft zu RCC26 mit synaptischem GMP-17 (siehe Pfeil) die mit niedriger Tumorzellzahl (1x) vorinkubiert wurde (55 % Zellen mit synaptischem GMP-17, 17 von 31 Zellen). Wurden die T-Zellen mit hoher Tumorzellzahl (10x) vorinkubiert, zeigten 10 % der Zellen eine synaptische Lokalisation des GMP-17 (4 von 42 Zellen). Die rechte Abbildung (10x) zeigt eine T-Zelle mit zytoplasmatisch granulärer Lokalisation des GMP-17 nach Inkubation mit Tumorzellüberschuss.

4.3.2 IFN- γ -Sekretion des Perforin⁻-ZTL Klons JB4 nach Stimulierung mit Zielzellen

Zusätzlich zur Freisetzung von Effektormolekülen sezernieren ZTL nach TZR-Stimulierung eine Reihe von Zytokinen, darunter auch IFN- γ . Um zu untersuchen, ob der Perforin⁻-ZTL Klon JB4 Signale über den TZR empfangen und weiterleiten kann, wurde nach Stimulation der Effektorzellen mit Zielzellen das freigesetzte IFN- γ gemessen. Perforin⁻-Effektorzellen wurden durch Vorinkubation mit einem Überschuss an RCC26 (RCC26 10x) bzw. KT-195 (KT-195 10x) induziert. Als Positivkontrollen wurden ZTL mitgeführt, die ohne (JB4 alleine) bzw. mit niedriger Zellzahl an RCC26 (RCC26 1x) vorinkubiert wurden. Diese Bedingungen induzierten keinen Perforinverlust im ZTL Klon JB4 (siehe Kapitel 4.2.1). Nach der Vorinkubation wurden die Effektorzellen gezählt und die gleiche Anzahl an Zellen aus jedem Vorinkubationsansatz für 20 Stunden mit RCC26 bzw. der Nicht-Zielzelle KT-195 stimuliert, KT-195 dient dabei als Negativkontrolle, da sie von JB4 nicht erkannt wird. Parallel wurden die Stimulationszellen, RCC26 und KT-195, wurden alleine inkubiert, um deren mögliche basierte Zytokin-Sekretion nachzuweisen. Um die mögliche in den Vorinkubationsansätzen enthaltene Hintergrundkonzentration an Zytokin zu erkennen, wurden die jeweiligen Kokulturansätze ohne Zugabe von Stimulationszellen mitgeführt. Nach der Stimulation wurde die Konzentration an IFN- γ in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Bei ZTL, die zuvor mit einer niedrigen Anzahl an RCC26 oder ohne Tumorzellen vorinkubiert worden waren, wurde nach Stimulation mit RCC26 eine Konzentration an IFN- γ von 60 pg/ml gemessen (Abbildung 4.29). Effektorzellen, die mit einem zehnfachen Überschuss an Tumorzellen (10x) inkubiert worden waren, sezernierten nach Stimulierung mit RCC26 kein IFN- γ . Das Ausbleiben der IFN- γ -Sekretion war unabhängig davon, ob die Effektorzellen mit RCC26 oder KT-195 vorinkubiert worden waren. Bei Stimulation der ZTL mit KT-195 wurde keine IFN- γ -Sekretion ausgelöst, was die Spezifität der Reaktion anzeigt. Ebenfalls war kein IFN- γ in den Überständen der Ansätze ohne Effektorzellen detektierbar.

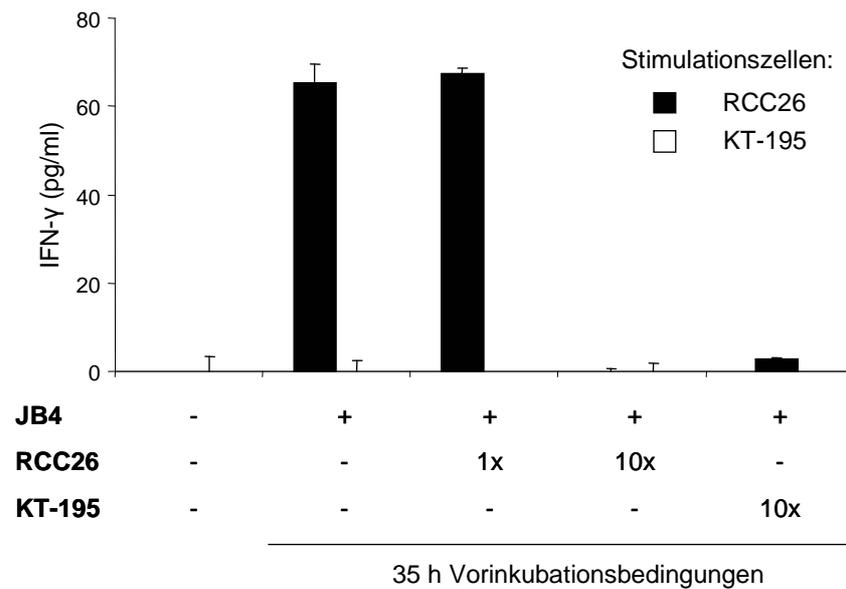


Abb. 4.29: IFN- γ -Sekretion von mit Tumorzellen vorinkubierten JB4 nach erneuter Stimulation mit RCC26 bzw. KT-195. Der ZTL Klon JB4 wurde alleine, mit niedriger (1x) an RCC26 bzw. hoher (10 x) Zellzahl an RCC26 (HLA-A2⁺) bzw. KT-195 (HLA-A2⁻) für 35 h inkubiert. Anschließend wurden die Effektorzellen geerntet, gezählt und erneut für 20 h mit RCC26 (schwarze Balken) bzw. KT-195 (weiße Balken) stimuliert. Die Konzentration an IFN- γ in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Diesen Werten wurde der Wert ohne Stimulationzell-Zugabe abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Duplikatansätzen \pm Mittelwertabweichung.

4.3.3 Analyse der CD3 ζ -Kette in JB4 nach der Inkubation mit Tumorzellen

Eine Abregulation der CD3 ζ -Kette in Perforin⁻-Effektorzellen könnte die fehlende IFN- γ -Sekretion nach Stimulierung mit Zielzellen erklären. Die FACS-Analyse der CD3 ζ -Kette zeigte ähnliche MFI-Werte für die Effektorzellen, die ohne Tumorzellen (JB4 alleine), mit niedriger (1x) bzw. hoher Zellzahl (10x) an RCC26 inkubiert worden sind (MFI 89, MFI 70 bzw. MFI 103, Abbildung 4.30).

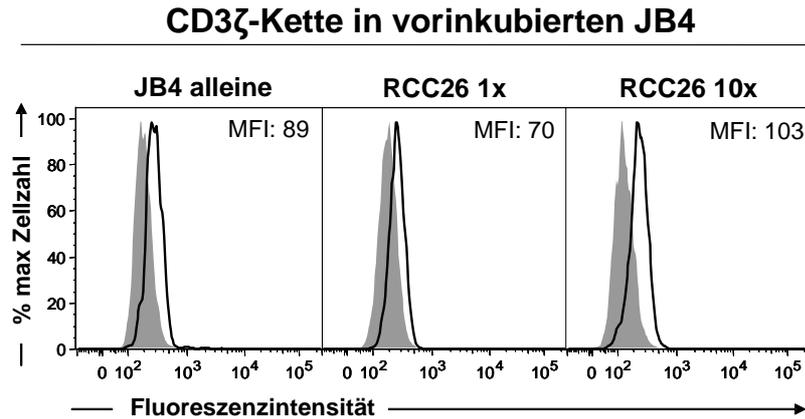


Abb. 4.30: Expression der CD3 ζ -Kette im ZTL Klon JB4 nach 35 h Vorinkubation mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde DiD-markiert und anschließend alleine, mit niedriger (1 x) bzw. hoher (10 x) Zellzahl an RCC26 und für 35 h inkubiert. Die Expression der CD3 ζ -Kette in JB4 wurde mittels intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die offenen Kurven stellen die Fluoreszenzintensität der CD3 ζ -Kette dar. Die grau hinterlegten Kurven stellen die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Isotypkontrollantikörpers dar. Angegeben ist die jeweilige MFI, wobei die MFI des Isotypkontrollantikörpers abgezogen wurde.

4.4 Re-Expression von Perforin im Perforin⁻-ZTL Klon JB4

Der durch Koinkubation mit einem Überschuss an Tumorzellen induzierte Perforinverlust des ZTL Klons JB4 korrelierte mit einer gestörten Effektorfunktion (siehe Kapitel 4.3). Um zu untersuchen, ob der Perforinverlust revertierbar werden kann, wurde die Perforin⁻-Effektorzellen nach Kokultur mit Tumorzellen in neues Medium aufgenommen und für weitere 24 Stunden unter Zugabe von IL-2 inkubiert. Dabei blieb das Volumen der Kokultur unverändert. Die abgetöteten Tumorzellen wurden dabei für die Inkubation nicht entfernt, um das zelluläre Milieu beizubehalten. Der Gehalt an Perforin in den Effektorzellen wurde nach 35 Stunden Vorinkubation sowie nach der Kultur der weiteren 24 Stunden analysiert.

Wurden die Effektorzellen ohne Vorinkubation mit Tumorzellen für weitere 24 Stunden mit IL-2 inkubiert, stieg der Perforingehalt auf das Doppelte an (MFI 351 auf MFI 723, Abbildung 4.31). Wurden die Effektorzellen mit einer niedrigen Zellzahl an Tumorzellen (RCC26 1x) vorinkubiert, erhöhte sich der Perforingehalt ebenfalls nach erneuter Inkubation mit IL-2 (MFI 209 auf MFI 557). Effektorzellen, die nach Vorinkubation mit einem zehnfachen Überschuss an

RCC26 (RCC26 10x) einen sehr geringen Perforingehalt (MFI 39) hatten, zeigten keine Steigerung des Perforingehalts nach Inkubation mit IL-2 (MFI 36). Die alleinige Zugabe von IL-2 bei gleich bleibenden Milieubedingungen (zelluläres Milieu und Volumen der Kokultur) ist somit nicht ausreichend, um den Perforinstatus der Perforin⁻-Effektorzellen zu verbessern.

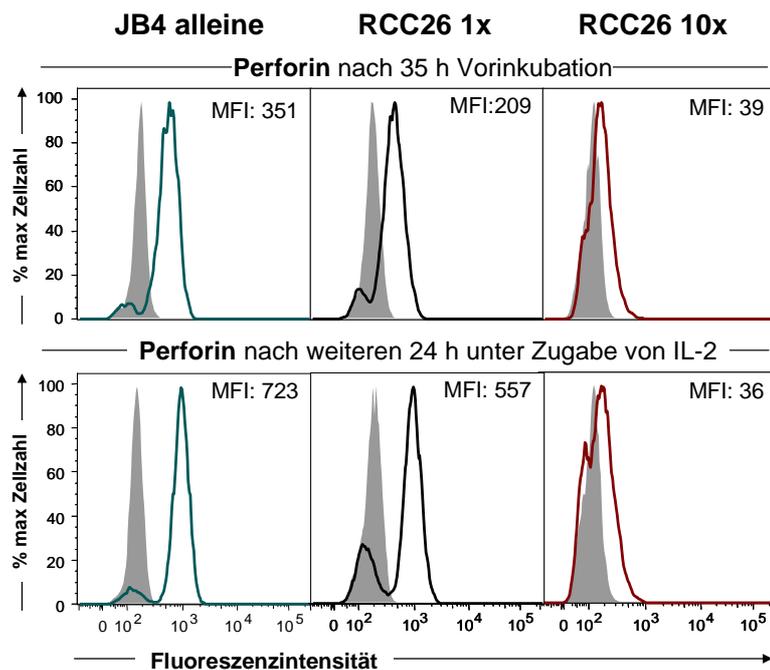


Abb. 4.31: Gehalt an Perforin in dem ZTL Klon JB4 nach 35 h Inkubation mit RCC26 und anschließender erneuter Inkubation von 24 h mit IL-2. Der ZTL Klon JB4 wurde ohne, mit niedriger (1 x) bzw. hoher (10 x) Zellzahl an RCC26 für 35 h inkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in 1 ml neues Medium mit IL-2 (100 U/ml) aufgenommen und erneut für weitere 24 h inkubiert. Die Effektorzellen wurden nach der 35-stündigen Vorinkubation und nach den weiteren 24 h IL-2-Kultur mit einem Antikörper gegen Perforin gefärbt und der Gehalt an Perforin in den Effektorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von Perforin als offene Kurven ins Histogrammen. Die Fluoreszenzintensität des jeweils parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers ist als graue Kurve dargestellt. Angegeben ist jeweils die MFI von Perforin, wobei die MFI des mitgeführten Isotypkontrollantikörpers abgezogen wurde.

4.5 Einfluss von Tumormilieu-assoziierten Faktoren auf die Effektormoleküle und die Effektorfunktion von zytotoxischen T-Lymphozyten *in vitro*

In Kapitel 4.2.1 wurde gezeigt, dass Tumorzellen den Verlust des zytotoxischen Effektormoleküls Perforin in ZTL *in vitro* induzieren können. Des Weiteren wurde in Kapitel 4.3 gezeigt, dass die zytotoxische Effektorfunktion Perforin⁻-Effektorzellen stark eingeschränkt ist. Die Kenntnis der Faktoren, die zur Defizienz von Perforin und der Inhibition der Effektorfunktion von ZTL führen, ließe sich zur Entwicklung von Gegenmaßnahmen nutzen. Deshalb wurde der Einfluss von Tumormilieu-assoziierten Faktoren auf die Effektorfunktion des ZTL Klons JB4 untersucht. Im Einzelnen wurde der Einfluss des Kulturüberstands der Tumorzelllinie RCC26, des Zytokins *transforming growth factor-β* (TGF-β), des pH-Werts und der Tumorzell-dichte auf den Gehalt von Effektormolekülen bzw. die Effektorfunktion von JB4 evaluiert.

4.5.1 Einfluss von RCC26 sezernierten Faktoren auf den Gehalt von Effektormolekülen und die lytische Kapazität von zytotoxischen T-Lymphozyten

Um den Einfluss von Faktoren, die von Tumorzellen freigesetzt werden, auf den Gehalt der Effektormoleküle Perforin, Granzym A, Granzym B und RANTES zu untersuchen, wurde der ZTL Klon JB4 in Kulturüberstand der Tumorzelllinie RCC26 für 24 Stunden inkubiert. In Abbildung 4.32 sind die Fluoreszenzintensitäten von Perforin, Granzym B, Granzym A und RANTES dargestellt. Bei Kultur in Tumorüberstand nahm der Gehalt des Perforins in den ZTL um die Hälfte ab, während Granzym B unverändert blieb. Der Gehalt an Granzym A und RANTES wurde leicht erniedrigt.

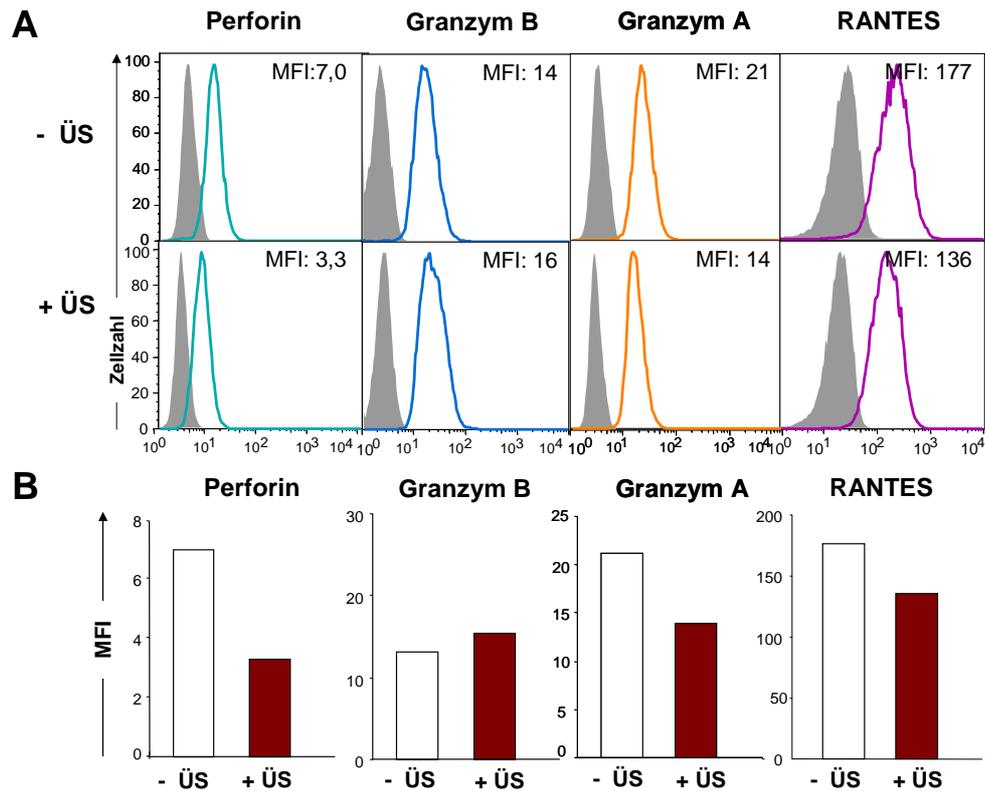


Abb. 4.32: Gehalt an Perforin, Granzym B, Granzym A und RANTES im ZTL Klon JB4 nach Inkubation ohne bzw. mit Kulturüberstand der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde für 24 h ohne bzw. mit Kulturüberstand (ÜS) der Nierenzellkarzinomzelllinie RCC26 inkubiert. Der Gehalt an Effektormolekül wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. **A.** Darstellung der Fluoreszenzintensität von Perforin (grün), Granzym B (blau), Granzym A (orange) und RANTES (lila) in den ZTL als Histogramme mit logarithmischer Skalierung. Die grauen Kurven stellen jeweils die Fluoreszenzintensität des parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers dar. Die Zahl gibt die jeweilige MFI an, von der die die MFI des jeweiligen parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers abgezogen wurde. **B.** Darstellung der in A angegebenen MFI-Werte der Effektormoleküle in JB4 als Balken nach Inkubation ohne (weiße Balken) bzw. mit (rote Balken) Tumorkulturüberstand.

Das Zytokin TGF- β wird von vielen Tumorzellen produziert, darunter auch von Zellen des Nierenzellkarzinoms(96, 97). In Kapitel 4.5.3 wird bestätigt, dass die Nierenzellkarzinomzelllinie RCC26 TGF- β sezerniert (siehe Abbildung 4.42). Es wurde beschrieben, dass die Anwesenheit von TGF- β während der Differenzierung naiver T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen spezifisch die Expression der Effektormoleküle IFN- γ , Granzym A, Granzym B und Perforin inhibiert (69). Über den Einfluss von TGF- β auf den Gehalt der Effektormoleküle in ausdifferenzierten zytotoxischen Effektorzellen ist bisher nichts beschrieben. TGF- β als möglicher effektiver Faktor im Kulturüberstand von RCC26, der zur Abregulation der Effektormoleküle führen könnte wurde in Betracht gezogen.

Der ZTL Klon JB4 wurde ohne bzw. mit TGF- β für 24 Stunden inkubiert und anschließend der Gehalt an Perforin, Granzym A, Granzym B und RANTES in den ZTL ermittelt. In Abbildung 4.33 sind die Fluoreszenzintensitäten der Effektormoleküle Perforin, Granzym A, Granzym B und RANTES als Histogramme mit logarithmischer Skalierung dargestellt. Abbildung 4.34 zeigt die Zusammenfassung von zwei Experimenten. Es zeigte sich, dass TGF- β den Gehalt an Perforin in den ZTL reduziert. Der Gehalt an Granzym A und Granzym B in den ZTL wurde durch TGF- β nicht verändert. Der Gehalt an RANTES in den ZTL wurde durch TGF- β geringfügig erhöht.

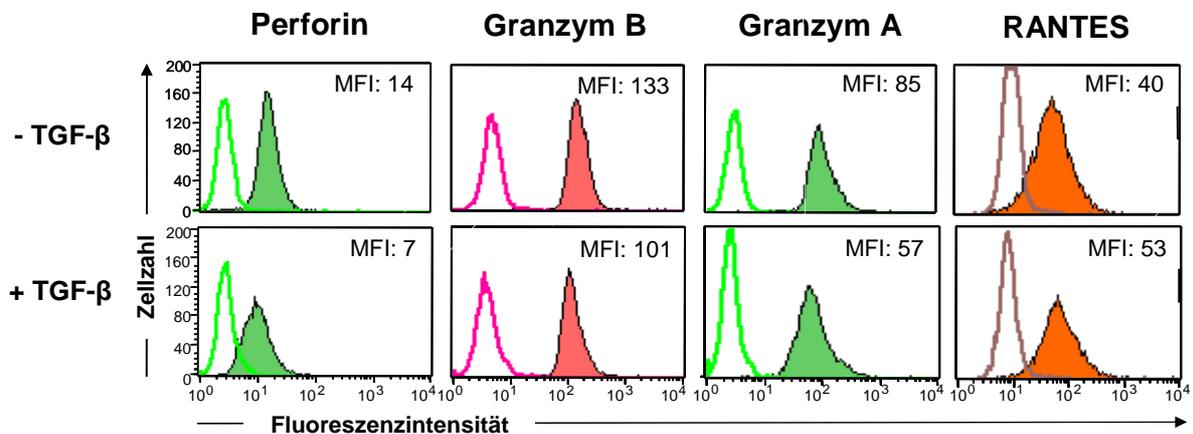


Abb. 4.33: Gehalt an Perforin, Granzym B, Granzym A und RANTES im ZTL Klon JB4 nach Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β . Der ZTL Klon JB4 wurde für 24 h in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β (1 ng/ml) inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von Perforin (links), Granzym B (Mitte links), Granzym A (Mitte rechts) und RANTES (rechts) durch ausgefüllte Kurven in Histogrammen mit logarithmischer Skalierung. Die offenen Kurven entsprechen der Fluoreszenzintensität des parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers. Angegeben sind jeweils die MFI der Effektormoleküle, wobei die MFI des Isotypkontrollantikörpers abgezogen wurde. Dargestellt ist ein von zwei durchgeführten Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

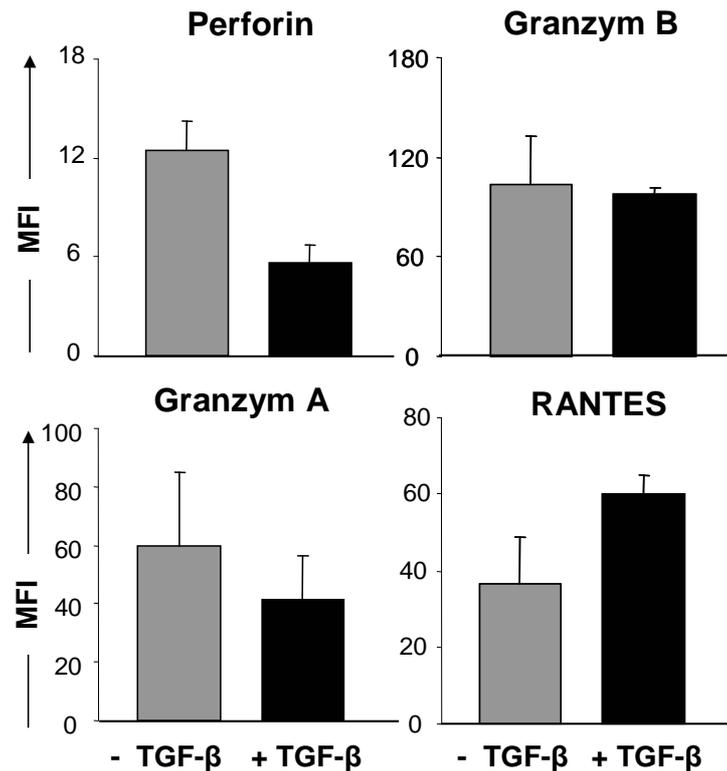


Abb. 4.34: Gehalt an Perforin, Granzym B, Granzym A und RANTES im ZTL Klon JB4 nach Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β . Der ZTL Klon JB4 wurde für 24 h in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β (1 ng/ml) inkubiert. Der Gehalt an Effektormolekül in den ZTL wurde nach 24 h ohne (graue Balken) bzw. mit TGF- β (schwarze Balken) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der MFI \pm Mittelwertabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten, wobei die MFI des parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers jeweils abgezogen wurde.

Da Perforin für den Eintritt der Granzyme in die Zielzelle wichtig ist, wurde untersucht, ob eine Inkubation von JB4 mit Kulturüberstand von RCC26 bzw. TGF- β nicht nur den Perforin-Gehalt, sondern auch die lytische Aktivität verringert. Dazu wurde der ZTL Klon JB4 für 24 Stunden in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β bzw. RCC26-Kulturüberstand vorinkubiert und anschließend auf die lytische Aktivität mittels Chromfreisetzungstest analysiert. In Abbildung 4.35 ist die spezifische Zelllyse von RCC26 durch die vorinkubierten ZTL dargestellt. JB4, die zuvor mit TGF- β vorinkubiert worden waren, zeigten im Vergleich zu unbehandelten JB4 deutlich geringere lytische Aktivität (24 % vs. 43 % bei einem ZTL-zu-Tumorzell-Verhältniss von 30:1). Mit RCC26-Kulturüberstand vorinkubierte ZTL zeigten noch geringere lytische Aktivität (19 %). Die inhibierende Wirkung des Tumorüberstands auf die lytische Aktivität und den Perforingehalt der ZTL könnte zumindest teilweise durch TGF- β bedingt sein.

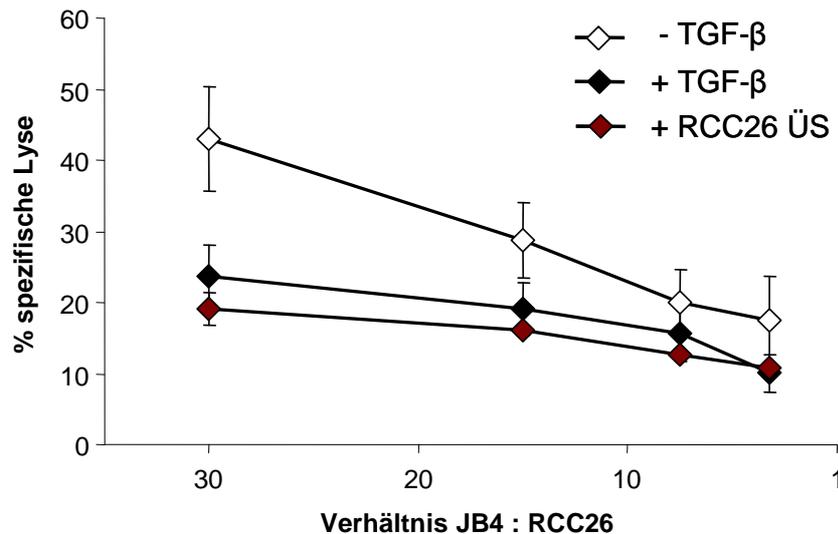


Abb. 4.35: Zellvermittelte Lyse der Tumorzelllinie RCC26 durch den ZTL Klon JB4 nach 24 h Vorinkubation mit bzw. ohne TGF- β oder Überstand der Zelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde für 24 h ohne bzw. mit TGF- β (1 ng/ml) oder dem Überstand der Zelllinie RCC26 (ÜS) inkubiert. Anschließend wurden die ZTL für 4 h mit ^{51}Cr -markierten RCC26 inkubiert. Nach 4 h wurde das im Überstand befindliche ^{51}Cr gemessen und die spezifische Lyse in Prozent errechnet. Dargestellt ist die spezifische Lyse von RCC26 durch die ZTL, die zuvor mit Medium (weiß), mit TGF- β (schwarz) bzw. mit RCC26-Kulturüberstand (rot) inkubiert worden sind. Angegeben sind die Mittelwerte der spezifischen Lyse aus zwei unabhängigen Experimenten \pm Mittelwertabweichung. Für die spezifische Lyse mit RCC26-ÜS vorinkubierten ZTL sind Mittelwerte \pm Mittelwertabweichung aus Triplikaten eines Experimentes gezeigt.

4.5.2 Einfluss des pH-Werts auf den Effektormolekülgehalt und die IFN- γ -Sekretion von zytotoxischen T-Lymphozyten während der Stimulierung mit Zielzellen

Ein weiterer Milieufaktor, der auf die Effektorfunktion von ZTL Einfluss nehmen kann, ist der pH-Wert. Tumoren weisen unter anderem aufgrund des auf anaerobe Glykolyse eingestellten Stoffwechsels einen niedrigeren extrazellulären pH-Wert als gesundes Gewebe auf (79). In humanen Tumoren wurden pH-Werte zwischen pH 5,7 bis pH 7,8 gemessen (98).

In den Kokulturen von JB4 mit niedriger (1x) und hoher Anzahl an Tumorzellen (10x) (Kapitel 4.2.1) wurden ebenfalls pH-Wert-Änderungen beobachtet. Der pH-Wert des Kulturmediums wurde anhand einer pH-Wert-Reihe ermittelt und ist in Abbildung 4.36 dargestellt. Wurden die ZTL ohne Tumorzellen bzw. mit niedriger Tumorzellzahl (1x) inkubiert, veränderte sich der pH-Wert des Medium bis sechs Stunden nicht und erst nach 24 Stunden wurde ein Abfall auf pH

7,0 beobachtet. War hingegen eine hohe Tumorzellzahl (10x) vorhanden, zeigte sich schon nach zwei Stunden ein Abfall des pH-Werts von 7,4 auf 7,0. Der pH-Wert fiel kontinuierlich weiter bis zum Ende der Inkubation ab und erreichte einen Wert von 6,0 nach 35 Stunden Koinkubation.

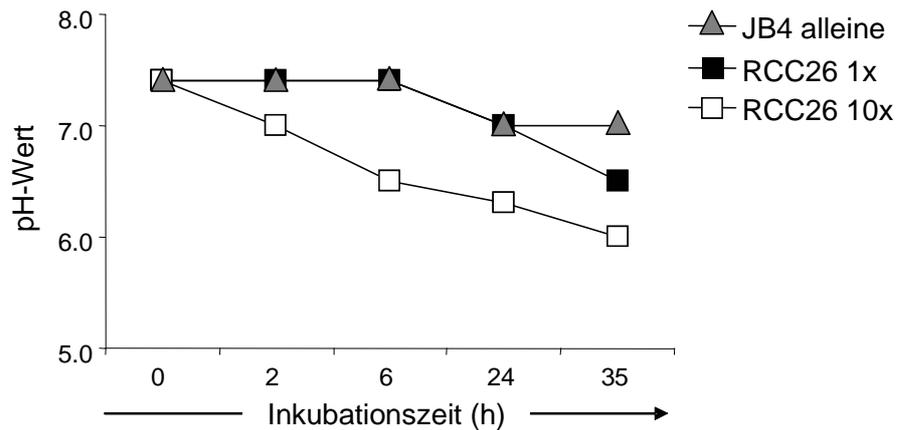


Abb. 4.36: Änderung des pH-Werts des Kulturmediums während der Inkubation von JB4 mit RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde alleine, mit niedriger (1x) bzw. hoher Zellzahl an RCC26 (10x) für 35 h inkubiert und der pH-Wert des Mediums zu verschiedenen Zeitpunkten mittels pH-Wert-Reihe ermittelt. Dargestellt sind die ermittelten pH-Werte im Medium während der Inkubation von JB4 ohne Tumorzellen (grau), mit niedriger (schwarz) bzw. hoher Tumorzellzahl (weiß).

Es wurde untersucht, ob sich ein reduzierter pH-Wert, wie er bei der Kokultur von JB4 mit einem Tumorüberschuss (10x) entsteht, auf die IFN- γ -Sekretion der ZTL sowie auf den Gehalt an Effektormolekülen in den ZTL während der Stimulierung mit Tumorzellen auswirkt. Dazu wurde der pH-Wert des Kulturmediums während der Kultur von JB4 mit niedriger Tumorzellzahl (K-562-A2, 1x), die für sich keine inhibierenden Effekte induzierte (siehe Abbildung 4.20), auf pH 6,0 reduziert. Der Gehalt an IFN- γ im Kulturüberstand wurde nach unterschiedlichen Zeitspannen der Koinkubation mittels ELISA bestimmt. Parallel dazu wurde der Gehalt an Perforin, Granzym A und Granzym B in den ZTL durchflusszytometrisch bestimmt.

Abbildung 4.37 gibt die Konzentrationen an IFN- γ wieder. Durch Stimulierung der ZTL mit den Tumorzellen bei pH 7,4 war bereits nach zwei Stunden eine IFN- γ -Sekretion detektierbar, die über die restliche Stimulationsdauer hinweg anstieg. Im Gegensatz dazu blieb bei einem pH-Wert von 6,0 die IFN- γ -Ausschüttung vollkommen aus. ZTL ohne Stimulation mit Zielzellen sezernierten ebenfalls kein IFN- γ .

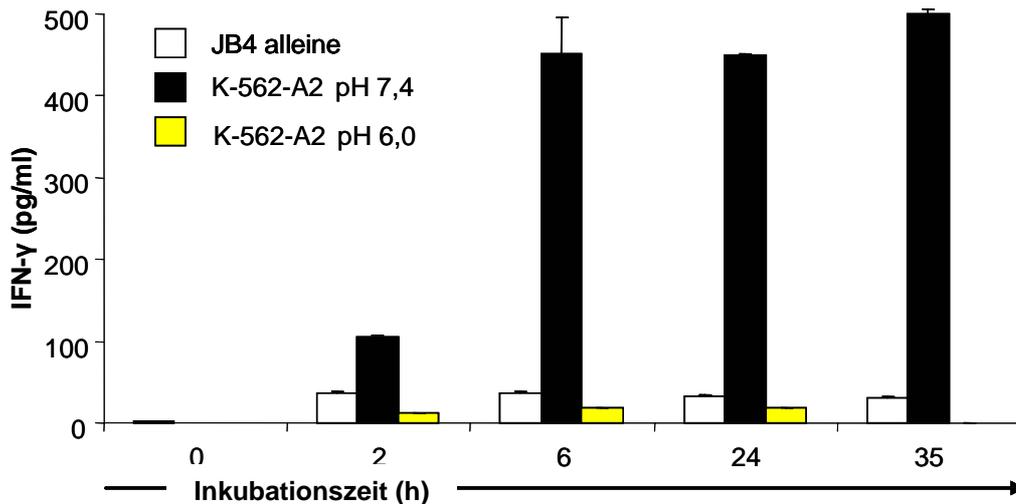


Abb. 4.37: IFN- γ -Sekretion des ZTL Klon JB4 während der Inkubation ohne bzw. mit der Tumorzelllinie K-562-A2 bei pH 7,4 bzw. pH 6,0. Der ZTL Klon JB4 wurde ohne K-562-A2 bzw. mit niedriger Zellzahl an K-562-A2 (1x) bei pH 7,4 bzw. pH 6,0 für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert. Die Konzentration an IFN- γ in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Mittelwertabweichung aus Duplikatmessungen. Ein Parallelexperiment mit der Tumorzelllinie Mel624.38 erzielte vergleichbare Ergebnisse.

In Abbildung 4.38 ist die relative Änderung des Gehalts an Perforin, Granzym B und Granzym A in den ZTL während der Inkubation mit K-562-A2 (1x) bei pH 6,0 im Vergleich zu pH 7,4 dargestellt. Bei einem pH-Wert von 7,4 wurde kein Perforinverlust in den ZTL induziert und es trat eine starke Induktion von Granzym B auf. Bei einem pH-Wert von 6,0 kam es zu einer Perforinabnahme und die Induktion von Granzym B blieb aus. Der Gehalt an Granzym A in den ZTL war vom pH-Wert unbeeinflusst. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Koinkubation von JB4 mit Mel624.38 anstelle von K-562-A2 erzielt (Daten nicht gezeigt).

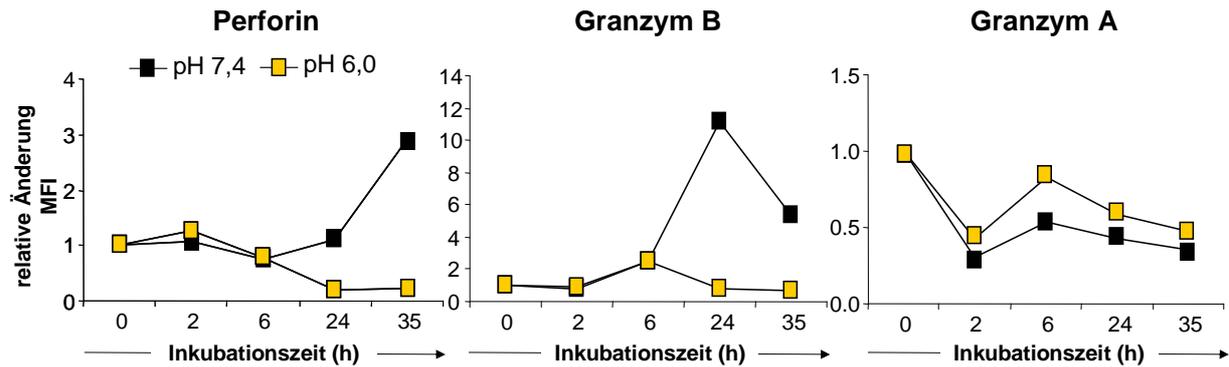


Abb. 4.38: Relative Änderung des Gehalts an Perforin, Granzym B und Granzym A im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit K-562-A2 bei pH 7,4 und pH 6,0. Der ZTL Klon JB4 wurde mit niedriger Zellzahl an K-562-A2 (1x) bei pH 7,4 bzw. pH 6,0 kokubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin, Granzym B und Granzym A durchgeführt und der Gehalt an Effektor-molekül durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die Änderung der MFI von Perforin (links), Granzym A (rechts) und Granzym B (Mitte) zu den angegebenen Zeitpunkten normiert auf den Ausgangswert bei 0 h. Von der spezifischen MFI wurde die MFI des parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers abgezogen. Ein Parallelexperiment mit der Tumorzelllinie Mel624.38 erzielte vergleichbare Ergebnisse.

4.5.3 Einfluss der Tumorzell-dichte auf die IFN- γ -Sekretion und den Perforin-gehalt von zytotoxischen T-Lymphozyten

In Kapitel 4.2 wurde ein Verlust an Perforin während der Inkubation mit einem Überschuss an Tumorzellen festgestellt. Dieser Effekt könnte durch die hohe Tumorzellzahl oder die hohe Tumorzell-dichte ausgelöst worden sein. Um zwischen diesen beiden Annahmen zu unterscheiden, wurde ein zusätzlicher Ansatz mit gleich hoher Tumorzellzahl aber erhöhtem Volumen des Kulturmediums eingesetzt, so dass die Zelldichte dem Ansatz mit niedriger Tumorzellzahl (1x) entsprach (1×10^6 Zellen/ml). Nach Kokubation der ZTL ohne RCC26, mit niedriger (1x), hoher (10x/hoher Zelldichte) bzw. hoher Tumorzellzahl mit erhöhtem Volumen (10x / niedrige Zelldichte) für 2, 6, 24 und 35 Stunden wurde die Konzentration an IFN- γ und TGF- β in den Kulturüberständen ermittelt sowie der Gehalt an Perforin in den ZTL bestimmt.

Abbildung 4.39 zeigt die IFN- γ -Konzentration in den Kulturüberständen nach Inkubation des ZTL Klons JB4 der vier Parallelansätze. Während der Inkubation mit einem Überschuss an Tumorzellen bei hoher Zelldichte (10x/hohe Zelldichte) wurde deutlich weniger IFN- γ von den ZTL sezerniert als bei Anwesenheit einer niedrigen Anzahl an Tumorzellen (1x), trotz Anwesenheit einer zehnfachen Menge an Zielzellen (Abbildung 4.39, schwarze vs. weiße

Symbole). Wurden die ZTL mit gleich hoher Tumorzellzahl aber niedriger Zelldichte (10x/niedrige Zelldichte) inkubiert, sezernierten sie innerhalb der ersten zwei Stunden eine vergleichbare Menge an IFN- γ wie bei niedriger Tumorzellzahl (1x), schütteten aber bei längerer Inkubationsdauer ein Vielfaches mehr an IFN- γ aus (Abbildung 4.39, rote vs. weiße Symbole). ZTL ohne Stimulation mit Zielzellen sezernieren kein IFN- γ .

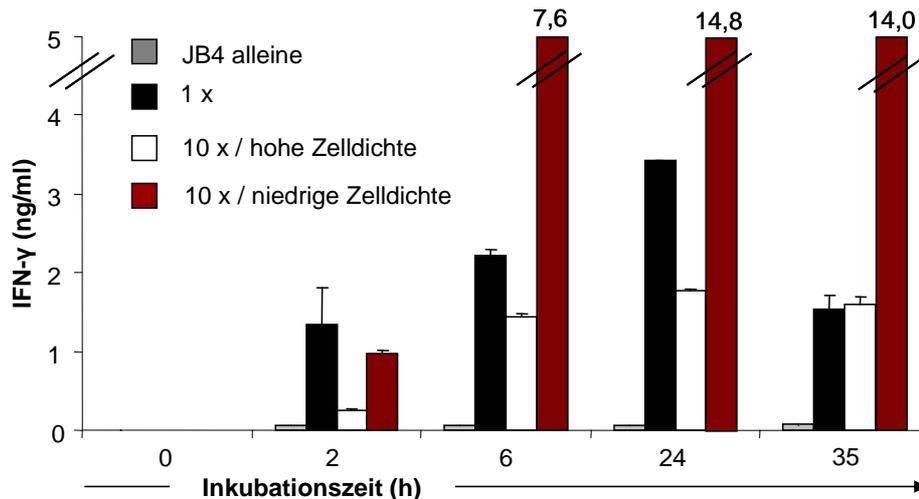


Abb. 4.39: IFN- γ -Sekretion des ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde alleine (graue Balken), mit niedriger (1x, schwarze Balken) bzw. hoher (10x, weiße Balken) Zellzahl an RCC26 für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Parallel wurde ein Ansatz mit hoher Tumorzellzahl, aber erhöhtem Volumen des Kulturmediums mitgeführt (10x/niedrige Zelldichte, rote Balken), so dass die Zellkonzentration in diesem Ansatz der Zellkonzentration des Ansatzes 1x entsprach (1×10^6 Zellen/ml). Die Konzentration an IFN- γ wurde in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die gemessenen Mittelwerte aus Doppelmessungen \pm Mittelwertabweichung bezogen auf 5×10^5 ZTL/ml.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die geringe IFN- γ -Sekretion bei hoher Tumorzellzahl (10x/hohe Zelldichte) nicht durch die hohe Anzahl an Tumorzellen bedingt ist. Denn eine hohe Tumorzellzahl kann die ZTL stärker stimulieren, solange die Zelldichte nicht zu hoch ist. Bei hoher Zelldichte wirkt die Anwesenheit der Tumorzellen offensichtlich inhibierend.

Abbildung 4.40 zeigt die relative Änderung des Perforingehalts der ZTL sowie die Anzahl an Perforin⁺-Zellen der vier Parallelansätze. Wurden die ZTL mit einer niedrigen Anzahl an RCC26 (1x) inkubiert, kam es zu keinem Verlust an Perforin⁺-ZTL. Wurden die ZTL hingegen mit einem Überschuss an Tumorzellen bei hoher Zelldichte (10x/hohe Zelldichte) inkubiert, war eine Abnahme an Perforin⁺-ZTL nach sechs Stunden zu beobachten. Bei Koinkubation mit hoher Tumorzellzahl, aber einer niedrigen Zelldichte (10x/niedrige Zelldichte), blieb der Perforingehalt der ZTL über die gesamte Inkubationsdauer erhalten und alle Zellen blieben Perforin⁺.

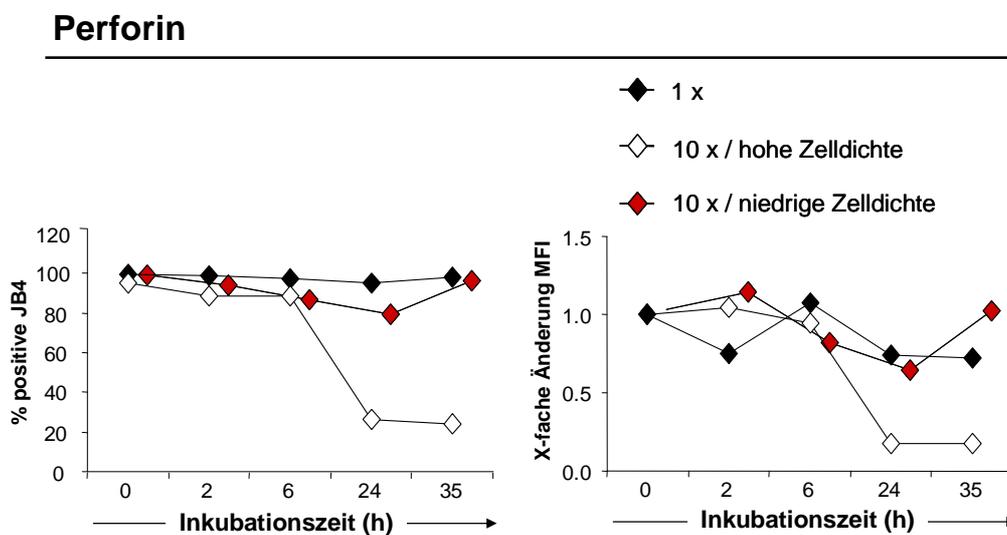


Abb. 4.40: Prozent an Perforin⁺-Zellen sowie die relative Änderung des Perforingehalts im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde nach DiD-Markierung mit niedriger (1x, schwarz) bzw. hoher (10x, weiß) Zellzahl an RCC26 koinkubiert. Parallel wurde ein Ansatz mit hoher Tumorzellzahl, aber erhöhtem Volumen des Kulturmediums mitgeführt (10x/niedrige Zelldichte, rot), so dass die Zellkonzentration in diesem Ansatz der Zellkonzentration des Ansatzes 1x entsprach (1×10^6 Zellen/ml). Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde der Perforingehalt in den ZTL durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Perforin⁺-ZTL (links), sowie die relative Änderung des Perforins normiert auf den Ausgangswert von 0 h (rechts).

Für den Nachweis von aktivem TGF- β wurden die Kulturüberstände der Kokulturanalysen ohne Vorbehandlung in einen TGF- β -spezifischen ELISA eingesetzt. Für den Nachweis von Gesamt-TGF- β wurden die Proben vor Einsatz in den ELISA mit Säure behandelt und wieder neutralisiert (siehe Kapitel 3.10.2). In Abbildung 4.41 ist die gemessene Konzentration an aktivem und gesamtem TGF- β in den Überständen der verschiedenen Ansätze dargestellt. Dabei ist die tatsächlich gemessene Konzentration an TGF- β angegeben. Es wurde nicht, wie bei der

Darstellung des sezernierten IFN- γ , auf die Zellzahl der ZTL pro Volumeneinheit normalisiert, da hier die TGF- β -Konzentration, welcher die ZTL ausgesetzt waren, entscheidend ist. Gesamt-TGF- β war in allen drei Ansätzen detektierbar, mit leicht erhöhter Menge bei Tumorzellüberschuss und hoher Zelldichte (10x/hohe Zelldichte). Aktives TGF- β wurde dagegen nur im Kulturüberstand bei hoher Tumorzellzahl und hoher Zelldichte (10x/hohe Zelldichte) detektiert.

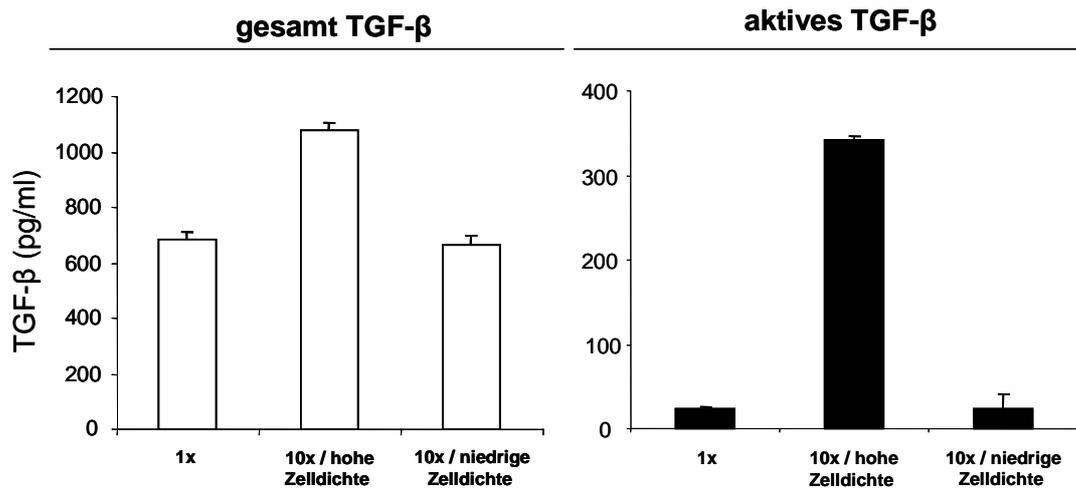


Abb. 4.41: Nachweis von gesamtem und aktivem TGF- β im Kulturmedium während der Inkubation von JB4 mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde mit niedriger (1x) bzw. hoher (10x / hohe Zelldichte) Zellzahl an RCC26 für 35 h koinkubiert. Ebenfalls wurde ein Ansatz mit hoher Tumorzellzahl, aber erhöhtem Volumen mitgeführt (10x/niedrige Zelldichte), so dass die Zellkonzentration in diesem Ansatz der Zellkonzentration des Ansatzes 1x entsprach (1×10^6 Zellen/ml). Die Konzentration an gesamtem und aktivem TGF- β wurde im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dublikaten \pm Mittelwertabweichung der tatsächlich vorhandenen Konzentration an TGF- β .

Die Aktivierung des latenten TGF- β im Ansatz mit hoher Tumorzelldichte könnte durch den erniedrigten pH-Wert unter diesen Kulturbedingungen erfolgt sein (Abbildung 4.36).

4.5.4 Einfluss von RCC26-Kulturüberstand und TGF- β auf die Effektorfunktion von zytotoxischer T-Lymphozyten

Um den Einfluss von TGF- β und Tumorkulturüberstand auf die Effektorfunktion von Perforin⁺-ZTL während der Stimulierung zu untersuchen, wurde der ZTL Klon JB4 mit RCC26 bzw. mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert. PMA ist ein Analogon von Diacylglycerol, das in der Signalweiterleitung nach TZR-Stimulierung beteiligt ist. Ionomycin ist ein Ionophor und führt zu einem Anstieg von intrazellulärem Calcium. Somit können ZTL unabhängig von einer Stimulierung über den TZR stimuliert werden. Es wurde die IL-2- und IFN- γ -Sekretion der ZTL, die CD107-Oberflächenrekrutierung sowie die Abnahme an Perforingehalt nach Stimulierung der ZTL untersucht.

Der ZTL Klon JB4 wurde mit RCC26 in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β über sechs Stunden stimuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die IL-2-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. In einem Parallelansatz wurden die ZTL mit Kulturüberstand der Tumorzelllinie RCC26 inkubiert, der durch Kultur von RCC26 bei hoher Zellzahl analog dem Ansatz „RCC26 10x“ gewonnen wurde. Abbildung 4.42 gibt die gemessene Konzentration an IL-2 wieder. Stimulierung von JB4 mit RCC26 führte bereits nach zwei Stunden zu messbarem IL-2, wobei die Menge an IL-2 über sechs Stunden weiter zunahm. In Anwesenheit von TGF- β oder Kulturüberstand von RCC26 fiel die IL-2-Sekretion deutlich geringer aus. TGF- β und Tumorkulturüberstand hatten vergleichbaren inhibierenden Einfluss auf die IL-2-Sekretion der ZTL.

Der ZTL Klon JB4 wurde mit PMA und Ionomycin in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β für eine Stunde stimuliert und anschließend die IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt

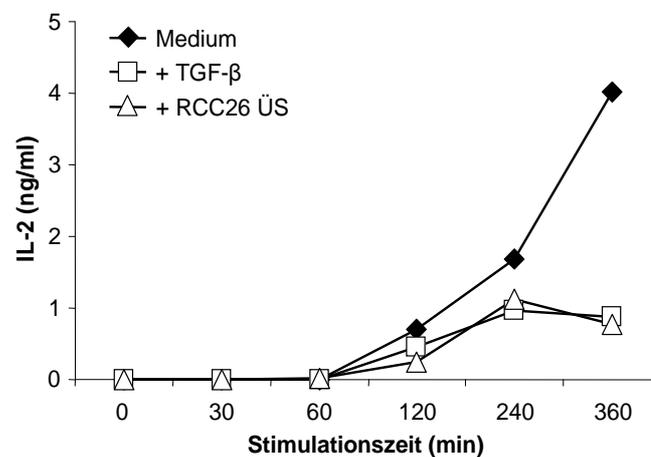


Abb. 4.42: IL-2-Sekretion von JB4 während der Stimulierung mit RCC26 in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β bzw. RCC26-Kulturüberstand. Der ZTL Klon JB4 wurde über 6 h ohne bzw. mit TGF- β (1 ng/ml) oder Kulturüberstand von RCC26 (1:1 verdünnt) mit RCC26 stimuliert. Die Konzentration an IL-2 in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten \pm Mittelwertabweichung.

(Abbildung 4.43). Es zeigte sich, dass bei Stimulation der ZTL ohne Anwesenheit von TGF- β bereits nach einer Stunde über 500 pg/ml IFN- γ im Überstand nachweisbar war. In Anwesenheit von TGF- β wurde konzentrationsabhängig weniger IFN- γ von den ZTL sezerniert. ZTL ohne Stimulierung zeigten keine IFN- γ -Sekretion.

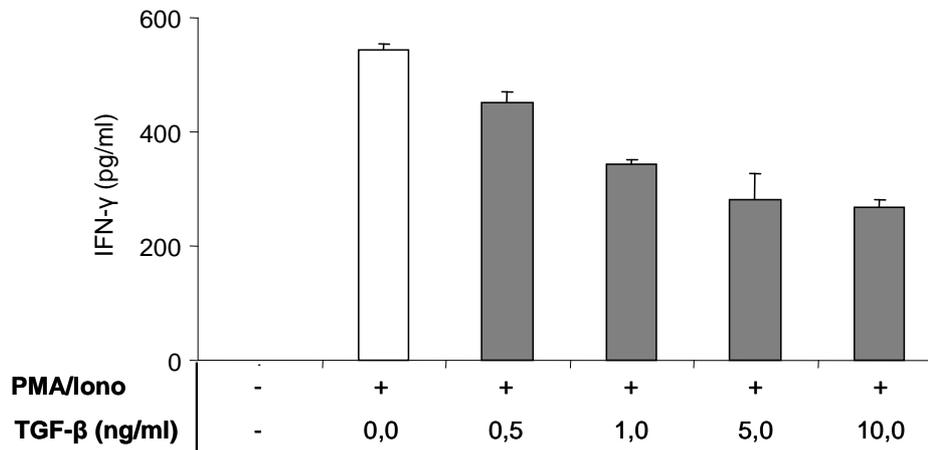


Abb. 4.43: IFN- γ -Sekretion von JB4 nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β . Der ZTL Klon JB4 wurde mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) in Ab- bzw. Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an TGF- β (0,5 ng/ml bis 10 ng/ml) für 1 h stimuliert. Zudem wurde eine Kontrolle ohne Stimulierung der ZTL mit PMA/Ionomycin mitgeführt. Anschließend wurde die Konzentration an IFN- γ in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten \pm Mittelwertabweichung.

Um zu untersuchen, ob TGF- β die Degranulation des ZTL Klon JB4 nach Stimulierung mit Zielzellen inhibiert, wurde der ZTL Klon JB4 für vier Stunden mit RCC26 (HLA-A2⁺) bzw. KT-195 (HLA-A2⁻) stimuliert und die Oberflächenmobilisierung von CD107a/b in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β gemessen. Abbildung 4.44 zeigt die Fluoreszenzintensitäten von CD107a/b während der Stimulierung der ZTL mit den Tumorzellen. Wurden die ZTL mit RCC26 inkubiert, kam es bei Abwesenheit von TGF- β zu einer CD107a/b-Oberflächenmobilisierung, die nach zwei Stunden ein Plateau erreichte. Die Anwesenheit von TGF- β während der Stimulierung von JB4 mit RCC26 beeinflusste die Degranulation der ZTL nicht. Wurden sie mit der Antigen⁻-Zelllinie KT-195 koinkubiert, blieb eine Degranulation aus.

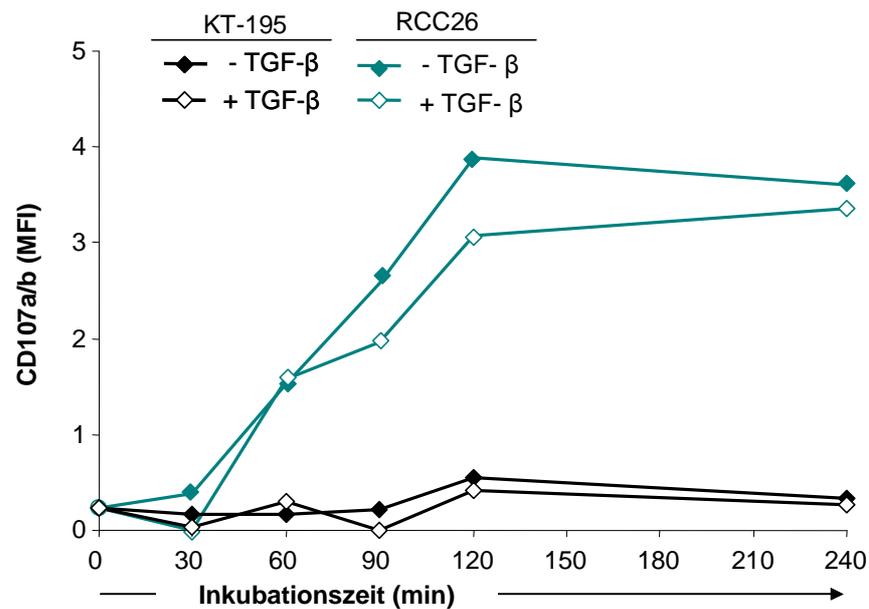


Abb. 4.44: CD107a/b-Oberflächenrekrutierung des ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit RCC26 bzw. KT-195 in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF-β. Der ZTL Klon wurde nach DiD-Markierung in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF-β (1 ng/ml) mit RCC26 (grüne Symbole) oder KT-195 (schwarze Symbole) inkubiert. Während der Inkubation waren fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD107a und CD107b anwesend. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die Fluoreszenzintensität von CD107a/b durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die MFI von CD107a/b der ZTL. Von der MFI wurde die MFI des jeweils parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers abgezogen.

Um zu untersuchen, ob TGF-β die Ausschüttung des Perforins während der Stimulierung mit PMA und Ionomycin beeinflusst, wurde der ZTL Klon JB4 nach Stimulierung einer intrazellulären FACS-Färbung auf Perforin unterzogen. In Abbildung 4.45 ist der Gehalt an Perforin in den ZTL nach Stimulation von einer Stunde dargestellt. Wurden die ZTL mit PMA und Ionomycin stimuliert, erniedrigte sich der Perforingehalt deutlich gegenüber den unstimulierten ZTL, was auf Ausschüttung von Perforin zurückzuführen ist. In Anwesenheit von TGF-β kam es zu einer vergleichbaren intrazellulären Abnahme des Perforins. TGF-β beeinflusst die Ausschüttung von Perforin während der Stimulierung der ZTL nicht.

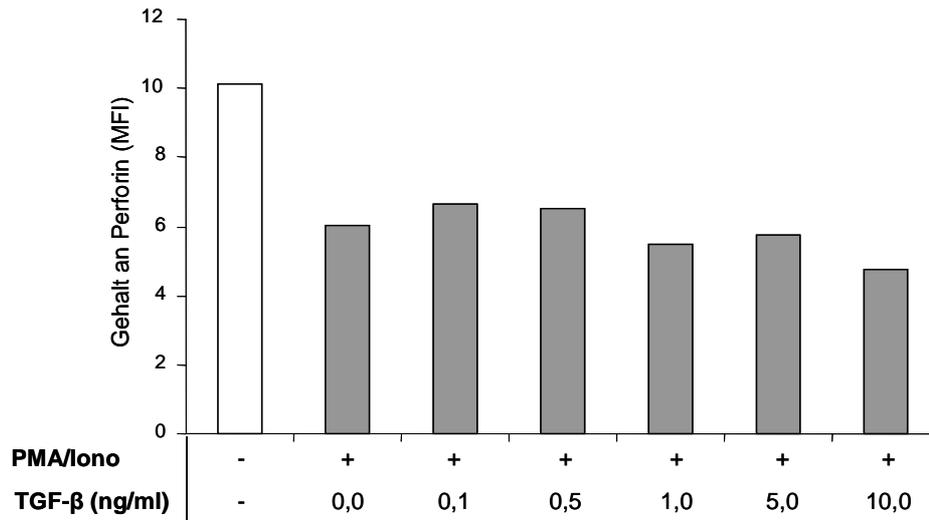


Abb. 4.45: Gehalt an Perforin im ZTL Klon JB4 nach Stimulierung mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin (Iono) in Ab- bzw. Anwesenheit von TGF- β . Der ZTL Klon JB4 wurde mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) in Ab- bzw. Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an TGF- β (0,1 ng/ml bis 10 ng/ml) für 1 h stimuliert. Zudem wurde eine Kontrolle ohne Stimulierung der ZTL mit PMA/Ionomycin mitgeführt. Anschließend wurde der Gehalt an Perforin in den ZTL durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die gemessene MFI von Perforin.

4.6 RANTES als Effektormolekül zytotoxischer T-Lymphozyten

Das Chemokin RANTES wird während der Entwicklung von naiven T-Lymphozyten zu reifen zytotoxischen Effektorzellen zeitgleich mit Perforin, Granzym A und Granzym B exprimiert {Ortiz BD, 1997 #38}. RANTES wird in speziellen intrazellulären Kompartimenten gespeichert und nach Stimulierung des TZR ausgeschüttet (41, 42). Wegen dieser Gemeinsamkeit zwischen RANTES und den Effektormolekülen wurde von der Gruppe Nelson (Klinische Poliklinik, LMU) postuliert, dass RANTES eine Rolle bei der zytotoxischen Effektorfunktion von T-Lymphozyten spielen könnte.

In gemeinsamen Vorarbeiten der Gruppen Nelson und Nöbner wurde gezeigt, dass RANTES parallel mit Perforin zur Zielzellkontaktstelle polarisiert und bei Zielzellerkennung auf die Oberfläche der Zielzelle übertragen wird (89). RANTES blieb auf den resultierenden apoptotischen Tumorzellen vorhanden. Da apoptotische Zellen im Verlauf einer Immunantwort durch Makrophagen aufgenommen und beseitigt werden (45), wurde im Rahmen dieser Arbeit

untersucht, ob das Vorhandensein von RANTES auf apoptotischen Zellen deren Phagozytose durch Makrophagen beeinflusst. Das experimentelle Modell beinhaltete aus peripheren Blutmonozyten generierte Makrophagen und RANTES⁺ apoptotische Tumorzellen, die durch Koinkubation von Tumorzellen mit ZTL hergestellt wurden. Die RANTES⁺ apoptotischen Tumorzellen wurden zu den Makrophagen gegeben und die Phagozytose dieser durch die Makrophagen durchflusszytometrisch bestimmt.

4.6.1 Herstellung und Charakterisierung humaner Makrophagen

Zur Herstellung der humanen Makrophagen wurden peripheren Blutmonozyten mittels *magnetic cell sorting* (MACS) mit magnetischen Kügelchen, die einen Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD14 tragen, isoliert. Die isolierten Monozyten wurden mit dem Zytokin *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) kultiviert. Nach sieben bis acht Tagen wurden die Makrophagen mittels FACS-Analyse auf die Oberflächenmarker CD14, CD209, CD11c, CD1a, CD36, CCR1 und CCR5 analysiert und mit dendritischen Zellen (DZ) verglichen, die aus Monozyten durch Kultur in IL-4 und GM-CSF generiert wurden. CD14 wurde auf Makrophagen, aber nicht auf DZ detektiert, während CD209 spezifisch auf DZ und kaum auf Makrophagen detektiert wurde (Abbildung 4.46A). Beide Zellpopulationen zeigten eine Oberflächenexpression des myeloischen Markers CD11c. Der Oberflächenmarker CD1a, der der Antigenpräsentation von Lipiden und Glycolipiden dient, war nur auf DZ detektierbar, wobei eine negative und eine positive DZ-Population vorhanden war.

Zusätzlich zu den Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarkern wurden die Makrophagen auf das Oberflächenmolekül CD36 untersucht, welches einen allgemeinen Rezeptor für die Aufnahme von apoptotischen Zellen darstellt (45). *In vitro* generierte Makrophagen exprimierten CD36 (Abbildung 4.46B). Des Weiteren wurden die Makrophagen auf die Oberflächenexpression der RANTES-Rezeptoren CCR1 und CCR5 untersucht. Beide Rezeptoren wurden von den Makrophagen exprimiert (Abbildung 4.46B).

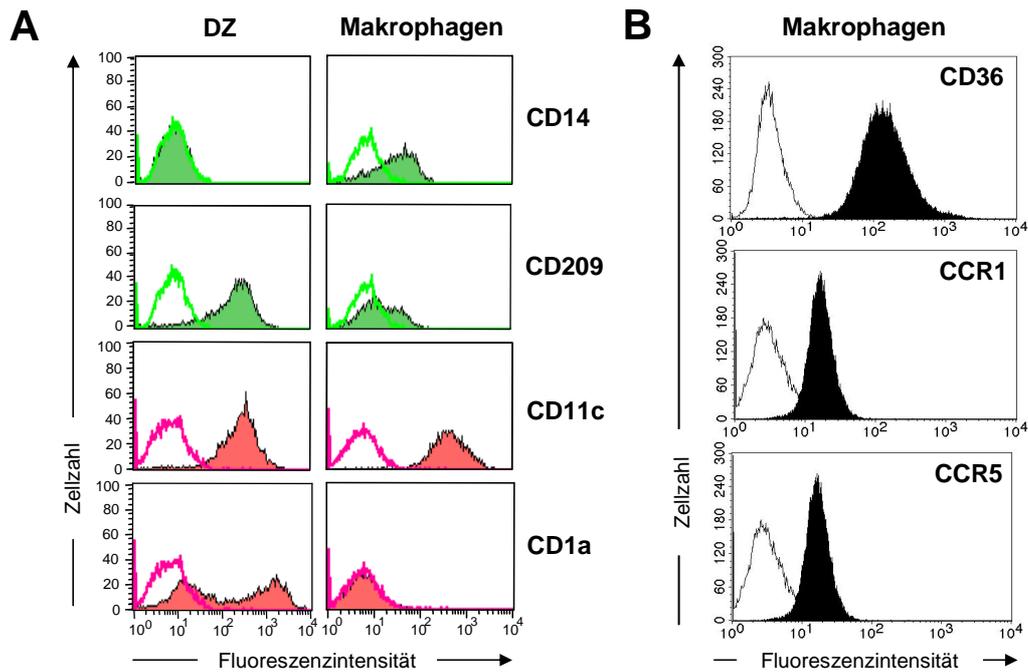


Abb. 4.46: Oberflächenexpression von CD14, CD209, CD11c, CD1a, CD36, CCR1 und CCR5 auf dendritischen Zellen und Makrophagen. Dendritische Zellen (DZ) und Makrophagen wurden mit Antikörpern gegen CD14, CD209, CD11c, CD1a bzw. Makrophagen gegen CD36, CCR1 und CCR5 gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression dieser untersucht. A. Oberflächenexpression von CD14, CD209, CD11c und CD1a der DZ und Makrophagen. B. Oberflächenexpression von CD36, CCR1 und CCR5 der Makrophagen. Die ausgefüllten Kurven stellen die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Oberflächenmarker und die offenen Kurven jeweils die Fluoreszenzintensität des parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers dar.

Die Makropinozytose-Aktivität der Makrophagen bzw. DZ wurde durch Aufnahme von FITC-markiertem Dextran quantifiziert. Dazu wurden Makrophagen und DZ für 30 Minuten mit FITC-Dextran inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität der Zellen im Kanal von FITC durchflusszytometrisch bestimmt. Makrophagen im Vergleich zu DZ nahmen größere Mengen an FITC-Dextran auf (Abbildung 4.47).

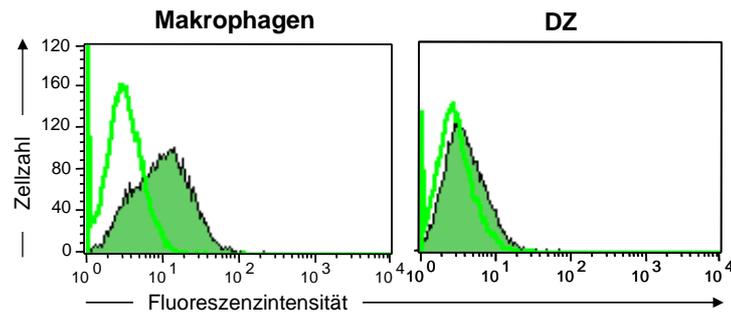


Abb. 4.47: Aufnahme von FITC-Dextran durch Makrophagen und dendritischen Zellen. Zu Makrophagen und dendritischen Zellen (DZ) wurde FITC-Dextran (10 µg/ml) für 30 min gegeben. Die Aufnahme von FITC-Dextran durch die Makrophagen bzw. DZ wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von FITC der Zellen, die ohne (offenen Kurven) bzw. mit (ausgefüllte Kurven) FITC-Dextran inkubiert wurden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sich *in vitro* mittels GM-CSF aus Monozyten generierte Makrophagen von mit GM-CSF und IL-4 generierten DZ durch Anwesenheit von CD14 und der Abwesenheit von CD209 sowie höherer Makropinozytose-Aktivität entscheiden. *In vitro* generierte Makrophagen exprimieren die RANTES-Rezeptoren CCR1 und CCR5.

4.6.2 Einfluss von RANTES auf die Phagozytose ZTL-induzierter apoptotischer Tumorzellen durch Makrophagen

Um RANTES⁺ apoptotische Tumorzellen zu erhalten, wurde die Melanomzelllinie Mel 93.04 A12.1 im Verhältnis 1:1 mit dem Tyrosinase-spezifischen ZTL Klon TyrF8 für 24 Stunden inkubiert. Um die Aufnahme der apoptotischen Tumorzellen durch die Makrophagen durchflusszytometrisch zu quantifizieren, wurden die Tumorzellen vor Apoptose-Induktion mit dem Membranfarbstoff DiD markiert. Die durch T-Zellkoinkubation entstandenen apoptotischen Tumorzellen wurden im Verhältnis 3:1 zu den Makrophagen gegeben und bei 37°C bzw. 4°C inkubiert. Nach 30 min bzw. 60 min wurde das Zellgemisch sowie die Makrophagen alleine mit Antikörpern gegen CD11c gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Anhand der Oberflächenexpression von CD11c wurden die Makrophagen von den ZTL und den

apoptotischen Tumorzellen unterschieden und für die Analyse ausgewählt (Abbildung 4.48A, schwarze Rechtecke). Die CD11c⁺-Makrophagen, die apoptotische Tumorzellen aufgenommen hatten (Histrogramme in Abbildung 4.48C), ließen sich als doppelpositiv für CD11c und DiD erkennen. Die mediane Fluoreszenzintensität über den Farbstoff DiD der gesamten Makrophagenpopulation (CD11c⁺) ist als Phagozytoseindex in Abbildung 4.48C dargestellt (blaue Balken). Es zeigte sich, dass Makrophagen bereits nach 30 Minuten apoptotische Tumorzellen aufgenommen hatten und sich die Aufnahme über die Zeit erhöhte (von MFI 200 auf MFI 632).

Um eine Beteiligung des RANTES bei diesem Vorgang nachzuweisen, wurden die Rezeptoren von RANTES auf den Makrophagen durch Met-RANTES blockiert. Das Molekül Met-RANTES trägt im Unterschied zu RANTES am Aminoterminal zusätzlich die Aminosäure Methionin, wodurch es einen Antagonisten für die RANTES-Rezeptoren darstellt (99). Durch Bindung von Met-RANTES an CCR1 und CCR5 wird eine Signalweiterleitung durch RANTES verhindert.

Die Makrophagen wurden vor Inkubation mit den apoptotischen Tumorzellen für 30 min mit Met-RANTES vorinkubiert. Die mit Met-RANTES vorbehandelten Makrophagen zeigten eine deutlich niedrigere Phagozytoseaktivität gegenüber den unbehandelten Makrophagen (ohne Met-RANTES MFI 200 vs. mit Met-RANTES MFI 43 nach 30 min) (Abbildung 4.48C). Dies zeigt, dass eine Signalweiterleitung über die RANTES-Rezeptoren an der Phagozytose ZTL-induzierte RANTES⁺ apoptotische Tumorzellen durch Makrophagen involviert ist. Die RANTES-unabhängige Basisphagozytose könne über CD36 laufen. Dies wurde hier aber nicht untersucht. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass RANTES auf apoptotischen Zellen ein Verstärkersignal darstellt, wodurch ZTL-induzierte apoptotische Tumorzellen effizienter von Makrophagen aufgenommen werden.

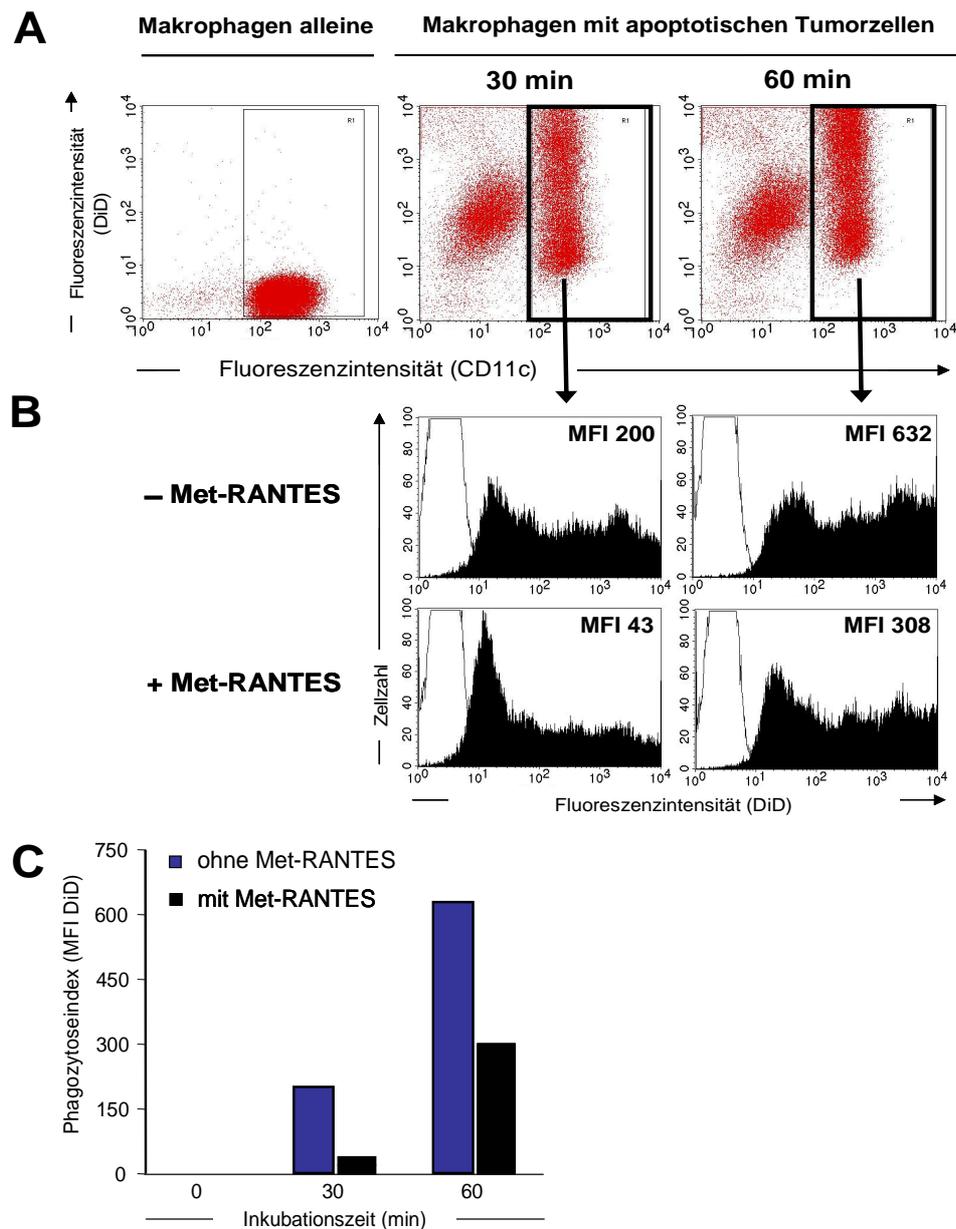


Abb. 4.48: Phagozytose von ZTL-induzierten apoptotischen Tumorzellen durch Makrophagen mit bzw. ohne Vorinkubation mit Met-RANTES. Die Tumorzelllinie Mel 93.04 A12.1 wurde mit dem ZTL Klon TyrF8 für 24 h im Verhältnis 1:1 bei 37°C inkubiert. Zuvor wurden die Tumorzellen mit dem Membranfarbstoff DiD markiert. Die resultierenden apoptotischen Tumorzellen wurden anschließend für die angegebenen Zeitspannen bei 4°C bzw. 37°C im Verhältnis 3:1 zu adhärennten Makrophagen gegeben, die für 30 min mit bzw. ohne Met-RANTES (5 µg/ml) vorinkubiert wurden. Ein Ansatz ohne apoptotische Tumorzellen wurde mitgeführt (Makrophagen alleine). Nach Ernte der Makrophagen wurden sie mit einem Antikörper gegen CD11c gefärbt und auf den Gehalt an apoptotischen Tumorzellen (MFI von DiD) durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von CD11c⁺ gegen DiD des Zellgemischs als Wolkendiagramme (A). Die Histogramme in B zeigen die der Fluoreszenzintensität von DiD der Makrophagenpopulation (schwarze Rechtecke in A), die entweder bei 4°C (offenen Kurven) bzw. 37°C (schwarze Kurven) inkubiert wurden. Angegeben ist jeweils die MFI von DiD der Makrophagen. Die MFI-Werte der mitgeführten Phagozytoseansätze bei 0°C wurden jeweils abgezogen. C. Graphische Darstellung der in B angegebenen MFI in Balken als Phagozytoseindex der Makrophagen, die ohne (blau) bzw. mit Met-RANTES (schwarz) vorinkubiert wurden.

5 Diskussion

Bei der Bekämpfung von virusinfizierten und entarteten Zellen spielen zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle, indem sie diese erkennen und abtöten (1). Der zytotoxische Effektormechanismus von ZTL beruht auf der Freisetzung von zytotoxischen Effektormolekülen nach Zielzellerkennung. Diese sind in speziellen Kompartimenten, den lytischen Granula, in den zytotoxischen T-Lymphozyten gespeichert und lösen nach Eintritt in die Zielzelle eine Signalkaskade aus, die zur Apoptose („Selbstmord“) der Zielzelle führt (1). Die Freisetzung der in den lytischen Granula gespeicherten Effektormoleküle erfolgt nach Erkennung von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen auf der Zielzelle durch den T-Zell-Rezeptor (TZR) (100). Basierend auf der zytotoxischen Funktion aktivierter CD8⁺-T-Lymphozyten stellt der adoptive T-Zell-Transfer eine viel versprechende alternative Behandlung zur klassischen Krebstherapie dar (101-103). Obwohl die Herstellung antigenspezifischer T-Zellen mit nachgewiesener Tumorreaktivität mit den heutigen Techniken meist gut gelingt, blieben bis jetzt die erhofften klinischen Erfolge weitgehend aus (104). Damit adoptiv transferierte Effektorzellen gegen den Tumor vorgehen können, muss die Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten am Tumor gegeben sein. Gelangen T-Lymphozyten in den Tumor können inhibierenden Faktoren und/oder regulatorische T-Zellen zu einer Inhibition der T-Zell-Effektorfunktion führen (105) (106). Um einer Inhibition der Effektorfunktion entgegenwirken zu können, ist es notwendig, den Einfluss des Tumormilieus auf die Effektorfunktion antigenspezifischer T-Lymphozyten besser zu verstehen.

Als Modell eines Tumortyps mit ausgeprägtem Lymphozyteninfiltrat, aber fehlender Kontrolle des Tumorwachstums, untersucht die Arbeitsgruppe bereits mehrere Jahre die Immunantwort gegen das Nierenzellkarzinom. Literaturdaten und Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten direkt nach Isolierung aus dem Tumorgewebe keine Zytotoxizität aufweisen (60, 107). Entfernt man sie hingegen aus dem Tumormilieu und behandelt sie mit dem Zytokin IL-2 können sie lytische Effektorfunktion gewinnen (52, 66, 107). Dies deutet darauf hin, dass die Effektorfunktion von infiltrierenden T-Lymphozyten durch das Tumormilieu inhibiert sein könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeschnitte von verschiedenen Nierenzellkarzinomen auf das zytotoxische Profil der infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten mittels Dreifachimmunfluoreszenzfärbungen histologisch untersucht. Durch diese Methode werden

Lymphozyten direkt am Ort (*in situ*), wo sie noch dem Tumormilieu ausgesetzt sind, betrachtet und es können vorhandene Funktionsdefizite erkannt werden. Da die Untersuchungen der Gewebeproben jedoch weitgehend deskriptiv sind und aus den Beobachtungen nur Hypothesen bezüglich potentieller inhibierender Mechanismen abgeleitet werden können, wurde weiterführend ein *in vitro* Modellsystem mit zytotoxischen T-Zellklonen angewendet, um den Einfluss des Tumormilieus auf zytotoxische T-Lymphozyten mechanistisch zu analysieren. Dabei wurde im speziellen der Einfluss Tumormilieu-assoziiierter Faktoren, wie die Tumorzell-dichte, das Zytokin TGF- β und die Azidose, auf die Effektorfunktion von zytotoxischen T-Lymphozyten sowie auf den Gehalt der Effektormoleküle Perforin, Granzym A und Granzym B untersucht. Zusätzlich wurde der Gehalt des Chemokins RANTES in den zytotoxischen T-Lymphozyten analysiert und die Bedeutung einer RANTES-Sekretion nach Tumorzellerkennung für die Beseitigung der resultierenden apoptotischen Tumorzellen durch Makrophagen evaluiert.

5.1 Tumorzellerkennung durch infiltrierende CD8⁺-Effektorlymphozyten am Beispiel des Nierenzellkarzinoms

Zunächst wurde nachgewiesen, ob die im Tumor vorhandenen CD8⁺-Lymphozyten differenzierte Effektorzellen darstellen. Dazu wurde ein Antikörper gegen GMP-17 (*granule membrane protein of 17 kDa*) verwendet, der ein Protein in der Membran lytischer Granula nachweist (14, 15). Da nur zu zytotoxischen Effektorzellen differenzierte CD8⁺-Lymphozyten nicht aber naive Zellen lytische Granula besitzen, kann mit diesem Antikörper zwischen Effektorzellen und naiven Zellen unterschieden werden. Dieser Antikörper wird auch in der pathologischen Evaluation benutzt, um reaktives zelluläres Infiltrat in Geweben zu quantifizieren. Eine Korrelation der Anzahl an GMP-17⁺-Zellen mit einer Abstoßungsreaktion wurde für Lebertransplantate gezeigt (108).

Insgesamt wurden mehr als 20 verschiedene Nierenzellkarzinomgewebe mit dem GMP-17-spezifischen Antikörper evaluiert, fünf davon im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Konsistent ergab sich, dass alle CD8⁺-Lymphozyten auch GMP-17⁺ waren, für die hier quantifizierten war es ein prozentualer Anteil von 93 % bis 95 %. Die CD8⁺-Lymphozyten, die im Tumorgewebe vorhanden waren, sind somit differenzierte Effektorlymphozyten. Als Kontrollgewebe wurde ein

Bioplat eines Nierentransplantats verwendet, welches histopathologisch als akute Abstoßung mit zytotoxischem Zellinfiltrat charakterisiert worden war (pathologische Bewertung: Pathologisches Institut, LMU, München). Weitere Kontrollgewebe waren zwei Leberbioplate, die histopathologisch zellzerstörende Immunreaktionen zeigten (pathologische Bewertung: Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie, DKFZ, Heidelberg). Die drei Kontrollgewebe zeigten einen medianen prozentualen Anteil an GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten von 83 %. Die Nierenzellkarzinome hatten somit sogar einen höheren Anteil an CD8⁺-Lymphozyten mit lytischen Granula im Vergleich zu den Kontrollgeweben. Dennoch war bei letzteren gewebezerstörende Effektoraktivität erkennbar, bei den Nierenzellkarzinomen aber nicht. Dies deutet auf eine fehlende Effektorfunktion der CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom hin.

Dabei könnte ein Unterschied zwischen den Nierenzellkarzinomen und den Kontrollgeweben der fehlende Auslöser zur zytotoxischen Reaktion der CD8⁺-Lymphozyten sein. Eine zytotoxische Reaktion durch Effektorzellen wird durch die Erkennung von Peptiden, die über MHC-Klasse-I-Moleküle auf Zielzellen präsentiert werden, ausgelöst. Das Fehlen bzw. eine Abregulation der MHC-Klasse-I-Moleküle sowie ein Verlust von Antigenen auf Tumorzellen sind verbreitete Phänomene von Tumoren, um sich einer Immunantwort zu entziehen (67, 109). Ebenfalls wird oft zur Diskussion gestellt, ob die im Tumorgewebe vorhandenen Lymphozyten tumorreaktives Potential haben oder sich dort als Folge einer entzündlichen Reaktion unabhängig von einer Tumorreaktivität befinden (110) (111). Antigen-spezifische T-Lymphozyten im Gewebe zu quantifizieren ist eine technische Herausforderung und die Schätzungen reichen bis 40 % tumorreaktiven Zellen (112). Mittels Tetramer-Technik können T-Zell-Populationen identifiziert werden, die einen bestimmten MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex erkennen. Mit dieser Methode lassen sich nur ganz gezielt bestimmte T-Zell-Populationen aus der Gesamtheit aller potentiell antigen-spezifischen T-Zellen detektieren. Meist wird die Tetramer-Technik an isolierten tumorinfiltrierenden Lymphozyten angewandt. Die Methode lässt sich auch *in situ* anwenden, so dass man die anatomische Lokalisation relativ zur Tumorzelle bestimmen kann (113). Mit dieser Methode ist es aber nicht möglich zu unterscheiden, ob die antigen-spezifischen T-Zellen anwesend, aber nicht aktiv sind, oder sich in einem aktiven Erkennungsprozess befinden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methodik basierend auf dem Nachweis der Exozytose der lytischen Granula zytotoxischer T-Lymphozyten entwickelt. Durch Beurteilung der spezifischen intrazellulären Lokalisation des GMP-17 in den Effektorzellen kann durch diese

Methode aktive Tumorzellerkennung bildgebend in Gewebeschnitten nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 4.5, 4.6 und 4.8). Im Gegensatz zur Tetramer-Technik ist diese Methode unabhängig von der Kenntnis potentieller tumorassoziierter Antigene und MHC-Moleküle. Sie erfasst alle Lymphozyten, die sich zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme in aktiver Tumorzellerkennung und Degranulation befinden. Da für Nierenzellkarzinome kaum tumorassozierte Antigene bekannt sind, wäre die Tetramer-Technik auch nur eingeschränkt anwendbar und aussagekräftig. Die neue bildgebende Methode wurde in einem *in vitro* Modellsystem evaluiert. Dieses Modellsystem beinhaltete einen zytotoxischen T-Zellklon mit bekannter Spezifität und Tumorzellen mit gesicherter Antigenpräsentation. Um zu dokumentieren, dass sich Kontakte mit Antigenerkennung von solchen ohne Erkennung unterscheiden lassen, wurde parallel auch eine Tumorzelllinie getestet, der das Antigen fehlte. Die zytotoxischen T-Zellen wurden jeweils auf einen Zellrasen der entsprechenden Tumorzelllinien gegeben und danach die Anzahl der T-Zellen mit einer synaptischen Lokalisation des GMP-17 mittels konfokaler Lasermikroskopie ausgewertet. Bei Verwendung der Antigen⁺-Tumorzelllinie wurde ein prozentualer Anteil von 39 % an zytotoxischen T-Zellen mit synaptischer Lokalisation des GMP-17 gefunden (siehe Abbildung 4.6 und 4.7). Wurden die T-Zellen hingegen zu Antigen⁻-Tumorzellen gegeben, so hatten nur 9 % der T-Zellen synaptisches GMP-17. Diese Beobachtung wurde mit zwei weiteren zytotoxischen T-Zellklonen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Somit können anhand der subzellulären Lokalisation des GMP-17 T-Zell-Tumorzellkontakte mit Antigenerkennung und durch Tumorzellerkennung ausgelöste Degranulationsprozesse von solchen ohne Antigenerkennung und ohne Degranulation differenziert werden.

Nierenzellkarzinom- und Kontrollgewebe wurden nach den selben Kriterien des *in vitro* Modellsystems ausgewertet. Es zeigte sich, dass in allen Geweben CD8⁺-Lymphozyten mit synaptischer Lokalisation des GMP-17 vorhanden waren (siehe Abbildung 4.8 und 4.9). Der Anteil dieser Zellen war in den Nierenzellkarzinomen etwas geringer als in den Kontrollgeweben (medianer Anteil bei Nierenzellkarzinomen 34 % vs. bei Kontrollen 46 %). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant ($p = 0,25$). Offensichtlich gibt es in den Nierenzellkarzinomen eine deutliche Anzahl an infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten, die Antigen erkennen und ihre lytischen Granula synaptisch fusioniert haben.

Als weiteres Merkmal zytotoxischer T-Lymphozyten wurde die Präsenz des Effektormoleküls Perforin untersucht, da dieses Protein zusammen mit Granzymen für eine erfolgreiche Zielzellzerstörung notwendig ist (1). Die Gesamtbeurteilung der Gewebe hinsichtlich der Präsenz von Perforin in den GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten ergab, dass im Nierenzellkarzinomgewebe deutlich weniger CD8⁺-Lymphozyten Perforin besitzen (medianer Anteil 45 %) im Vergleich zu den Kontrollgeweben (medianer Anteil 71 %) (siehe Abbildung 4.3 und 4.4). Da Zielzellerkennung nur zusammen mit entsprechender lytischer Ausstattung (Präsenz von Perforin) zur Zielzellzerstörung führen kann, wurde als Beschreibung des lytischen Potentials einer gewebeinfiltrierenden CD8⁺-Lymphozytenpopulation der Begriff „lytisches Reaktionsprofil“ definiert. Dieses entspricht dem Anteil an GMP-17⁺CD8⁺-Effektorlymphozyten, die eine synaptische Lokalisation des GMP-17 aufweisen und gleichzeitig Perforin⁺ sind. Im Vergleich zu den Kontrollgeweben war das lytische Reaktionsprofil der CD8⁺-Lymphozyten der untersuchten Nierenzellkarzinome (medianer Anteil 25 %) statistisch signifikant niedriger ($p = 0,036$) als das der Kontrollgewebe (medianer Anteil 40 %) (siehe Abbildung 4.11). Somit hat die Nierenzellkarzinom-infiltrierende CD8⁺-Lymphozytenpopulation ein deutlich niedrigeres lytisches Reaktionsprofil als die Lymphozytenpopulation von Kontrollgeweben, bei denen eine gewebezerstörende Effektoraktivität nachgewiesen wurde. Dies könnte ein Grund für die unzureichende Tumorzerstörung sein.

Da neben Perforin noch weitere Faktoren die zytotoxische Aktivität der CD8⁺-Effektorlymphozyten beeinflussen, wie z.B. die Präsenz von Granzymen oder Proteinen, die die Granulafusion und Exozytose regulieren (19, 114) (27), erfasst die hier durchgeführte Analyse nur die Mindestvoraussetzung für eine erfolgreiche Zielzellzerstörung. Das lytische Reaktionsprofil der Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten dürfte sich unter Berücksichtigung zusätzlicher Faktoren noch weiter erniedrigen, insbesondere da aus der Literatur (115) und aus unpublizierten Daten der Arbeitsgruppe Defizite für Granzym B bekannt sind. Auch Resistenzen von Tumorzellen gegen einen Apoptose-induzierten Zelltod wurden beschrieben, wodurch sich die Tumorzellen einer Abtötung durch zytotoxische Lymphozyten auch bei gegebener Ausstattung mit zytotoxischen Effektormolekülen ebenfalls entziehen könnten (116).

Betrachtet man speziell die Perforin⁺GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom hinsichtlich intrazellulärer Lokalisation des GMP-17, so ergaben sich vergleichbare Anteile an

Zellen mit synaptischer Lokalisation des GMP-17 (medianer Anteil 50 %) zum Kontrollgewebe (medianer Anteil 56 %). Somit waren anhand dieser Methode für Perforin⁺CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom keine Degranulationsdefizite erkennbar (siehe Abbildung 4.12).

5.2 Funktionelle Defizite Perforin⁻CD8⁺-Effektorlymphozyten

Die Untersuchungen zum Funktionsstatus der CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom zeigten einen vergleichbaren prozentualen Anteil an differenzierten (GMP-17⁺) Effektorzellen im Vergleich zum Kontrollgewebe, aber mit deutlich weniger Perforin⁺-Zellen (medianer Anteil bei Nierenzellkarzinomen 45 % vs. bei Kontrollgewebe 71 %). Ein Fehlen von Perforin in antigenspezifischen T-Lymphozyten wurde in Melanom-infiltrierenden Lymphozyten und bei chronisch viralen Erkrankungen ebenfalls beschrieben (117, 118) (119, 120). Da im Nierenzellkarzinomgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe deutlich mehr Perforin⁻CD8⁺-Lymphozyten gefunden wurden, stellt sich die Frage, welchen Funktionsstatus diese Zellen haben könnten. Mit Hilfe des *in vitro* Modellsystems wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass zytotoxische T-Lymphozyten, die durch Tumorexposition einen Perforin⁻-Status erlangt haben, nicht mehr lytisch sind, bei Zielzellkontakt nicht degranulieren und nach TZR-Stimulation kein IFN- γ sezernieren (siehe Abbildungen 4.25, 4.27 bis 4.29). Da die Expression der CD3 ζ -Kette in den induzierten Perforin⁻-Effektorzellen vergleichbar der in den Perforin⁺-Zellen war (siehe Abbildung 4.30), ist zu vermuten, dass Perforin⁻-Effektorzellen in einem Schritt der TZR-Signaltransduktion nach Aktivierung der CD3 ζ -Kette gestört sind. Um dies zu bestätigen, sollte in Zukunft untersucht werden, ob die Funktionsdefizite auch mit TZR-unabhängiger Stimulation (Phorbol ester, Ionomycin) nachzuweisen sind. Die Präsenz der CD3 ζ -Kette bei *in vitro* generierten Perforin⁻-Effektorzellen entspricht dem Phänotyp der Nierenzellkarzinom-infiltrierenden T-Lymphozyten, die ebenfalls überwiegend CD3 ζ -Kette⁺ waren (61). Auch die Eigenschaft, dass Perforin⁻-Effektorzellen bei Kontakt mit Zielzellen ihre Granula nicht mit der T-Zell-Plasmamembran fusionieren (siehe Abbildung 4.28), entspricht den Befunden im Nierenzellkarzinom: Die *in situ* Analysen ergaben, dass nur sehr wenige der Perforin⁻GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom synaptische Ausrichtung des GMP-17 zeigten (medianer Anteil 24 %) (siehe Abbildung 4.12). Perforin⁻GMP-17⁺CD8⁺-Lymphozyten des reaktiven Kontrollgewebe zeigte ebenfalls kaum GMP-17-Mobilisierung (siehe Abbildung 4.12), so dass es sich vermutlich um eine Eigenschaft Perforin⁻-Zellen handelt,

ihre Granula nicht zu mobilisieren. Wegen der hohen Streuung im Anteil an diesen Zellen im Kontrollgewebe (Spannweite: 8 % bis 39 %), sollten jedoch noch weitere Gewebe diesbezüglich analysiert werden. Da die Perforin⁻-Effektorzellen zumindest im *in vitro* Modell nicht auf Stimulation ansprachen, könnte es sich um funktionell erschöpfte Zellen handeln, wie es bei chronisch viralen Erkrankungen beschrieben wurde. Dabei wurde die Oberflächenexpression des Markers *programmed cell death-1* (PD-1) für „erschöpfte“ Zellen beschrieben (121, 122). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vitro* induzierten Perforin⁻ funktionsunfähigen Effektorzellen exprimierten PD-1 nicht (Daten nicht gezeigt). Immunhistologische Einzelfärbungen zeigen, dass PD-1⁺-Zellen im Nierenzellkarzinom vorkommen (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). Es wurde weiterhin ein Zusammenhang zwischen PD-1-Expression und Tumorprogression bei Nierenzellkarzinompatienten beschrieben (123). Die Untersuchungen zur PD-1-Expression auf Perforin⁻CD8⁺-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom scheiterten derzeit noch an der unzureichenden Sensibilität des PD-1-spezifischen Antikörpers in der Immunfluoreszenzmehrfachfärbung.

5.3 Induktion Perforin⁻ funktionsdefekter CD8⁺-Effektorlymphozyten durch Tumormilieu-assoziierte Faktoren

Da Perforin⁻CD8⁺-Effektorzellen keine oder nur sehr geringe lytische Effektorfunktion haben und deren Anteil in den untersuchten Nierenzellkarzinomen hoch ist, könnte die antitumorale Immunantwort verbessert werden, wenn die Entstehung der Perforin⁻CD8⁺-Zellen verhindert werden könnte. In der Arbeit von Mortarini und Mitarbeitern wurden die Perforin⁻ antigenspezifischen CD8⁺-T-Lymphozyten in Metastasen von Melanompatienten als nicht vollständig differenzierte Effektorzellen bezeichnet (117). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Perforin⁻CD8⁺-T-Zellen durch Einfluss des Tumormilieus aus Perforin⁺ zytotoxischen Effektorlymphozyten entstehen können. Eine gestörte Differenzierung bzw. ein Verlust der Effektorfunktion bei CD8⁺-Lymphozyten können zum selben Endergebnis führen. Es ist jedoch wichtig, den Mechanismus der Entstehung von Perforin⁻CD8⁺-Lymphozyten aufzuklären, da sich unterschiedliche Konsequenzen für mögliche therapeutische Interventionen ergeben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* Modellsystem angewendet, um die Annahme, dass durch den Einfluss von Tumormilieu-assoziierten Faktoren aus Perforin⁺ zytotoxische Effektorlymphozyten Perforin⁻-Zellen entstehen können, zu bestätigen. Es zeigte

sich, dass ein Tumorzellüberschuss, aber nicht eine niedrige Tumorzellzahl zum Perforin-Verlust in den zytotoxischen T-Lymphozyten führt (siehe Abbildung 4.16). Der Perforin-Verlust entstand unabhängig von den verwendeten Tumorzelltypen (Nierenzellkarzinom, Melanom, hämatopoetische Tumorzelllinie, siehe Abbildung 4.17 und 4.20) und auch unabhängig von einer Antigenpräsentation (siehe Abbildung 4.19 und 4.20). Die *in vitro* induzierten Perforin⁻-Effektorlymphozyten hatten auch einen geringeren Gehalt an Granzym B, waren aber weiterhin vollständig Granzym A⁺ und ähnelten so phänotypisch den Perforin⁻ Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten. Weiterhin wurde mit Hilfe des *in vitro* Modellsystems gezeigt, dass Tumormilieu-assoziierte Faktoren, wie Azidose, TGF- β und hohe Tumorzelldichte den Verlust an Perforin in zuvor funktionsfähigen Perforin⁺ zytotoxischen Effektorlymphozyten induzieren (siehe Abbildungen 4.38, 4.34 und 4.40). Azidose, TGF- β und eine hohe Zelldichte sind Eigenschaften des Tumormilieus. So können diese oder ähnliche Faktoren zur Entstehung der Perforin⁻CD8⁺-Effektorzellen in den Nierenzellkarzinomen geführt haben.

In diesem Modellsystem wurde erstmalig auch das Chemokin RANTES untersucht, das bekanntermaßen von zytotoxischen T-Lymphozyten in spezifischen Granula gespeichert und nach TZR-Stimulation ausgeschüttet wird (41, 42). Es zeigte sich, dass der Gehalt des RANTES in zytotoxischen T-Lymphozyten in ähnlicher Weise wie der des Perforins durch Kokultur mit einem Tumorzellüberschuss reduziert wird (siehe Abbildung 4.22). Allgemeine Faktoren, die aus einer hohen Tumorzelldichte resultieren, können daher einen Verlust des Perforins und des RANTES induzieren und damit zu Effektorfunktions-defiziten von zytotoxischen T-Lymphozyten führen.

Die genannten Tumormilieu-assoziierte Faktoren beeinflussten auch Perforin⁺ zytotoxische T-Lymphozyten unmittelbar während einer antigenspezifischen TZR-Stimulierung. So zeigen die *in vitro* Daten dieser Arbeit, dass Azidose und auch TGF- β die Zytokinfreisetzung (IFN- γ und IL-2) blockiert (siehe Abbildung 4.37 und 4.42), wohingegen trotz TGF- β bei Zielzellkontakt Degranulation möglich ist (siehe Abbildung 4.44 und 4.45). Dies entspricht den *in situ* Befunden der Nierenzellkarzinomgewebe: Bei vielen der Perforin⁺CD8⁺-Lymphozyten wurden Degranulationsereignisse anhand synaptischer Lokalisation des GMP-17 nachgewiesen (medianer Anteil 50 %, Abbildung 4.12). IFN- γ ⁺-Lymphozyten konnten jedoch in keinem von 12 untersuchten Nierenzellkarzinomgewebe gefunden werden (89). Da IFN- γ eine wichtige Komponente der antitumoralen Immunantwort ist (124) (125) (126), dürfte die fehlende IFN- γ -

Sekretion der CD8⁺-Lymphozyten der Nierenzellkarzinome ebenfalls eine Komponente darstellen, die zur unzureichenden Tumorzellzerstörung beiträgt.

5.4 Entwicklung von Maßnahmen zur Revertierung des Perforin⁻-Phänotyps zytotoxischer T-Lymphozyten und die Bedeutung des Chemokins RANTES

Durch die *in vitro* Exposition gegenüber Tumormilieu-assoziierten Faktoren können Perforin⁺-Effektorlymphozyten in Perforin⁻-Zellen umgewandelt werden, die dem Phänotyp der Nierenzellkarzinom-infiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten ähneln. Dieses System könnte nun genutzt werden, um therapeutische Interventionsstrategien zu evaluieren. In einem ersten Versuch wurde der Einfluss von IL-2 getestet, welches derzeit als Standardtherapeutikum zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms eingesetzt wird (54). Dabei wurde zu den durch Tumorzellüberschuss induzierten Perforin⁻-Effektorlymphozyten, ohne das zelluläre Milieu zu verändern, IL-2 gegeben. In dem *in vitro* Modellsystem zeigte sich, dass eine 24-stündige IL-2-Exposition in einem unveränderten zellulären Milieu zu keiner Perforinsteigerung in den Perforin⁻-Effektorlymphozyten führt (siehe Abbildung 4.31). Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass die Beseitigung der durch Tumorzellabtötung resultierenden apoptotischen Tumorzellen für eine Reaktivierung der Lymphozyten notwendig ist (127). *In vivo* werden apoptotische Zellen durch Phagozytose schnell beseitigt. Möglicherweise fördern zytotoxische T-Lymphozyten aktiv diesen Prozess, in dem sie zeitgleich mit dem zytotoxischen Vorgang RANTES ausschütten. In vorliegender Arbeit wurde aufbauend aus den Ergebnissen der Doktorarbeit von D. Anz gezeigt, dass zytotoxische T-Lymphozyten beim lytischen Prozess RANTES auf die Oberfläche der Zielzellen übertragen und die resultierenden RANTES⁺ apoptotischen Tumorzellen besser von Makrophagen aufgenommen werden (89). Sezerniertes lösliches RANTES könnte zudem die Rekrutierung von weiteren Phagozyten fördern (128). Die Beteiligung von RANTES bei der schnellen Phagozytose von RANTES⁺ apoptotischen Tumorzellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Blockade der Rezeptoren von RANTES auf den Makrophagen gezeigt: Mit Met-RANTES behandelte Makrophagen zeigten eine deutliche Reduktion der Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen (siehe Abbildung 4.48C). Die Effizienz, mit welcher apoptotische Zellen beseitigt werden, hat immunologische Konsequenzen, da apoptotische Zellen zeitabhängig in sekundäre Nekrosen übergehen und so der primär „nicht entzündliche“ Zelltod entzündungsfördernde Signale aussendet (46). Defiziente Phagozytose kann somit zu

entzündlichen Reaktionen mit kollateraler Gewebeschädigung führen. Die Bedeutung von RANTES bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen *in vivo* und die Entstehung von entzündlichen Prozessen wurde in einem Mausmodell der Glomerulonephritis gezeigt (99). In diesem System führte der Einsatz von RANTES-Antagonisten zur Ansammlung apoptotischer Zellen im Gewebe mit gleichzeitig nachweisbarer autoimmuner Entzündung.

Die hier gezeigten Daten weisen auf eine neue Funktion des von zytotoxischen T-Lymphozyten gespeicherten und bei Zielzellerkennung ausgeschütteten RANTES als Signalvermittler im Regelkreis zwischen Makrophagen und zytotoxischen T-Lymphozyten hin. Die schnelle Beseitigung der apoptotischen Zellen dürfte dazu beitragen, dass bei der Beseitigung Antigen⁺-Zellen durch zytotoxische Effektorzellen keine entzündlichen Signale ausgesendet werden, die umliegendes gesundes Gewebe (Antigen⁻-Zellen) schädigen könnten. Ob die gezielte Übertragung von RANTES auf Zielzellen beim lytischen Prozess und die Phagozytose der resultierenden apoptotischen Zellen durch Makrophagen für den Erhalt der lytischen Effektorfunktion wichtig ist, soll in zukünftigen Experimenten gezeigt werden. Der in dieser Arbeit gezeigte Verlust des RANTES bei Kokultur mit Tumorzellüberschuss könnte dann ebenfalls zur Schwächung des Reaktionspotentials zytotoxischer T-Lymphozyten beitragen.

6 Zusammenfassung

Mit einer adoptiven Immuntherapie erhofft man sich durch die Verabreichung von antigenspezifischen T-Lymphozyten die Tumorbekämpfung verbessern zu können. Tumorantigen-spezifische T-Zellen zeigen oftmals *in vitro* eine erfolgreiche Erkennung von Tumorzellen. Nach Transfer in den Patienten kommt es aber nur in wenigen Fällen zu einem lang anhaltenden Tumorrückgang. Aus Tumoren isolierte T-Lymphozyten zeigen direkt nach Isolierung eine mangelnde Effektorfunktion. Nach Kultivierung und Zugabe von IL-2 gewinnen diese oftmals lytische Funktion gegenüber Tumorzellen. Diese Beobachtungen deuten auf eine Inaktivierung der T-Lymphozyten im Tumormilieu hin. Durch Untersuchungen zum Einfluss des Tumormilieus erhofft man sich, Erkenntnisse zu gewinnen bezüglich der Faktoren, die zu einer Inaktivierung der T-Zell-Effektorfunktion im Tumor führen, um mögliche Gegenmaßnahmen anwenden zu können. Das Nierenzellkarzinom stellt aufgrund eines in der Regel starken Infiltrats an Lymphozyten, aber dennoch fehlender Kontrolle des Tumorwachstums, ein sehr gutes Modellsystem dar, um die Mechanismen einer Immunsuppression bei tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Nierenzellkarzinom-infiltrierende $CD8^+$ -Lymphozyten aktivierte Effektorlymphozyten sind, da sie lytische Granula aufweisen. Allerdings besitzt nur etwa die Hälfte dieser Zellen auch das zytotoxische Effektormolekül Perforin. Von den $Perforin^+CD8^+$ -Effektorzellen lassen sich bei etwas mehr als der Hälfte Kriterien einer aktiven Tumorzellerkennung mit lytischer Granulafusion erkennen. Die Kriterien der lytischen Zielzellerkennung mit Granulafusion wurden mit Hilfe eines neu entwickelten Nachweisverfahrens definiert und validiert. Der in den Nierentumoren nachgewiesene Anteil an $CD8^+$ -Effektorzellen in Tumorzellerkennung und Granulafusion entspricht dem der Kontrollgewebe die nachweislich ein Effektorzellinfiltrat mit zytolytischer Gewebeerstörung aufweisen (Abstoßungstransplantat, akute virale Leberentzündung). Die $Perforin^+$ -Effektorzellen im Nierenzellkarzinom scheinen somit funktionsfähig und auch reaktiv zu sein. Im Gegensatz zu den Kontrollgeweben, die nur einen prozentualen Anteil an $Perforin^-CD8^+$ -Effektorzellen von 29 % enthielten, waren im Nierenzellkarzinom 27 % bis 65 % der $CD8^+$ -Effektorlymphozyten $Perforin^-$. Diese zeigten kaum Tumorzellerkennung. Das „lytisches Reaktionsprofil“ wurde definiert als der Anteil an $CD8^+$ -Effektorlymphozyten, die sowohl $Perforin^+$ sind als auch ihre Granula mit der Plasmamembran fusioniert haben. Es zeigte sich, dass die Nierenzellkarzinom-

infiltrierende CD8⁺-Effektorpopulation gegenüber einer CD8⁺-Lymphozyten-Vergleichspopulation in entzündlich infiltrierten Geweben reduziert ist. Das geringe „lytische Reaktionsprofil“ könnte ein möglicher Grund für eine unzureichende immunologische Tumorbekämpfung von Nierenzellkarzinomen darstellen.

Anhand eines *in vitro* Modellsystem wurden Faktoren identifiziert, die zum Perforin-Verlust führen können. Diese Faktoren beinhalteten hohe Tumorzell-dichte und die daraus resultierende Azidose sowie negativ regulierende Faktoren wie TGF-β. *In vitro* generierte Perforin⁻-Effektorlymphozyten hatten zudem erniedrigten Gehalt an Granzym B und RANTES. Sie waren nicht mehr zytotoxisch, sezernierten nach TZR-Stimulierung kein IFN-γ und zeigten keine synaptische Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran nach Zielzellkontakt. Mit diesen Eigenschaften entsprechen die *in vitro* aus Perforin⁺ zytotoxischen Effektorzellen generierten Perforin⁻-Effektorzellen phänotypisch und funktionell den im Nierenzellkarzinom nachgewiesenen Perforin⁻CD8⁺-Effektorzellen.

In dem *in vitro* Modellsystem wurde erstmalig auch der Einfluss Tumormilieu-assoziiierter Faktoren auf den Gehalt des Chemokins RANTES in zytotoxischen T-Lymphozyten untersucht. Es zeigte sich, dass eine hohe Tumorzell-dichte in ähnlicher Weise wie für Perforin eine Defizienz an RANTES in zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren kann. Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass beim lytischen Zielzellkontakt RANTES auf die Oberfläche der Zielzelle übertragen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterführend gezeigt, dass die aus dem lytischen Vorgang resultierenden RANTES⁺ apoptotischen Tumorzellen verstärkt von Makrophagen aufgenommen werden. Die schnelle Beseitigung apoptotischer Tumorzellen ist ein wichtiger immunregulatorischer Faktor und könnte auch den Erhalt der zytotoxischen Effektorfunktion beeinflussen. Der hier gezeigte Verlust von RANTES durch eine hohe Tumorzell-dichte könnte somit ebenfalls zu Effektorfunktionsdefiziten der zytotoxischen T-Lymphozyten beitragen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern im Wesentlichen drei für die Tumorthherapie wichtige Erkenntnisse. Zum einen befinden sich differenzierte CD8⁺-Lymphozyten mit zytotoxischem Potential (Perforin⁺) im Nierenzellkarzinomgewebe. Diese Zellen zeigen auch aktive Tumorzellerkennung, nachgewiesen anhand der lytischen Granulafusion, die in einem *in vitro* Modell mit zytotoxischer Zielzellerkennung assoziiert war.

Zweitens zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass funktionsfähige Perforin⁺ zytotoxische Effektorzellen durch Tumormilieu-assoziierte Faktoren einen Perforin⁻-Phänotyp erlangen können und die resultierende Perforin-Defizienz mit einer eingeschränkten Effektorfunktion korreliert. Die Erkenntnis, dass Perforin⁻-Zellen mit funktionellen Defiziten aus Perforin⁺ funktionsfähigen Effektorzellen entstehen können, ist neuartig und wichtig. Denn bislang wurde postuliert, dass z.B. die in Melanomen detektierten Perforin⁻-Lymphozyten das Ergebnis einer gestörten Effektordifferenzierung sind. Die neue Beobachtung, dass ungünstige Milieufaktoren, wie sie in Tumoren vorkommen können, zum Verlust der Effektorfunktion von bereits differenzierten Effektorzellen führen können, hat Konsequenzen für therapeutische Interventionsstrategien, da nicht nur die Induktionsphase zur Entstehung der Effektorzellen, sondern auch die Endphase (Effektorphase) und in diesem Zusammenhang das Milieu, in welchem die Effektorzellen reaktiv sein müssen, zu berücksichtigen ist. Drittens könnte in Zukunft die in dieser Arbeit entwickelte Methode zum Nachweis und der Quantifizierung von Tumorzellerkennung mit lytischer Membranfusion genutzt werden, um festzustellen, in wie weit durch eine Immuntherapie die Tumorzellerkennung durch Lymphozyten im Gewebe verbessert wurde. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Eigenschaften von Perforin⁻-Effektorlymphozyten könnten Ansatzpunkte für die Optimierung derzeitiger Immuntherapien und für die Entwicklung neuer Strategien darstellen, die auf eine gezielte Reaktivierung dieser T-Zellpopulation ausgerichtet sind und damit eine Verstärkung der Immunantwort gegen den Tumor bewirken.

7 Literaturverzeichnis

1. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.*, *Na3*: 361-370, 2003.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Molecular Cell Biology*. New York and London: Garland Science, 4. Edition, 2002.
3. Irvine, D. J. Function-specific variations in the immunological synapses formed by cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* , *100*: 13739-13740, 2003.
4. Choudhuri, K. and van der Merwe, P. A. Molecular mechanisms involved in T cell receptor triggering. *Semin. Immunol.*, *19*: 255-261, 2007
5. Gastl, G., Ebert, T., Finstad, C. L., Sheinfeld, J., Gomahr, A., Aulitzky, W., and Bander, N. H. Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J. Urol.* , *155*: 361-367, 1996
6. Barry, M. and Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.*, *2*: 401-409, 2002.
7. Millard, P. J., Henkart, M. P., Reynolds, C. W., and Henkart, P. A. Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J. Immunol.* , *132*: 3197-3204, 1984
8. Tschopp, J., Masson, D., and Stanley, K. K. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature*, *322*: 831-834, 1986
9. Froelich, C. J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G. M., Bleackley, R. C., Dixit, V. M., and Hanna, W. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* , *271*: 29073-29079, 1996
10. Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., J.A., T., and Froelich, C. J. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*, *16*: 417-428, 2002
11. Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, *23*: 249-262, 2005.
12. Russell, J. H. and Ley, T. J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, *20*: 323-370, 2002.
13. Peters, P. J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krähenbühl, O., Tschopp, J., Slot, J. W., and Geuze, H. J. Cytotoxic T lymphocyte granules are

- secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.*, *173*: 1099-1109, 1991.
14. Medley, Q. G., Kedersha, N., O'Brien, S., Tian, Q., Schlossman, S. F., Streuli, M., and 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. USA*, *93*: 685-689, 1996.
 15. Felgar, R. E., Salhany, K. E., Macon, W. R., Pietra, G. G., and Kinney, M. C. The expression of TIA-1+ cytolytic-type granules and other cytolytic lymphocyte-associated markers in CD30+ anaplastic large cell lymphomas (ALCL): correlation with morphology, immunophenotype, ultrastructure, and clinical features. *Hum. Pathol.*, *30*: 228-236, 1999
 16. Dustin, M. L. A dynamic view of the immunological synapse. *Semin. Immunol.*, *17*: 400-410, 2005
 17. Djeu, J. Y., Jiang, K., and Wei, S. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.*, *8*: 636-640, 2002.
 18. Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, *285*: 221-227, 1999
 19. Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*, *15*: 751-761, 2001
 20. Faroudi, M., Utzny, C., Salio, M., Cerundolo, V., Guiraud, M., Müller, S., and Valitutti, S. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, *100*: 14145-141450, 2003
 21. Griffiths, G. M. The cell biology of CTL killing. *Curr. Opin. Immunol.*, *7*: 343-348, 1995.
 22. Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, *103*: 10985-10990, 2006.
 23. Kuhn, J. R. and Poenie, M. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity*, *16*: 111-121, 2002
 24. Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G. M. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*, *443*: 462-465 2006.
 25. Isaaz, S., Baetz, K., Olsen, K., Podack, E., and Griffiths, G. M. 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.*, *25*: 1071-1079, 1995.

26. Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J. C., and Griffiths, G. M. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol. Rev.* , 189: 152-160, 2002
27. Fischer, A., Latour, S., and de Saint Basile, G. Genetic defects affecting lymphocyte cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.*, 19: 348-353, 2007
28. Catalfamo, M. and Henkart, P. A. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.* , 15: 522-527, 2003
29. Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369: 31-37, 1994.
30. Sauer, H., Pratsch, L., Tschopp, J., Bhakdi, S., and Peters, R. Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* , 1063: 137-146, 1991
31. Pipkin, M. E. and Lieberman, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr. Opin. Immunol.* , 19: 301-308, 2007
32. Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J. A., and Smyth, M. J. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr. Opin. Immunol.*, 19: 339-347, 2007.
33. Voskoboinik, I., Thia, M. C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M. J., and Trapani, J. A. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J. Biol. Chem.* , 280: 8426-8434, 2005
34. Balaji, K. N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., and Henkart, P. A. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.*, 196: 493-503, 2002
35. Baran, K., Ciccone, A., Peters, C., Yagita, H., Bird, P. I., Villadangos, J. A., and Trapani, J. A. Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. *J. Biol. Chem.*, 281: 30485-30491, 2006
36. Thomas, D. A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T. J. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*, 12: 621-632, 2000
37. Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., and Bleackley, R. C. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol. Rev.* , 193: 31-38, 2003
38. Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* , 18: 593-620, 2000.

39. Zlotnik, A. and Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, *12*: 121-127, 2000
40. Ortiz, B. D., Nelson, P. J., and Krensky, A. M. Switching gears during T-cell maturation: RANTES and late transcription. *Immunol. Today*, *18*: 468-471, 1997.
41. Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S., and Luster, A. D. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*, *391*: 908-911, 1998.
42. Catalfamo, M., Karpova, T., McNally, J., Costes, S. V., Lockett, S. J., Bos, E., Peters, P. J., and Henkart, P. A. Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity*, *20*: 219-230, 2004
43. Appay, V., Dunbar, P. R., Cerundolo, V., McMichael, A., Czaplewski, L., and Rowland-Jones, S. RANTES activates antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a mitogen-like manner through cell surface aggregation. *Int. Immunol.* , *12*: 1173-1182, 2000.
44. Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gómez-Moutón, C., Lanzavecchia, A., Martínez-A, C., Mañes, S., and Viola, A. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat. Immunol.* , *6*: 465-471, 2005
45. Messmer, U. K. and Pfeilschifter, J. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays.* , *22*: 878-881, 2000.
46. Henson, P. M. and Hume, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* , *27*: 244-250, 2006
47. Takemura, R. and Werb, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.* , *246*: C1-9, 1984.
48. Krebs in Deutschland Häufigkeit und Trends, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2006.
49. Störkel, S., Eble, J. N., Adlakha, K., Amin, M., Blute, M. L., Bostwick, D. G., Darson, M., Delahunt, B., and Iczkowski, K. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, *80*: 987-989, 1997.
50. Obernder, R., Wagner, H., Siebels, M., Stieber, P., Busch, M., and Weiss, M. Nierenzellkarzinom. *Manual Urogenitale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 3.Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München*: 79-97, 2003.
51. De Riese, W., Goldenberg, K., Allhoff, E., and Jonas, U. Spontaneous regression of metastatic renal carcinoma with long-term survival. *Br. J. Cancer*, *68*: 98-100, 1991

52. Schendel, D. J., Oberneder, R., Falk, C. S., Jantzer, P., Kressenstein, S., Maget, B., Hofstetter, A., Riethmüller, G., and Nössner, 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.*, 75: 400-413, 1997.
53. Rosenberg, S. A., Mulé, J. J., Spiess, P. J., Reichert, C. M., and Schwarz, S. L. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 161: 1169-1188, 1985
54. Atzpodien, J., Körfer, A., Franks, C. R., Poliwoda, H., and Kirchner, H. Home therapy with recombinant interleukin-2 and interferon-alpha 2b in advanced human malignancies. *Lancet*, 335: 1509-1512, 1990
55. Lopez, H. E., Kirchner, H., and Atzpodien, J. Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J. Urol.*, 155: 19-25, 1996
56. Fishman, M. and Antonia, S. Novel therapies for renal cell carcinoma-an update. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 12: 593-609, 2003
57. Appay, V., Jandus, C., Voelter, V., Reynard, S., Coupland, S. E., Rimoldi, D., Lienard, D., Guillaume, P., Krieg, A. M., Cerottini, J. C., Romero, P., Leyvraz, S., Rufer, N., and Speiser, D. E. New Generation Vaccine Induces Effective Melanoma-Specific CD8 T Cells in the Circulation but not in the Tumor Site. *J. Immunol.*, 177: 1670-1678, 2006.
58. Van den Hove, L. E., Van Gool, S. W., Van Poppel, H., Baert, L., Coorevits, L., Van Damme, B., and Ceuppens, J. L. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.*, 109: 501-509, 1997
59. Thurnher, M., Radmayr, C., Ramoner, R., Ebner, S., Böck, G., Klocker, H., Romani, N., and Bartsch, G. Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int. J. Cancer.*, 68: 1-7, 1996
60. Schleypen, J. S., Baur, N., Kammerer, R., Nelson, P. J., Rohrmann, K., Gröne, E. F., Hohenfellner, M., Haferkamp, A., Pohla, H., Schendel, D. J., Falk, C. S., and Noessner, E. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 12: 718-725, 2006
61. Schleypen, J. S. Mechanismen funktioneller Inaktivierung Tumor-infiltrierender Lymphozyten am Beispiel des Nierenzellkarzinoms. Doktorarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwigs-Maximilians-Universität, München, 2003.

62. Tomita, Y., Nishiyama, T., Fujiwara, M., and Sato, S. Characterization of tumor-infiltrating mononuclear cells in renal cell cancer: quantitative analysis by immunoperoxidase staining. *Urol. Int.* , *47*: 1-6, 1991.
63. Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., and 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.* , *61*: 5132-5136, 2001
64. Jantzer, P. and Schendel, D. J. Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo. *Cancer Res.*, *58*: 3078-3086, 1998
65. Radoja, S., Saio, M., Schaer, D., Koneru, M., Vukmanovic, S., and Frey, A. B. 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.*, *167*: 5042-5051, 2001.
66. De Paola, F., Ridolfi, R., Riccobon, A., Flamini, E., Barzanti, F., Granato, A. M., Mordenti, G. L., Medri, L., Vitali, P., and Amadori, D. Restored T-cell activation mechanisms in human tumour-infiltrating lymphocytes from melanomas and colorectal carcinomas after exposure to interleukin-2. *Br. J. Cancer*, *88*: 320-326, 2003.
67. Seliger, B., Höhne, A., Jung, D., Kallfelz, M., Knuth, A., Jaeger, E., Bernhard, H., Momburg, F., Tampé, R., and Huber, C. Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas. *Exp. Hematol.* , *25*: 608-614, 1997
68. Gorelik, L. and Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.*, *2*: 46-53, 2002.
69. Thomas, D. A. and Massague, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, *8*: 369-380, 2005.
70. Filgueira, L., Zuber, M., Merlo, A., Caetano, V., Schultz, E., Harder, F., Spagnoli, G. C., and Heberer, M. Cytokine gene transcription in renal cell carcinoma. *Br. J. Surg.* , *80*: 1322-1135, 1993.
71. Cesana, G. C., DeRaffele, G., Cohen, S., Moroziewicz, D., Mitcham, J., Stoutenburg, J., Cheung, K., Hesdorffer, C., Kim-Schulze, S., and Kaufman, H. L. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* , *24*: 1169-1177, 2006
72. Jarnicki, A. G., Lysaght, J., Todryk, S., and Mills, K. H. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, *177*: 896-904, 2006.

73. van den Broek, M. E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* , *184*: 1781-1790, 1996
74. van den Broek, M. F., Kägi, D., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur. J. Immunol.* , *25*: 3514-3516, 1995
75. Smyth, M. J., Thia, K. Y., Cretney, E., Kelly, J. M., Snook, M. B., Forbes, C. A., and Scalzo, A. A. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J. Immunol.*, *162*: 6658-6662, 1999.
76. Kontani, K., Sawai, S., Hanaoka, J., Tezuka, N., Inoue, S., and Fujino, S. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers. *Eur. J. Surg. Oncol.* , *27*: 180-186, 2001
77. Qian, Q. J., Xue, H. B., Qu, Z. Q., Fang, S. G., Cao, H. F., and Wu, M. C. In situ detection of tumor infiltrating lymphocytes expressing perforin and fas ligand genes in human HCC. *World J. Gastroenterol.* , *5*: 12-14, 1999.
78. Nakanishi, H., Monden, T., Morimoto, H., Kobayashi, T., Shimano, T., and Mori, T. Perforin expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* , *64*: 239-242, 1991
79. Fukumura, D. and Jain, R. K. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J. Cell. Biochem.*, *101*: 937-949, 2007
80. Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N. S., and Jain, R. K. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin. Cancer Res.*, *8*: 1284-1291, 2002
81. Angevin, E., Kremer, F., Gaudin, C., Hercend, T., and Triebel, F. Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *Int. J. Cancer*, *72*: 431-440, 1997
82. Schendel, D. J., Gansbacher, B., Oberneder, R., Kriegmair, M., Hofstetter, A., Riethmuller, G., and Segurado, O. G. Tumor-Specific Lysis of Human Renal Cell Carcinomas by Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J. Immunol.*, *151*: 4209-4220, 1993.
83. Krause, M., Schmitz, M., Noessner, E., Skrablin, P. S., Wehner, R., Rieber, E. P., and Baumann, M. Adoptive transfer of cytotoxic T-cells for treatment of residual disease after irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*: 1-10 2007
84. Rivoltini, L., Barracchini, K. C., Viggiano, V., Kawakami, Y., Smith, A., Mixon, A., Restifo, N. P., Topalian, S. L., Simonis, T. B., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, *55*: 3149-3157, 1995

85. Milani, V., Frankenberger, B., Heinz, O., Brandl, A., Ruhland, S., Issels, R. D., and Noessner, E. Melanoma-associated antigen tyrosinase but not Melan-A/MART-1 expression and presentation dissociate during the heat shock response. *Int. Immunol.* , *17*: 257-268, 2005
86. Visseren, M. J., van Elsas, A., van der Voort, E. I., Rensing, M. E., Kast, W. M., Schrier, P. I., and Melief, C. J. CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. *J. Immunol.* , *154*: 3991-3998, 1995
87. Hosse, J. Einfluss von Tumorzellmenge und Zytokinen auf den Zytotoxingehalt zytotoxischer T-Lymphozyten. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2005.
88. Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M., and Koup, R. A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods.* , *281*: 65-78, 2003
89. Anz, D. Aspekte der antitumoralen Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen und Betrachtungen ihres Zusammenspiels mit Makrophagen und dendritischen Zellen. Doktorarbeit, Medizinische Fakultät, Ludwigs-Maximilians-Universität, München, 2006.
90. Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., and Parks, D. R. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat. Immunol.* , *7*: 681-685, 2006
91. Hüster, J. and Zimmermann, H. Statistische Prinzipien für medizinische Projekte. Verlag Hans Huber, 2006.
92. Kolbeck, P. C., Kaveggia, F. F., Johansson, S. L., Grune, M. T., and Taylor, R. J. The relationships among tumor-infiltrating lymphocytes, histopathologic findings, and long-term clinical follow-up in renal cell carcinoma. *Mod. Pathol.*, *5*: 420-425, 1992.
93. Lettau, M., Schmidt, H., Kabelitz, D., and Janssen, O. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett*, *108*: 10-19, 2007.
94. Fukuda, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* , *266*: 21327-21330, 1991
95. Pfister, H. Charakterisierung der Natürlichen Killerzellsubpopulationen von gesunden Spenders und von Nierenzellkarzinompatienten und Etablierung einer Durchflusszytometrie-kompatiblen Nachweismethode für Zytotoxizität. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwigs-Maximilians-Universität, München, 2007.
96. Lahn, M., Fisch, P., Köhler, G., Kunzmann, R., Hentrich, I., Jesuiter, H., Behringer, D., Muschal, B., Veelken, H., Kulmburg, P., Iklé, D. N., and Lindemann, A. Pro-inflammatory and T cell inhibitory cytokines are secreted at high levels in tumor cell cultures of human renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* , *35*: 70-80, 1999.

97. Sievers, E., Dreimuller, P., Haferkamp, A., Schmidt-Wolf, I. G., Buchler, M. W., Schmidt, J., and Marten, A. Characterization of primary renal carcinoma cultures. *Urol. Int.* , 79: 235-243, 2007.
98. Engin, K., Leeper, D. B., Cater, J. R., Thistlethwaite, A. J., Tupchong, L., and McFarlane, J. D. Extracellular pH distribution in human tumours. *Int. J. Hyperthermia*, 11: 211-216, 1995
99. Anders, H. J., Frink, M., Linde, Y., Banas, B., Wörnle, M., Cohen, C. D., Vielhauer, V., Nelson, P. J., Gröne, H. J., and Schlöndorff, D. CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J. Immunol.* , 170: 5658-5666, 2003.
100. Takayama, H. and Sitkovsky, M. V. Antigen receptor-regulated exocytosis in cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 166: 725-743, 1987
101. Hanson, H. L., Donermeyer, D. L., Ikeda, H., White, J. M., Shankaran, V., Old, L. J., Shiku, H., Schreiber, R. D., and Allen, P. M. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity*, 13: 265-276, 2000
102. Rosenberg, S. A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411: 380-384, 2001
103. Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E., and Rosenberg, S. A. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, 298: 850-854, 2002
104. Rosenberg, S., Sherry, R. M., Morton, K. E., Scharfman, W. J., Yang, J. C., Topalian, S. L., Royal, R. E., Kammula, U., Restifo, N. P., Hughes, M. S., Schwartzentruber, D. J., Berman, D. M., Schwarz, S. L., Ngo, L. T., Mavroukakis, S. A., White, D. E., and Steinberg, S. M. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J. Immunol.* , 175: 6169-6176, 2005
105. Ahmadzadeh, M. and Rosenberg, S. A. TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J. Immunol.*, 174: 5215-5223, 2005
106. Pawelec, G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol. Immunother.*, 53: 262-274, 2004
107. Radoja, S. and Frey, A. B. Cancer-induced Defective Cytotoxic T Lymphocyte Effector Function: Another Mechanism How Antigenic Tumors Escape Immune-mediated Killing. *Molecular Medicine*, 6: 465-479, 2000.

108. Sawada, T., Shimizu, A., Kubota, K., Fuchinoue, S., and Teraoka, S. Lobular damage caused by cellular and humoral immunity in liver allograft rejection. *Clin. Transplant.*, *19*: 110-114, 2005
109. Atkins, D., Ferrone, S., Schmahl, G. E., Storkel, S., and Seliger, B. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J. Urol.*, *171*: 885-889, 2004.
110. Coussens, L. M. and Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, *420*: 860-867, 2002
111. De Visser, K. E., Eichten, A., and Coussens, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer.* , *6*: 24-37, 2006
112. Lurquin, C., Lethé, B., De Plaen, E., Corbière, V., Théate, I., van Baren, N., Coulie, P. G., and Boon, T. Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J. Exp. Med.* , *201*: 249-257, 2005.
113. Skinner, P. J., Daniels, M. A., Schmidt, C. S., Jameson, S. C., and Haase, A. T. Cutting edge: In situ tetramer staining of antigen-specific T cells in tissues. *J. Immunol.* , *165*: 613-617, 2000.
114. Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachée-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A., and G., d. S. B. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*, *115*: 461-473, 2003
115. Kudoh, S., Redovan, C., Rayman, P., Edinger, M., Tubbs, R. R., Novick, A., Finke, J. H., and Bukowski, R. M. Defective granzyme B gene expression and lytic response in T lymphocytes infiltrating human renal cell carcinoma. *J. Immunother.*, *20*: 479-487, 1997.
116. Zantl, N., Weirich, G., Zall, H., Seiffert, B. M., Fischer, S. F., Kirschnek, S., Hartmann, C., Fritsch, R. M., Gillissen, B., Daniel, P. T., and Häcker, G. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene*, *26*: 7038-7048, 2007
117. Mortarini, R., Piris, A., Maurichi, A., Molla, A., Bersani, I., Bono, A., Bartoli, C., Santinami, M., Lombardo, C., Ravagnani, F., Cascinelli, N., Parmiani, G., and Anichini, A. Lack of Terminally Differentiated Tumor-specific CD8+ T Cells at Tumor Site in Spite of Antitumor Immunity to Self-Antigens in Human Metastatic Melanoma. *Cancer Res.*, *63*: 2535-2545, 2003.

118. Harlin, H., Kuna, T. V., Peterson, A. C., Meng, Y., and Gajewski, T. F. Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunol. Immunother.* , 55: 1185-1197, 2006.
119. Shacklett, B. L., Cox, C. A., Quigley, M. F., Kreis, C., Stollman, N. H., Jacobson, M. A., Andersson, J., Sandberg, J. K., and Nixon, D. F. Abundant expression of granzyme A, but not perforin, in granules of CD8+ T cells in GALT: implications for immune control of HIV-1 infection. *J. Immunol.*, 173: 641-648, 2004.
120. Andersson, J., Kinloch, S., A., S., Nilsson, J., Fehniger, T. E., Spetz, A. L., Behbahani, H., Goh, L. E., McDade, H., Gazzard, B., Stellbrink, H., Cooper, D., and Perrin, L. Low levels of perforin expression in CD8+ T lymphocyte granules in lymphoid tissue during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.*, 185: 1355-1358, 2002.
121. Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., and Ahmed, R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439: 682-687, 2006.
122. Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M. R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R. S., Routy, J. P., Haddad, E., and Sekaly, R. P. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.*, 12: 1198-1202, 2006.
123. Thompson, R. H., Dong, H., Lohse, C. M., Leibovich, B. C., Blute, M. L., Cheville, J. C., and Kwon, E. D. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 13: 1757-1761, 2007.
124. Street, S. E., Cretney, E., and Smyth, M. J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 97: 192-197, 2001
125. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410: 1107-1111, 2001.
126. Ibe, S., Qin, Z., Schüler, T., Preiss, S., and Blankenstein, T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *J. Exp. Med.* , 194: 1549-1559, 2001
127. Jewett, A. and Bonavida, B. Target-induced anergy of natural killer cytotoxic function is restricted to the NK-target conjugate subset. *Cell. Immunol.*, 160: 91-97, 1995.
128. Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J., and Goeddel, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347: 669-671, 1990.

8 Verwendete Abkürzungen

7AAD	7-Aminoactinomycin D
APAF	<i>apoptotic protease-activating factor</i>
CAD	Caspase-aktivierte DNase
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BAD	<i>BCL-2-antagonist of cell death</i>
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CML	<i>cell mediated lysis</i>
cSMAC	<i>central supramolecular activation cluster</i>
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Cyanin-5
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	dendritische Zellen
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Fitc	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GMP-17	<i>granule membrane protein of 17 kD</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
ICAD	inaktive Caspase-aktivierte DNase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAMP	<i>lysosomal associated membranprotein</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitäts-Komplex)

MTOC	<i>microtubule organizing center</i> (Mikrotubulin-organisierendes Zentrum)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PD	<i>programmed cell death</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pMHC	MHC-Peptid-Komplexe
pSMAC	<i>peripheral supramolecular activation cluster</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RCC	<i>renal cell carcinoma</i> (Nierenzellkarzinom)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SSC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreuung)
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i> (Transformierenden Wachstumsfaktor- β)
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTR	T-Zell-Rezeptor
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

9 Anhang

9.1 Gehalt an Perforin im ZTL Klon JB4 während der Koinkubation mit KT-195

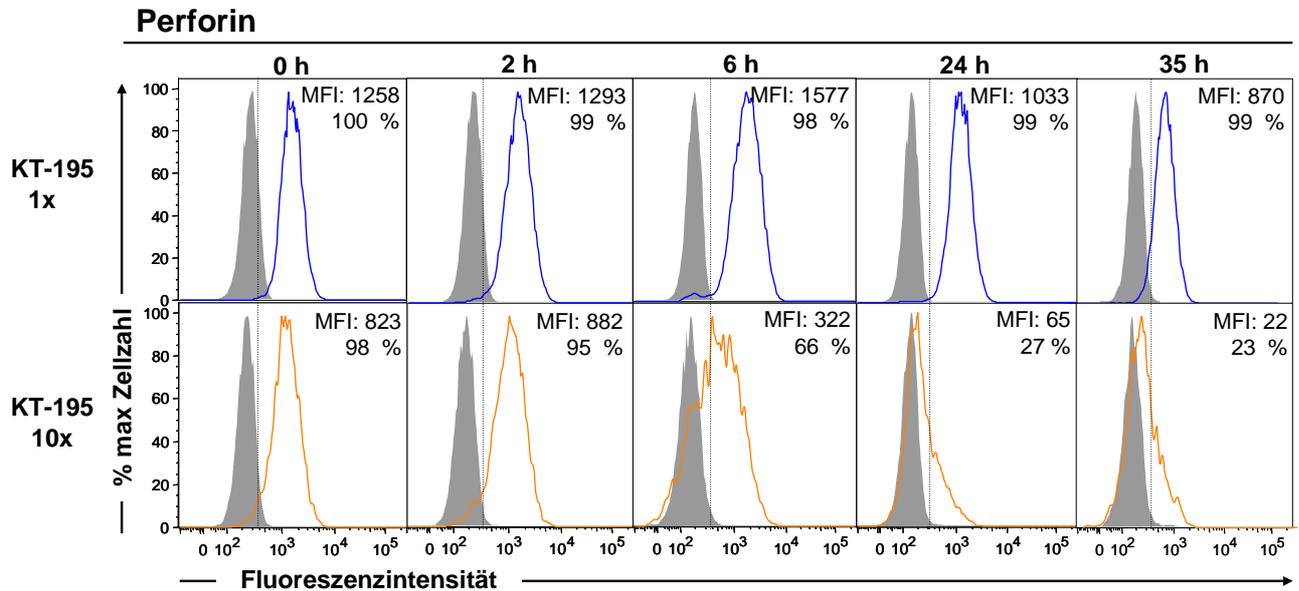


Abb. 9.1: Gehalt an Perforin im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie KT-195. Der ZTL Klon JB4 wurde mit einer niedrigen (1x) bzw. einer hohen (10x) Zellzahl der HLA-A2⁻-Nierenzellkarzinomlinie KT-195 koinkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit einem Antikörper gegen Perforin durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von Perforin als Histogramme mit logarithmischer Skalierung zu den angegebenen Zeitpunkten in den ZTL, die mit niedriger (1x, obere Reihe) bzw. hoher Tumorzellzahl (10x untere Reihe) inkubiert wurden. Die MFI und die Anzahl Perforin⁺-ZTL sind im jeweiligen Histogramm angegeben. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar, deren MFI von der spezifischen MFI abgezogen wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

9.2 Gehalt an Granzym A und Granzym B im ZTL Klon JB4 während der Koinkubation mit KT-195

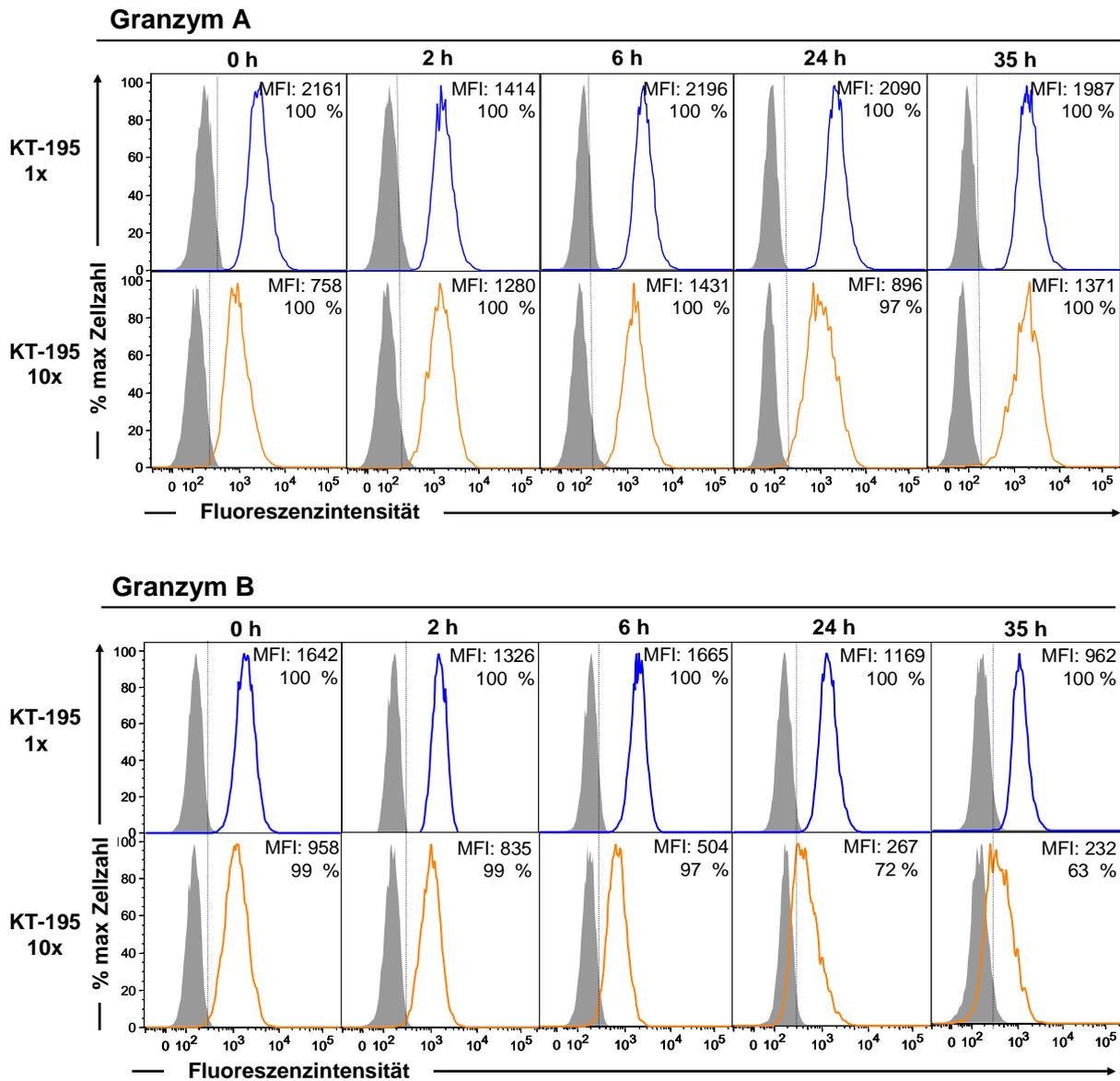


Abb. 9.2: Gehalt an Granzym A und Granzym B im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie KT-195. Der ZTL Klon JB4 wurde mit einer niedrigen (1x) bzw. hohen (10x) Zellzahl der HLA-A2⁻-Nierenzellkarzinomlinie KT-195 koinkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit einem Antikörper gegen Granzym A und Granzym B durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von Granzym A (oben) und Granzym B (unten) als Histogramme mit logarithmischer Skalierung zu den angegebenen Zeitpunkten, die mit einer niedrigen (1x, jeweils obere Reihe) bzw. mit einer hohen Tumorzellzahl (10, jeweils untere Reihe) inkubiert wurden. Die MFI und der prozentuale Anteil Effektorprotein⁺-Zellen sind im jeweiligen Histogramm angegeben. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar, dessen MFI von der spezifischen MFI abgezogen wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

9.3 Gehalt an RANTES im ZTL Klon JB4 während der Koinkubation mit RCC26

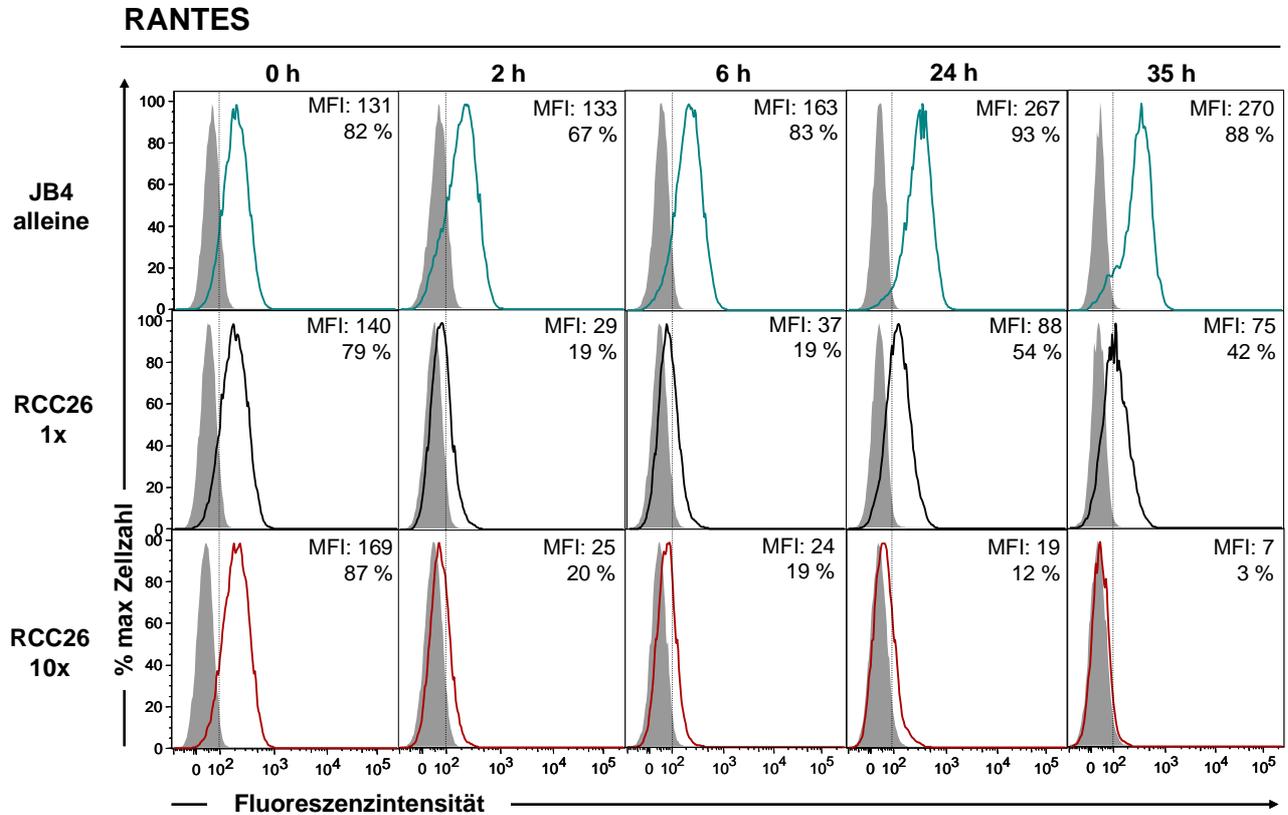


Abb. 9.3: Gehalt an RANTES im ZTL Klon JB4 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie RCC26. Der ZTL Klon JB4 wurde alleine, mit einer niedrigen (1x) bzw. hohen (10x) Zellzahl der HLA-A2⁺-Nierenzellkarzinomlinie RCC26 inkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff DiD markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit einem Antikörper gegen RANTES durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von RANTES als Histogramme mit logarithmischer Skalierung zu den angegebenen Zeitpunkten in den ZTL, die alleine (obere Reihe), mit niedriger (1x, mittlere Reihe) bzw. mit hoher Tumorzellzahl (10, untere Reihe) inkubiert wurden. Die MFI und der prozentuale Anteil RANTES⁺-Zellen sind im jeweiligen Histogramm angegeben. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Fluoreszenzintensität des Isotypkontrollantikörpers dar, dessen MFI von der MFI von RANTES abgezogen wurde.

9.4 Gehalt an Perforin, Granzym A und Granzym B im ZTL Klon TyrF8 während der Koinkubation mit Mel624.38

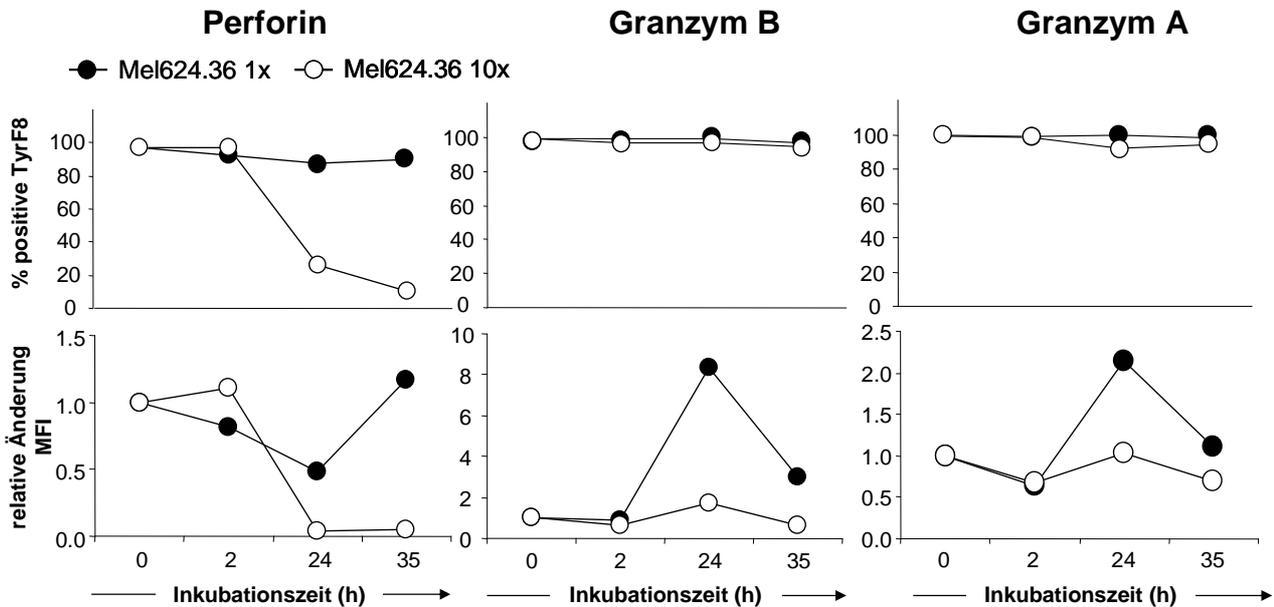


Abb. 9.4: Prozent Perforin⁺, Granzym A⁺- und Granzym B⁺-Zellen sowie die relative Änderung des Gehalts der Effektormoleküle im ZTL Klon TyrF8 während der Inkubation mit der Tumorzelllinie Mel624.38. Der ZTL Klon JB4 wurde mit einer niedrigen (1x, schwarz) bzw. hohen (10x, weiß) Zellzahl der HLA-A2⁺Tyrosinase⁺-Melanomzelllinie Mel624.38 koinkubiert. Zuvor wurden die ZTL mit dem Farbstoff PKH26 markiert. Nach Inkubation über verschiedene Zeitspannen wurde eine intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Perforin, Granzym A und B durchgeführt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Effektormolekül⁺-ZTL (oben) sowie die Änderung der MFI von Perforin (links), Granzym A (rechts) und Granzym B (Mitte) zu den angegebenen Zeitpunkten normiert auf den Ausgangswert bei 0 h (unten). Von der MFI wurde die MFI des jeweiligen parallel mitgeführten Isotypkontrollantikörpers abgezogen.

10 Lebenslauf

Name:	Petra Susan Anita Skrablin
Geburtsdatum /-ort:	18. Juni 1977, Darmstadt
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1983 - 1987	Grundschule in Weiterstadt
1987 - 1994	Albrecht-Dürer-Schule, Gesamtschule in Weiterstadt
1994 - 1996	Gymnasiale Oberstufe an der Bertold-Brecht-Schule in Darmstadt
1996	Allgemeine Hochschulreife
10/1996 - 01/2003	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt (Hauptfächer: Mikrobiologie, Genetik und Biochemie)
09/1998	Vordiplom
03/2001	Studentische Hilfskraft (Betreuung des genetischen Grundpraktikums)
04/2002 - 01/2003	Diplomarbeit
01/2003	Diplom
04/2003 - 07/2003	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biologischen Pflanzenschutz an der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Darmstadt
07/2003 - 12/2003	Wissenschaftliche Hilfskraft an den Meakins-Christie Laboratories der McGill University in Montreal, Kanada
02/2004	Betreuung des mikrobiologischen Grundpraktikums am Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt
05/2004 - 11/2007	Erstellung der vorliegenden Arbeit zur Promotion zum Dr. rer. nat. an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Durchführung der Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF in München, Großhadern

Veröffentlichungen:

Fiset, P.O., Tulic, M.K., **Skrablin, P.S.**, Grover, S.M., Létuvé, S., Mazer, B.D., and Hamid, Q. Signal transducer and activator of transcription 6 down-regulates toll-like receptor-4 expression of a monocytic cell line. *Clin. Exp. Allergy*. 36 (2), 158-165. (2006).

Krause, M., Schmitz, M., Noessner, E., **Skrablin, P.S.**, Wehner, R., Rieber, E.P., and Baumann, M. Adoptive transfer of cytotoxic T-cells for treatment of residual disease after irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 28, 1-10. (2007).

11 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Elfriede Nößner bedanken. Sie hat mich während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit immer sehr unterstützt. Die wissenschaftlichen Diskussionen mit ihrem großen fachlichen Wissen haben mich sehr motiviert und mich in meiner Arbeit vorangetrieben. Sie nahm sich zum Ende der Doktorarbeit besonders viel Zeit für meine Arbeit, was nicht selbstverständlich ist.

Frau Prof. Dolores Schendel danke ich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Molekulare Immunologie und somit der Möglichkeit an einem sehr aktuellen und wichtigen Thema mitarbeiten zu können.

Bei Frau PD Dr. Christine Falk bedanke ich mich herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie und, dass sie sich immer sehr viel Zeit für meine Fragen nahm.

Frau Anna Brandl danke ich sehr für die zahlreichen Hilfestellungen, Ratschläge und Tipps rund um die Versuche, sowie für die Hilfe bei der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung und der Restimulation der T-Zellklone.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Josef Mysliwietz für das ständige offene Ohr bei allen Fragen rund um die Durchflusszytometrie. Herrn Dr. Joachim Ellwart und Frau Karin Nispel danke ich für die Durchführung der Zellsortierungen.

Bei Herrn PD Dr. Peter Nelson von der Medizinischen Poliklinik an der LMU bedanke ich mich für die Ermöglichung zur Mitarbeit am „RANTES-Projekt“ sowie bei Frau Dr. Roghieh Djafarzadeh für die Hilfe bei der Messung am TECAN Genios Plus-Gerät.

Bei Judith Hosse möchte ich mich für die Hilfe zur statistischen Auswertung meiner Daten bedanken. Für die Einweisung und Einarbeitung am konfokalen Lasermikroskop danke ich Sibylle Ruhland, Ainhoa-Marie Figel und Manuel Deutsch. Markus Schmid danke ich für die freundliche Bereitstellung des TGF- β .

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Nicole Baur bedanken, die mich in die Durchflusszytometrie-Analyse eingearbeitet hat und mir zu Beginn der Doktorarbeit sehr geholfen hat.

Ein großes Dankeschön gilt Judith Hosse, Henriette Bendz, Ainhoa-Marie Figel, Adriana Turqueti Neves, Heike Pfister, Petra Prinz und Doris Seiler für die gute Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe und der ständigen Hilfsbereitschaft sowie der moralischen und seelischen Unterstützung in weniger guten Phasen meiner Arbeit. Außerdem bedanke ich mich bei allen weiteren Doktoranden, sowie Diplomanden und Praktikanten, die während meiner Doktorandenzeit in der AG EN mitgearbeitet haben.

Natürlich geht auch ein großes Dankeschön an alle Mitglieder des „Lunch Clubs“, die mir verzeihen mögen, dass ich sie hier nicht alle mit Namen erwähne. Ich habe Euch nicht vergessen und freue mich schon auf den nächsten Montag. Außerdem danke ich dem ganzen IMI. Es war schön mit Euch die Jahre über gearbeitet zu haben.

Ingrid Schuster danke ich ganz besonders für die Übernahme der letzten Korrekturen meiner Arbeit.

Meinen Eltern danke ich aus ganzem Herzen für die Ermöglichung meines Studiums, dass ich so weit gekommen bin, den Glauben an mich und die ständige Unterstützung wo immer sie nötig ist.

Ein ganz liebes Dankeschön gilt meinem Freund Klaus, der sich immer sehr viel Zeit für Fragen und Probleme, die während meiner Doktorarbeit auftauchten, genommen hat und mich allzeit unterstützt hat. Ich danke ihm, dass er mir die Motivation gegeben hat durchzuhalten.

Ich hoffe ich habe niemanden vergessen... es ist schon sehr spät und falls ich doch jemanden vergessen habe, dann nehmen meine müden Gehirnzellen gerne die Schuld auf sich.

Erklärung

hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wird hiermit erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Frau PD Dr. Elfriede Nößner am Institut für Molekulare Immunologie der GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit – betreut und wird von Frau PD. Dr. Christine S. Falk vor der Fakultät vertreten.

München, den 15.11.2007

(Petra S. A. Skrablin)