

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München
Leitung: Prof. Dr. Ralph Mocikat (komm.)

Untersuchungen zur NK-Zell- Funktion im Tumormilieu spontan wachsender Lymphome

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Lorenz Bankel
aus
München
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Mocikat
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Simon Rothenfusser, Prof. Dr. Anne Krug
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	21.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
2	ABKÜRZUNGEN	8
3	EINLEITUNG	9
3.1	DAS IMMUNSYSTEM	9
3.1.1	DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM	9
3.1.2	NATÜRLICHE KILLERZELLEN	10
3.1.3	DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM	13
3.2	TUMORIMMUNOLOGIE	13
3.2.1	IMMUNEDITIERUNG	14
3.2.2	ROLLE DER NK-ZELLEN IN DER TUMORIMMUNOLOGIE	15
3.3	SPONTANTUMORMODELL	17
3.4	FRAGESTELLUNG	18
3.4.1	AUSGANGSSITUATION	18
3.4.2	OFFENE FRAGEN	19
4	MATERIAL	21
4.1	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	21
4.2	REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	22
4.3	MEDIEN UND PUFFER	22
4.3.1	10 %-FCS-1640-RPMI-MEDIUM	22
4.3.2	LYSEPUFFER (PH 7,4)	23
4.3.3	FACS-MEDIUM	23
4.3.4	EINFRIERMEDIUM	23
4.4	ZELLEN	24
4.5	PRIMER	24
4.6	ANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	24
4.7	SOFTWARE	25

5	METHODEN.....	26
5.1	MÄUSE.....	26
5.2	ZELLKULTUR.....	26
5.2.1	KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN VON ZELLEN	26
5.2.2	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL.....	27
5.2.3	HERSTELLEN VON KULTURÜBERSTÄNDEN.....	27
5.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	27
5.3.1	PRINZIP.....	27
5.3.2	OBERFLÄCHENFÄRBUNG	28
5.3.3	INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG VON ZYTOKINEN	29
5.3.4	CFSE-FÄRBUNG	29
5.4	MAGNETISCHE ZELLSORTIERUNG.....	29
5.5	CHROMFREISETZUNGSTEST	30
5.6	ELISA.....	31
5.7	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	32
5.7.1	RNS-EXTRAKTION	32
5.7.2	GELELEKTROPHORESE.....	32
5.7.3	REVERSE TRANSKRIPTION VON RNS IN CDNS	32
5.7.4	CDNS-AMPLIFIKATION UND BERECHNUNG DER RELATIVEN EXPRESSION.....	33
6	ERGEBNISSE.....	34
6.1	IFN- γ -FREISETZUNG AUS NK-ZELLEN NACH INKUBATION MIT KULTURÜBERSTAND DER TUMORZELLINIE 291.....	34
6.2	LAKTAT-STOFFWECHSEL VON C-MYC-TUMOREN	42
6.3	ZYTOTOXIZITÄT VON NK-ZELLEN NACH KOKULTUR MIT 291-ZELLEN.....	47
6.4	NK-ZELL-EINWANDERUNG IN 291-TUMOREN	51
7	DISKUSSION	55
7.1	LAKTAT IN DER SCHLÜSSELPOSITION DES TUMORMILIEUS.....	55
7.2	NK-EINWANDERUNG ESSENZIELL FÜR TUMORABWEHR.....	62
7.3	AUSBlick	64

8	LITERATURVERZEICHNIS	66
9	ANHANG.....	71
9.1	VERÖFFENTLICHUNG	71
9.2	LEBENS LAUF	71
9.3	DANKSAGUNG	72
9.4	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG.....	73

I Zusammenfassung

Bei der Abwehr von soliden Tumoren leisten natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) als Teil des angeborenen Immunsystems einen entscheidenden Beitrag. NK-Zellen erfüllen dabei zwei Funktionen. Zum einen sind sie in der Lage, Tumoren schon in ihrer frühen Entstehungsphase ohne vorherigen Kontakt zu erkennen und direkt durch Sekretion lytischer Granula die Apoptose zu induzieren.

Andererseits besitzen NK-Zellen auch eine sekretorische Effektorfunktion: nach Aktivierung sezernieren sie große Mengen an Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor (TNF) und geben durch Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) und zytotoxischen T-Zellen (CTL) den Anstoß zu einer ausgeprägten Immunantwort des adaptiven Immunsystems.

Auch NK-Zellen zeigen trotz zielgerichteter Einwanderung in solide Tumoren und ihrer dortigen Aktivierung eine eingeschränkte Effektorfunktion.

In der vorliegenden Arbeit war zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der NK-Zell-Inhibition zunächst das Augenmerk auf die Charakterisierung des vorherrschenden Tumormilieus und die

Suche nach der ursächlichen Komponente gerichtet. Bei dem hier verwendeten Spontan-tumormodell zeigen die NK-Zellen eine eingeschränkte Effektorfunktion trotz aktivierten Phänotyps.

Es ergaben sich eindeutige Hinweise, dass lösliche Faktoren ohne die Notwendigkeit eines Zell-Zell-Kontaktes für die Hemmung der NK-Zellen verantwortlich sind. Diese schränken sowohl die sekretorische als auch die zytotoxische Funktion stark ein. Es wurden hohe Laktat-Konzentrationen zusammen mit niedrigen pH-Werten in den Tumorüberständen von c-myc-Tumoren nachgewiesen, was am ehesten durch aerobe Glykolyse im Rahmen des Warburg-Effekts erklärt ist. Im Folgenden konnte *in vitro* der Zusammenhang zwischen hohem Laktat Spiegel bzw. niedrigem pH-Wert und Einschränkung der NK-Zell-Funktion hergestellt werden: durch Zugabe von Laktat oder durch Absenken des pH-Wertes konnte die IFN- γ -Produktion deutlich inhibiert werden. Auch die Zytotoxizität gegenüber etablierten NK-Zell-Zielen wurde durch die Zugabe von Tumorüberständen deutlich gesenkt. Somit bietet die Neutralisation des aziden Tumormilieus einen neuen Ansatzpunkt für die Verbesserung von Immunthe-

rapien.

Wie die Einwanderung von NK-Zellen in Tumorgewebe verbessert werden kann, sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Peter Nelson (Klinische Biochemie, Klinikum der Universität, LMU München) untersucht werden. Hierzu entwickelte die AG Nelson ein Protein, welches das Chemokin CXCL10 – ein potentes Rekrutierungssignal für NK-Zellen – mit einem Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) vereint und somit in der Lage ist, sich in vorhandene Zellmembranen zu integrieren. Nach Injektion des Proteins wurden die Tumoren durchflusszytometrisch und immunhistochemisch analysiert. *In-vivo*-Versuche an Mäusen mit transplantierten Lymphomzellen konnten nachweisen, dass das Protein die NK-Zell-Einwanderung verbessert und somit eine neue Therapieoption NK-Zell-basierter Immuntherapien darstellt.

2 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
MK3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 3
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
i.v.	intravenös
Abb	Abbildung
ADCC	<i>antibody dependet cellular cytotoxicity</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zellen
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälber-Serum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MICA	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
mM	millimolar/millimol pro Liter
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
MULT-1	<i>murin ULBP-like transcript-1</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2D	<i>natural killer group 2D</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RAE-1	<i>retinoic acid inducible element 1</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Rowell Park Memorial Institute Medium
q-PCR	<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TÜ	Tumorüberstand
ULBP	<i>UL-16 binding protein</i>
WT	Wildtyp
UpM	Umdrehungen pro Minute
Treg	regulatorische T-Zellen
HIF	Hypoxie induzierter Faktor

3 Einleitung

3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist verantwortlich für die Abwehr gegen Krankheitserreger. Es besteht aus Zellen, Gewebe und löslichen Faktoren (Zytokine/Chemokine) und wird eingeteilt in das angeborene und das adaptive Immunsystem, die sich sowohl in der Schnelligkeit als auch der Spezifität ihrer Immunabwehr deutlich unterscheiden. Allerdings sind beide Systeme eng miteinander vernetzt und funktionieren nur in ihrer Gesamtheit.

Das angeborene Immunsystem ist gekennzeichnet durch sofortige Abwehr ohne vorherigen Kontakt und ohne Anpassung an das jeweilige Antigen. Das adaptive Immunsystem ist in der Lage, sich spezifisch an den jeweiligen Angreifer anzupassen und ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, sodass der Organismus bei dem nächsten Angriff desselben Erregers umso rascher und wirksamer gegen das Epitop reagieren kann. Es kommt als Kennzeichen höherer Lebewesen ausschließlich bei Vertebraten vor (Parkin und Cohen, 2001).

3.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Abwehr stellt die erste Barriere gegen Erreger dar und setzt sich aus zellulären - darunter dendritische Zellen (DC), Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK), $\gamma\delta$ -T-Zellen und natürliche Killer-T-Zellen (NKT) - physikalischen und chemischen Bestandteilen zusammen (Lakshmi Narendra u.a., 2013). Es vermag, eine direkte, unspezifische Abwehr ohne vorherigen Kontakt oder Sensibilisierung einzuleiten, und bildet über vielfältige Vernetzungen eine Brücke zum adaptiven System. Hierbei spielen vor allem die Präsentation vonprozessierten Antigenen auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie DCs sowie die Signalvermittlung über lösliche Faktoren, den Zytokinen, eine entscheidende Rolle. Es sind vor allem die Interleukine und Interferone für Immunmodulation und Signalvermittlung zwischen Leukozyten sowie die Chemokine für die zielgerichtete Bewegung von Zellen von großer Bedeutung. Interferone lassen sich weiter in Typ-

I-Interferone (IFN- α und IFN- β) und Typ-II-Interferone (IFN- γ) unterteilen. Typ-I-Interferone sind vorwiegend für die antivirale Abwehr verantwortlich und werden von Monozyten und Fibroblasten produziert. Typ-II-Interferone dienen hingegen als Stimulanz für Neutrophile, Makrophagen und NK-Zellen und verbessern die MHCII-Expression, was für die Erkennung von entarteten Zellen einen großen Vorteil darstellt. Sie werden ausschließlich von Zellen des Immunsystems hergestellt (Parkin und Cohen, 2001).

3.1.2 Natürliche Killerzellen

Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil des angeborenen Immunsystems und gehören zu der lymphatischen Zellreihe. Sie machen etwa 15% der frei zirkulierenden Lymphozyten aus und kommen auch in peripheren Organen, wie Leber, Peritoneum oder Plazenta vor (Cerwenka und Lanier, 2001).

Sie sind in der Lage, ohne vorherigen Pathogenkontakt virusinfizierte oder entartete Zellen zu erkennen und mittels Perforin und Granzymen zu lysieren. Perforin lagert sich dabei in der Zellmembran der Zielzelle ein und bildet Poren, durch die Granzyme in die Zelle gelangen und die Apoptose induzieren.

Weiterhin schlagen NK-Zellen eine ent-

scheidende Brücke zum adaptiven Immunsystem durch Produktion großer Mengen IFN- γ , welche für eine effiziente Immunantwort der zytotoxischen T-Zellen (CTL) des adaptiven Systems essenziell sind. Aber auch andere proinflammatorische sowie immunsuppressive Zytokine, wie TNF bzw. IL-10, Wachstumsfaktoren und eine Reihe von Chemokinen werden von NK-Zellen sezerniert (Vivier u.a., 2011).

Aktivierung und Inhibition von NK-Zellen

NK-Zellen werden durch ein komplexes System aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Wichtig ist hierbei das Gleichgewicht aus Inhibition und Aktivierung, welches über die Funktion der NK-Zelle entscheidet. Überwiegt das System der aktivierenden Rezeptoren, findet eine Aktivierung der NK-Zellen statt, ebenso aber, wenn die Wirkung der inhibierenden Rezeptoren wegfällt (Abb. 3.1).

Eine Schlüsselposition bei den inhibierenden Rezeptoren übernimmt eine Reihe von MHC-I-spezifischen Rezeptoren (wie der humane KIR-Rezeptor bzw. der murine Ly-49-Rezeptor), mit deren Hilfe die NK-Zellen erkennen, ob es sich bei der Zelle um eine körpereigene oder fremde Zelle handelt. Die NK-Zellen durchlaufen dabei einen Reifungsprozess, bei dem sie lernen, Selbst-MHC-I-Moleküle zu erkennen, um

dann zwischen Zellen mit Selbst-Molekülen und fehlendem Selbst (*missing self*) zu unterscheiden (Kim u.a., 2005; Anfossi u.a., 2006). Beim Zustand des *missing self* regulieren körpereigene Zellen unter Stress – beispielsweise bei einer Infektion oder malignen Entartung – ihre MCH-I-Moleküle herunter, wodurch ihre Inhibierende Wirkung auf NK-Zellen entfällt. Dieser Mechanismus wurde erstmals von Klas Kärre beschrieben (Kärre u.a., 1986). Die inhibie-

rende Wirkung wird auf der zytoplasmatischen Seite über das *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) vermittelt (Vivier u.a., 2004).

Auf der anderen Seite steht eine Reihe von aktivierenden Rezeptoren zur Verfügung, wobei zur Abwehr von Tumoren vor allem der NKG2D-Rezeptor von Bedeutung ist. Dieser sowohl humane als auch murine Rezeptor ist auch auf anderen Immunzellen, wie CTLs, anzutreffen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehr verschiedener Tumoren, welche NKG2D-Liganden wie MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*) und ULBP (*UL-16 binding protein*) beim Menschen bzw. RAE-1 (*retinoic acid inducible element 1*), MULT-1 (*murin ULBP-like transcript*) oder H60 bei der Maus auf ihrer Oberfläche exprimieren. NKG2D-Liganden werden als Zeichen beschädigter DNS im Rahmen der Tumorgenese hochreguliert und führen bei Rezeptorbindung zur Aktivierung der NK-Zellen und letztlich zur Lyse der Tumorzelle. Zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wird ebenfalls die Familie der *natural cytotoxicity receptors* (NCR) gezählt, darunter NKp30, NKp44 und NKp46. NCRs sind mit einem intrazytoplasmatischen *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) assoziiert, welches auch bei anderen Immunrezeptorkomplexen – z.B. BCR, TCR und Fc-

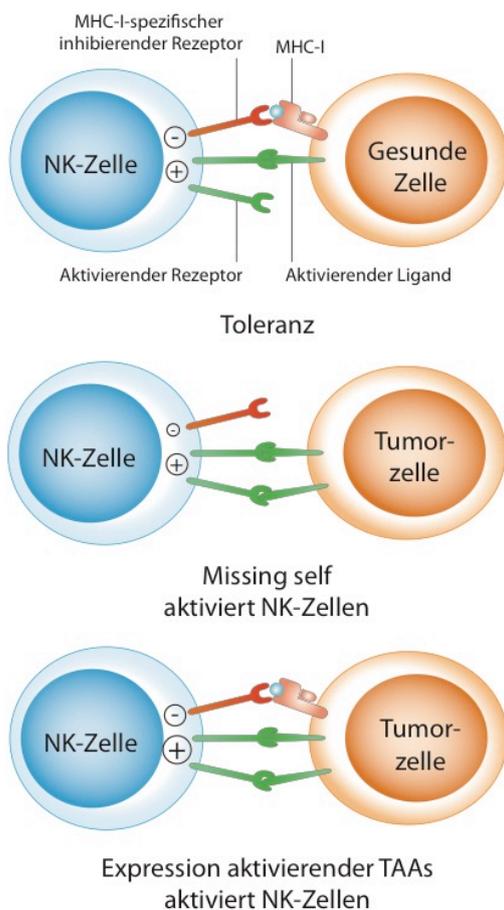


Abb. 3.1 NK-Zell-Aktivierung: Ausschlaggebend für den Aktivierungsstatus der NK-Zellen ist das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren; (Vivier und Ugolini, 2010)

Rezeptoren – anzutreffen ist (Cerwenka und Lanier, 2001; Farag u.a., 2002).

Überdies ist der Fc γ -Rezeptor-IIIa (Fc γ IIIa), auch bekannt als CD16, der sowohl beim Menschen als auch bei der Maus exprimiert wird, von entscheidender Bedeutung für die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Hierbei binden Antikörper an tumorspezifische Antigene und induzieren durch Bindung an die Fc γ IIIa-Rezeptoren eine zytotoxische NK-Zell-Antwort. Hinweise mehren sich, dass dieser Mechanismus essenziell ist für den Erfolg einiger etablierter Therapien mit monoklonalen Antikörpern, wie Rituximab (Vivier u.a., 2012). Tabelle 3 führt Beispiele für NK-Zell-Rezeptoren auf.

Zur Ausbildung der zytotoxischen und sekretorischen Fähigkeiten der NK-Zellen ist eine weitere Stimulation mit Zytokinen wie IL-2, IL-12, IL-15 und IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ notwendig (Smyth u.a., 2002). Das von DCs sezernierte IL-15 steigert die Translation von Perforin- und Granzym B-mRNAs, welche unverzichtbar ist für die Ausbildung der zytotoxischen NK-Zell-Funktion (Fehniger u.a., 2007; Ganai u.a., 2012). Auch IL-12 trägt bedeutend zur Aktivierung der NK-Zellen bei (Guia u.a., 2008).

Neuere Untersuchungen weisen noch auf eine weitere Ebene der Regulation hin: Regulatorische T-Zellen (Treg), eine

CD4⁺CD25⁺-Subpopulation von CD4⁺-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems, scheinen NK-Zellen durch den membrangebundenen *transforming growth factor* β (TGF- β) zu inhibieren, sodass die Depletion von Treg-Zellen zu einer verbesserten antitumoralen NK-Zell-Antwort führt und niedrige Treg-Zahlen bei Patienten mit gastrointestinalen Stromatumoren mit verlangsamter Tumorprogression korrelierten (Ghiringhelli u.a., 2005; Smyth u.a., 2006).

Tabelle 3. Aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren (Vivier u.a., 2008)

Aktivierende Rezeptoren		
Rezeptor	Spezies	Ligand
NKG2D	human	MICA, MICB, ULBP
NKp30, NKp44, NKp46	human	unbekannt
NKG2D	murin	RAE-1, H60, MULT-1
Ly-49H	murin	CMV-Ligand
NKp46	murin	unbekannt
Inhibierende Rezeptoren		
Rezeptor	Spezies	Ligand
KIR-L	human	HLA-C, -B und -A
Ly-49	murin	H-2K, H-2D
CD94/NKG2A	h/m	HLA-E

Ein weiterer Aspekt ist die Steuerung der NK-Zell-Aktivität durch die Sekretion und Bindung von IL-2. Dieses Interleukin, von

CD4⁺-Zellen sezerniert, ist entscheidend für die Proliferation, INF- γ -Sekretion und verbesserte Erkennung des fehlenden Selbst bei NK-Zellen. IL-2 bindet dabei an den IL-2R α -Rezeptor (CD25), der sich neben NK-Zellen auch auf Treg-Zellen befindet. Treg-Zellen sind folglich in der Lage, den NK-Zellen das IL-2 zu entziehen. So kann eine Depletion von Treg-Zellen zu einer Verbesserung NK-Zell-basierter Immuntherapien führen (Shimizu u.a., 1999; Smyth u.a., 2006; Kerdiles u.a., 2013).

Ein entscheidendes Signal zur Einwanderung von NK-Zellen geben die Chemokinrezeptoren CCR2 (Morrison u.a., 2003), CCR5 (Khan u.a., 2006), CXCR3 (Martín-Fontecha u.a., 2004) und CX3CR1 (Huang u.a., 2006), deren Liganden es vermögen, NK-Zellen zielgerichtet in Richtung des Entzündungsherds zu locken (Vivier u.a., 2008).

3.1.3 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist charakterisiert durch Antigen-spezifische Antworten,

3.2 Tumormunologie

Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung von Tumoren hat die Forschung schon über ein Jahrhundert beschäftigt. Schon Paul Ehrlich erkannte 1909, dass das

die in zwei Schritten entstehen:

Die Differenzierung und Aktivierung der B-Zellen wird durch direkte Erkennung des Antigens durch die Antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptoren in Gang gesetzt. Den T-Zellen hingegen muss das Antigen auf MHC-Molekülen präsentiert werden, damit diese aktiviert werden.

Der zweite Schritt entspricht der Ausübung der Effektorfunktion: T-Zellen in Form von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL) wirken direkt zytotoxisch spezifisch auf die das Antigen exprimierende Zelle; Weiterhin treiben CD4⁺-T-Zellen – auch T-Helferzellen genannt – durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-2 die Reifung und Aktivierung von CTL und NK-Zellen voran.

B-Zellen setzen nach Differenzierung zu Plasmazellen Antigen-spezifische Antikörper frei, was die humorale Antwort des adaptiven Immunsystems darstellt (Parkin und Cohen, 2001).

Immunsystem den Menschen vor Tumoren bewahren könnte, indem es diese erkennt und eindämmt (Ehrlich, 1909).

Aufgrund des geringen Wissensstandes zum

damaligen Zeitpunkt dauerte es jedoch weitere 50 Jahre, bis Burnet 1957 seine Hypothese zur Immunüberwachung von Tumoren aufstellte, welche das adaptive Immunsystem in der Verantwortung der Tumorabwehr sah (Burnet, 1957). Dies nachzuweisen, fehlten jedoch die technischen Möglichkeiten, sodass erst in den 1990er Jahren durch verbesserte Mausmodelle mit auf genetischer Ebene bestehender Immundefizienz die Idee wieder aufgegriffen wurde und die Rolle von IFN- γ bei immunologisch gestützter Abstoßung von Tumoren erforscht wurde (Dunn u.a., 2002).

Heute wissen wir, dass das Immunsystem bei der Abwehr von Tumoren prinzipiell drei Funktionen übernimmt:

1. Abwehr von Viren, die Tumoren induzieren (z.B. das humane Papillomvirus bei Zervixkarzinom)
2. Verhinderung eines inflammatorischen Milieus, welches die Tumorgenese fördert
3. Direkte Lyse von Tumorzellen durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystem

(Schreiber u.a., 2011)

3.2.1 Immuneditierung

Tumorzellen exprimieren tumorassoziierte

Antigene (TAA), die sie von gesunden Zellen unterscheiden und so für die Erkennung durch das Immunsystem empfänglich machen. Die Tumoren werden dabei vom Immunsystem durch ihre unterschiedliche Immunogenität seligiert oder eben „editiert“. Im immunkompetenten Wirt werden Tumorzellen mit hoher Immunogenität erkannt und getötet, wohingegen die wenig immunogenen Tumorzellen bestehen bleiben und weiter proliferieren (Shankaran u.a., 2001). Die Tumoreditierung wird im Allgemeinen in drei Phasen eingeteilt: Elimination, Äquilibrium und Evasion.

Die **Elimination** beschreibt die vollständige Abstoßung des Tumors, die durch eine hohe Immunogenität der TAAs und eine orchestrierte Immunantwort von angeborenem und adaptivem Immunsystem gewährleistet wird. RAE-1, H60 oder MICA/B, typische NKG2D-Liganden an NK-Zellen, sind hier als wichtige Beispiele zu nennen, welche häufig auf Tumorzellen zu finden sind (Schreiber u.a., 2011).

In der **Äquilibrium**-Phase gelingt es einigen Tumorzellvarianten, der Elimination zu entgehen, jedoch werden sie vom adaptiven Immunsystem in Schach gehalten. Die verbleibenden Tumorzellen können dabei über Jahrzehnte im Wirt ruhen, ohne dass es zu einem Auswachsen der Tumoren kommt.

Die **Evasion** ist gekennzeichnet durch einen

progressiv wachsenden, sichtbaren Tumor. Diesem gelingt es, sich in dieser Phase der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen, wobei unterschiedliche Mechanismen zum Tragen kommen. Zum einen wird die Immunogenität des Tumors, beispielsweise durch Verlust von Tumorantigenen, reduziert. Zum anderen schaffen es die Tumorzellen, durch die Etablierung eines supprimierenden Tumormilieus das Immunsystem zum Erliegen zu bringen. Dabei spielen die Produktion immunsupprimierender Zytokine wie TGF- β , IL-10 oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF), aber auch die Rekrutierung regulatorischer Immunzellen wie regulatorischer T-Zellen (Treg) und *myloid-derived suppressor cells* (MDSC) eine entscheidende Rolle.

3.2.2 Rolle der NK-Zellen in der Tumorummunologie

- Eine wichtige Säule stellt die Aktivierung über NKG2D-Rezeptoren dar, die häufig auf Tumorzellen überexprimiert werden. Auch wenn andere NK-Zell-Rezeptoren ebenfalls Tumorlyse vermitteln können, so ist der NKG2D-Rezeptor hervorzuheben, da NKG2D-Liganden, wie H60, RAE-1 oder MULT1, häufig auf Tumorzellen diverser Tumorarten überexprimiert werden (Cerwenka und Lanier, 2001).
 - Als weitere wichtige Schwelle der Tumorabwehr kommt das bereits erwähnte *missing-self*-Prinzip bei NK-Zellen zum Tragen (Kärre u.a., 1986). Hierbei werden NK-Zellen durch mangelhafte Expression von MHC-I-Rezeptoren auf den Tumorzellen aktiviert.
 - Mangelhafte Lymphozyteneinwanderung ist ein häufiges Problem bei Zellbasierter Immuntherapie, trotz teils nur geringer Funktionseinschränkung der Zellen. Dies hat unter anderem zur Folge, dass Tumortherapien oft nicht den erhofften Erfolg erbrachten (Mukai u.a., 1999; Huang, 2002; Sato u.a., 2005). NK-Zell-Infiltration ist ein entscheidender positiver prognostischer Faktor bei diversen Tumoren wie kolorektalem Karzinom, Magenkarzinom oder Bronchialkarzinom (Coca u.a., 1997; Ishigami u.a., 2000; Takanami u.a., 2001; Villegas u.a., 2002). Als Ursache der mangelnden Infiltration identifizierte man sowohl eine insuffiziente Expression von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel von Tumoren als auch die verringerte Fähigkeit von Zytokinen, die Expression dieser Adhäsionsmoleküle zu steigern (Griffioen u.a., 1996; Ronald u.a., 2008; Wennerberg u.a., 2014).
- NK-Zelleinwanderung ist als positiver

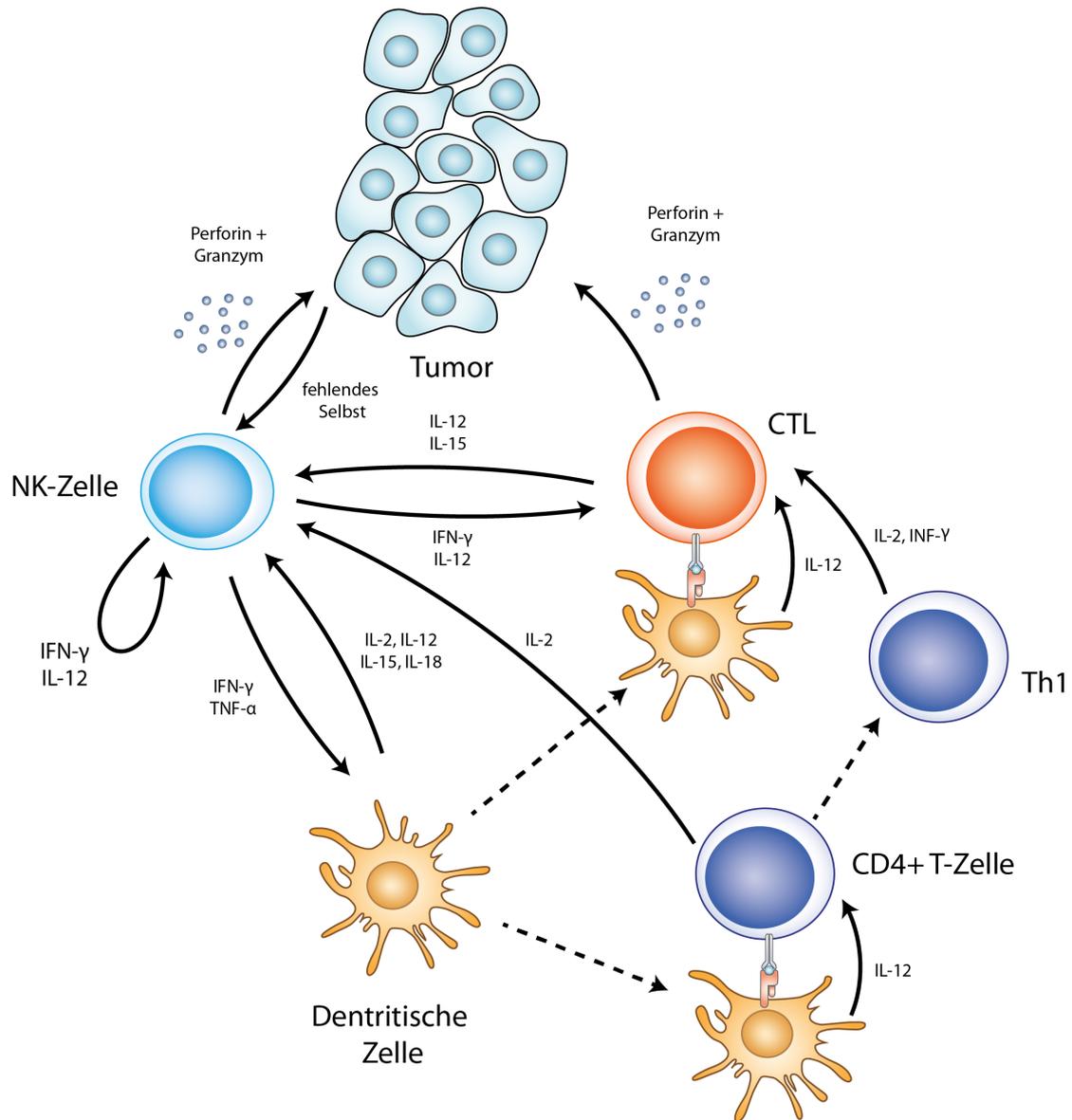


Abb. 3.2 Die zentrale Rolle der NK-Zellen bei der Abwehr von Tumoren: Nach ihrer Aktivierung durch fehlendes Selbst produzieren NK-Zellen große Mengen an IFN- γ sowie TNF. IFN- γ aktiviert DCs. Diese vermitteln durch IL-12-Sekretion die Reifung der CTL sowohl direkt, als auch indirekt über das Priming von CD4⁺-Zellen. Die CTL sind zusammen mit den aktivierten NK-Zellen für die primäre Lyse der Tumorzellen verantwortlich und können sich überdies zu potenten Gedächtnis-T-Zellen weiterentwickeln (Mocikat u.a., 2003).

prognostischer Faktor in einer Reihe von Tumoren identifiziert worden (Galon u.a., 2006). Jedoch ist eine mangelnde Infiltration durch Immunzellen ein bekanntes Problem, was in der Vergangenheit zu dem eingeschränkten Erfolg von Zell-basierten Therapien beitrug.

Das von NK-Zellen stammende IFN- γ trägt über die Aktivierung von DCs zur Polarisierung von CD4⁺-Zellen in Richtung Th1 bei. Das Th1-Priming wird über die Sekretion von IL-12 durch DCs vermittelt. NK-Zellen werden hierbei aus dem peripheren Blut CXCR3- und CD62L-abhängig zum

Entzündungsherd rekrutiert und bieten durch eine frühe Produktion von IFN- γ ein entscheidendes Signal für die Th1-

Polarisierung und somit für eine effektive Antwort des adaptiven Immunsystems (Martín-Fontecha u.a., 2004).

3.3 Spontantumormodell

Entscheidend für die Untersuchung von Tumormodellen ist, dass die Gegebenheiten der realen Tumorentwicklung möglichst realitätsnah wiedergespiegelt werden. Dazu ist es erforderlich, den Tumor nicht durch eine Injektion von Tumorzellen zu initiieren, sondern zu veranlassen, dass er spontan und autochthon entsteht. Dabei wächst der Tumor, wie auch beim Menschen, aus einzelnen entarteten Zellen, welche den einzelnen Stufen der Immuneditierung unterworfen sind. Ein ausgewachsener Tumor entsteht also aus Zellen, die trotz Immunabwehrmechanismen in die Stufe der Evasion gelangt sind.

Daher wurde mit einem transgenen Mausmodell gearbeitet, in dem sich B-Zell-Lymphome aufgrund der Überexpression des Protoonkogens *c-myc* ausbilden.

In dem angewandten transgenen Mausmodell unterliegt die Expression von *c-myc* der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Ig- λ -Enhancers. Die Mäuse entwickeln dadurch nach etwa 12-16 Wochen monoklonale B-Zell-Lymphome, welche histologisch und

phänotypisch (IgM⁺CD19⁺CD5⁻CD23⁻) dem humanen Burkitt-Lymphom (BL) stark ähneln. Die Mäuse präsentieren sich mit einer ausgeprägten Lymphadenopathie und nur marginaler Splenomegalie, was den Ursprung des Lymphoms eher in den Lymphknoten als in der Milz vermuten lässt. Histologisch zeigt sich ein diffus infiltrierendes Lymphom mit dem für BL charakteristischen Erscheinungsbild eines „Sternehimmels“ (Kovalchuk u.a., 2000).

Das Burkitt-Lymphom, ein Non-Hodgkin-Lymphom, wurde erstmals 1958 von Denis Burkitt bei Kindern in Zentralafrika beschrieben (Burkitt, 1958). Das endemische Auftreten in Afrika ließ eine infektiöse Genese vermuten, und so identifizierte der Pathologe Anthony Epstein zusammen mit seiner Kollegin Yvonne Barr 1964 ein Herpes-Virus, welches mit der Entstehung des Burkitt-Lymphoms assoziiert ist, heute als Epstein-Barr-Virus (EBV) bekannt (Epstein u.a., 1964; Bornkamm, 2009).

C-myc-Tumoren dienen so als geeignetes Modell des Burkitt-Lymphoms.

3.4 Fragestellung

3.4.1 Ausgangssituation

- Transplantierte MHC-I^{low} A20-Lymphome können von endogenen NK-Zellen direkt lysiert werden. Hierbei kommt die direkte Lyse durch aktivierte NK-Zellen entsprechend der *missing self*-Theorie zum Tragen. NK-Zellen sind weiterhin in der Lage, durch Produktion von INF- γ DCs zu aktivieren, die wiederum durch Freisetzung von IL-12 CD8⁺-Zellen stimulieren und eine höchst effiziente CD8⁺T-Zell-Gedächtnisantwort generieren. (Mocikat u.a., 2003). Weder bei der initialen Abwehr durch NK-Zellen noch bei der Gedächtnisantwort ist die Hilfe durch CD4-Zellen nötig.
- DC-aktivierte NK-Zellen sind in der Lage, A20-Lymphome NKG2D-vermittelt zu lysieren. Dabei ist die Höhe der Expression von NKG2D-Liganden auf Tumorzellen entscheidend. Dies findet CD4⁺Zell-unabhängig statt. Für eine vollständige Tumorabstoßung ist jedoch die gemeinsame Abwehrantwort von NK-Zellen und CTLs notwendig. NK-Zellen tragen weiterhin durch Sekretion von INF- γ zur Stimulation von DCs

bei, was über IL-12-Sekretion von DCs zur Aktivierung von CTLs führt. Erst dadurch sind CTLs in der Lage, Tumoren primär zu lysieren und eine adäquate Gedächtnisfunktion auszubilden. Die Gedächtnisfunktion scheint ausschließlich von T-Zellen ausgeübt zu werden (Adam u.a., 2005).

- Die NK-Zelleinwanderung in transplantierte RMA-S-Lymphome ist INF- γ - und CXCR3/CXCL10-abhängig. CXCR3-Expression, nicht aber INF- γ -Rezeptor-Expression, ist dabei Bedingung für die Einwanderung ins Tumorgewebe. INF- γ bewirkt nur indirekt die NK-Zell-Einwanderung, indem es die CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 im Tumorgewebe induziert. CXCL10 übt hierbei die stärkste chemotaktische Aktivität aus und führt zu CXCR3-vermittelter CD27^{hoch}-NK-Zelleinwanderung (Wendel u.a., 2008).
- Endogene NK-Zellen werden zwar CXCR3-abhängig gezielt zu endogen wachsenden Lymphomen von transgenen λ -myc-Mäusen rekrutiert und zeigen dort einen aktivierten Phänotyp (Hochregulierung von CD45R und CD69), verlieren dort jedoch ihre Fä-

higkeit, $\text{IFN-}\gamma$ zu produzieren, und können somit keine adäquate Tumorabwehr über die NK-Zell/DC/T-Zell-Achse induzieren. Dies stellt einen klaren Unterschied zu transplantierten Tumoren dar, in denen eingewanderte NK-Zellen nicht ihre Effektorfunktion verlieren und weiterhin $\text{INF-}\gamma$ sezernieren (Brenner u.a., 2010).

- Bislang wurde angenommen, dass $\text{INF-}\gamma$ die Voraussetzung für die Expression von CXCL9 und CXCL10 sei. Allerdings wurden beide Chemokine in hohen Konzentrationen in Spätstadien von autochthonen λ -myc-Lymphomen gemessen, in denen die $\text{INF-}\gamma$ -Produktion üblicherweise versiegt. Somit wurde gezeigt, dass $\text{INF-}\gamma$ für die Expression von CXCL9 und CXCL10 nur in den Frühstadien benötigt wird, in den Spätstadien hingegen die Chemokinexpression $\text{INF-}\gamma$ -unabhängig erfolgt (Przewoznik u.a., 2012).
- Auch exogen zugeführte WT-NK-Zellen sammeln sich gezielt in tumortragenden Organen von c-myc-Mäusen, wie Milz und Lymphknoten, und proliferieren dort. Werden hingegen NK-Zellen kranker Tiere mit eingeschränkter Effektorfunktion entnommen und in gesunden WT-Mäusen

passagiert, sind diese bereits nach 18 Stunden wieder in der Lage, ihre Effektorfunktion auszuüben. Es scheint also das Milieu im Tumor zu sein, das die NK-Zellen inhibiert und sie daran hindert, eine effektive Anti-Tumor-Antwort zu initiieren. Auch *ex vivo* isolierte WT-NK-Zellen verlieren ihre Funktion, wenn sie mit c-myc-Nicht-NK-Zellen kokultiviert werden. Im Gegenzug regenerieren sich c-myc-NK-Zellen *in vitro* nach 18 Stunden in Kokultur mit WT-Nicht-NK-Zellen. Auch bei Kokultur mit der Lymphomzelllinie 291, einer aus einem c-myc-Spontantumor isolierten Tumorzelllinie, verlieren WT-NK-Zellen ihre Zytotoxizität und produzieren nur noch geringe Mengen $\text{INF-}\gamma$ (Johann Pözl, unveröffentlichte Daten).

3.4.2 Offene Fragen

Die vorliegende Arbeit soll folgende Fragen klären:

- Ist Zell-Zell-Kontakt zur Inhibition der NK-Zellen notwendig?
- Welche löslichen Stoffe könnten verantwortlich sein?
- Welche Teilfunktion von NK-Zellen ist inhibiert – die Zytokinsekretion

und/oder die zytotoxische Effektorfunktion?

- Können sich Zellen von der Inhibition erholen?
- Welchen Einfluss hat der Säure-Base-Haushalt und der Stoffwechsel des Tumors? Welche Möglichkeiten gibt es, auf diesen positiv einzuwirken?
- Kann die NK-Zelleinwanderung zum Tumorherd verbessert werden? Bietet hier die Verankerung des NK-Zell-Chemokin-Rezeptorliganden CXCL10 Vorteile gegenüber einer Injektion von löslichem CXCL10?

4 Material

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Corning® HTS Transwell®-96 Zellkultursystem	Corning, Schipol-Rijk, Niederlande
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalspritzen 10 ml	B. Braun Melsungen, Melsungen
Falcon® Cell Strainer 40 µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon®-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kulturflaschen 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Light Cycler® 2.0	Roche, Mannheim
LumaPlate™-96	Perkin Elmer, Rodgau
MACS-Säule	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Microplate-Szintillationszähler Top-Count NXT	PerkinElmer, Rodgau
Mikroliterspritzen	Innovative Labor Systeme, Stützerbach
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg/ Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischale groß	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischale klein	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Gilson, Middleton, USA/ Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plattenzentrifuge Labofuge 400	Heraeus Instruments, Hanau
Sterilfilter 22µm	neoLab, Heidelberg
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Air liquid, Düsseldorf
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge Beckmann TL-100	Beckman-Coulter, Krefeld
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zählkammer	Biossirma, Cona, Italien
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau

4.2 Reagenzien und Chemikalien

Material	Hersteller
10x Permeabilization Buffer	eBioscience, Frankfurt
BioPlex Pro™ Mouse Cytokine Standard Group I 23-Plex	BioRad Laboratories, München
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt
CFSE	Life Technologies, Darmstadt
Chrom-51	Hartmann Analytic, Taufkirchen
Dispase	Becton Dickinson, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe
IC Fixation Buffer	eBioscience, Frankfurt
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Live/Dead® Fixable Blue-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
MACS-Kit „NK Cell Isolation Kit I/II“	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Matrigel™ Matrix	Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oxamsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TriZolReagent™	Biozol, Eching
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	ICN, Eschwege

4.3 Medien und Puffer

4.3.1 10 %-FCS-1640-RPMI-Medium

- 1640-RPMI ohne L-Glutamin

- 10 % FKS
- 100 U/ml Penicillin-G-Natrium
- 100 µg/l Dihydrostreptomycinsulfat
- 2 mM L-Glutamin
- 1 mM Natrium-Pyruvat
- 5 ml nicht essenzielle Aminosäuren
- 50 µM β-Mercaptoethanol

von Invitrogen, Karlsruhe

4.3.2 Lysepuffer (pH 7,4)

- 16,5 g NH₄Cl
- 2,0 g KHCO₃
- 74 mg Na-EDTA
- ad 200 ml H₂O

nach Becton Dickinson, Heidelberg

4.3.3 FACS-Medium

- PBS
- 2 % FKS
- 2 mM EDTA
- 1 % Natriumazid

4.3.4 Einfriermedium

- 90 % FKS
- 10 % DMSO

4.4 Zellen

Material	Beschreibung	Hersteller/Herkunft
RMA	B-Zell-Lymphomlinie	(Kärre u.a., 1986)
RMA-S	B-Zell-Lymphomlinie, abgeleitet von RMA ohne MHCI-Expression	(Kärre u.a., 1986)
291	B-Zell-Lymphomlinie etabliert aus c-myc-Mäusen	Labor A. Gerbitz
YAC-1	Murine Lymphomzelllinie	(Kiessling u.a., 1975)

4.5 Primer

Material	Primer vorwärts	Primer rückwärts
IL-6	AGTTGCCTTCTTGG-GACTGA	TCCACGATTTCACAGAGAAC
IL-10	CCAAGCCTTATCG-GAAATGA	TTTTCACAGGGGAGAAATCG
TGF- β	TGCGCTTGCAGAGAT-TAAAA	CTGCCGTACAACCTCCAGTGA

4.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Markierung	Hersteller
CD107a	1D4B	IgG2b, kappa	FITC	BioLegend
CD19	1D3	IgG2a	V450	Becton Dickinson
CD3	500A2	IgG	FITC	eBioscience
CD3e	17A2	IgG2b	eF450	eBioscience
CD4	RM4-5	IgG2a	PerCP	Becton Dickinson
CD8b	eBioH35-17.2	IgG2b	AF488	eBioscience
CXCR3	CXCR3-173	IgG	APC	BioLegend
Granzym A	90	IgG2a, kappa	PE	eBioscience
Granzym B	16G6	IgG2b, kappa	FITC	eBioscience
IFN- γ	XMG 1.2	IgG1	FITC	Becton Dickinson
IFN- γ	XMG 1.2	IgG1, kappa	APC	BioLegend
NK 1.1	PK136	IgG2a	PE	Becton Dickinson
Perforin	eBioOMAK-D	IgG2b, kappa	APC	eBioscience

4.7 Software

Für die Erfassung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurden die Programme BD FACSDiva (Becton Dickinson) und FlowJo Flow Cytometry Analysis Software (Treestar Inc., Ashland, OR, USA) - zuletzt in der Version 8.8.6 - verwendet.

Als Text- und Tabellenbearbeitungsprogramm wurde Microsoft Office (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwendet.

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurde zu einem kleinen Teil (Abb. 6.15 und 6.21) die Software GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA USA) verwendet. Zum überwiegenden Teil wurden jedoch die Diagramme mit Microsoft Office erstellt und statistisch ausgewertet. In den Diagrammen sind im Allgemeinen Mittelwerte dargestellt. Die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.

Die graphischen Darstellungen wurden mit Adobe Illustrator (Adobe Inc, San Jose, CA, USA) erstellt.

5 Methoden

5.1 Mäuse

Alle Mäuse wurden im Tierstall des Hämatologikums des Helmholtz-Zentrums München gehalten und gezüchtet. Als Wildtypen wurden C57BL/6-Mäuse verwendet, welche von Jackson Laboratory (USA) bezogen wurden.

Bei dem transgenen Mausmodell wird das humane Protoonkogen MYC unter der Kontrolle des Enhancers des Ig- λ -Lokus überexprimiert, wodurch sich nach ca. 12-

16 Wochen spontane B-Zell-Lymphome entwickeln, die sich vornehmlich in den zervikalen, mandibulären und axillären Lymphknoten finden. Zur Verfügung gestellt wurden die c-myc-Mäuse von Prof. Georg Bornkamm, Helmholtz-Zentrum München. Alle Tierexperimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

5.2 Zellkultur

Die Inkubation der Zellen in der Zellkultur erfolgte im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂-Gehalt und einer Luftfeuchte von 95 %. Um der Kontamination der Kulturen mit Erregern wie Bakterien oder Viren vorzubeugen, wurde stets unter einer Sterilwerkbank gearbeitet.

5.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Konservierung und Aufbewahrung der Zellen wurde Einfriermedium hergestellt aus 90% fetalem Kälberserum (FKS) und 10% Dimethylsulfoxid

(DMSO), das die Bildung von Eiskristallen verhindert und damit der Zerstörung der Zellen bei der Kryokonservierung entgegenwirkt. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von DMSO wurde während aller Arbeitsschritte auf Eis gearbeitet.

Die Zellen wurden in PBS gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt, bevor sie in einer Konzentration von 10⁶-10⁷ Zellen/ml im Einfriermedium resuspendiert und auf Kryoröhrchen verteilt wurden. Zum schonenderen Einfrierprozess wurden die Kryoröhrchen in eine mit Isopropanol gefüllten Einfrierschale gegeben und dann

zunächst bei -80°C eingefroren. Nach ca. einer Woche wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in einen Flüssigstickstofftank bei -196°C überführt.

Die aus dem Stickstofftank auf Flüssigstickstoff gelagerten Zellen wurden zum Wiederauftauen möglichst rasch in auf 37°C erwärmtem 10%-FCS-Basismedium resuspendiert und in ein Falcon®-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (5 min x 1500 Umdrehungen/min) wurde der Überstand abgesaugt und zur Weiterverarbeitung im jeweils zu verwendenden Medium aufgenommen.

5.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in PBS in der Regel im Verhältnis 1:1 – bei höherer Zelldichte auch höher verdünnt – mit Typanblau vermischt, welches in tote

Zellen eindringt und sie somit eindeutig identifizierbar macht. Die Zellsuspension wurde dann in die Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl der lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop durch Auszählen aller vier Großquadrate bestimmt. Hierbei wurde folgende Formel angewendet:

$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert der Großquadrate} \times 10^4 \times 2 \text{ (bei Verdünnungsfaktor 1:1)}$
--

Durch Multiplikation des Volumens der ursprünglichen Zellsuspension konnte so die Gesamtzellzahl ermittelt werden.

5.2.3 Herstellen von Kulturüberständen

Kulturüberstände wurden standardisiert hergestellt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Es wurden je 1×10^6 Zellen in $200\ \mu\text{l}$ 10%FCS-RPMI-Medium in einer 96-Well-Platte ausplattiert und – wenn nicht anders spezifiziert – für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

5.3 Durchflusszytometrie

5.3.1 Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie, im Englischen *fluorescence activated cell sorting* (FACS), können suspendierte Zellen auf-

grund ihrer Oberflächenmoleküle mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörpern quantitativ differenziert werden. Aber auch intrazelluläre Proteine können gemessen werden und Rückschluss auf Funktionen der Zelle

geben.

Man markiert die Zellen zunächst mit Antikörpern, welche an ein Fluorochrom gekoppelt sind. Anschließend werden die Zellen in Suspension vom Durchflusszytometer angesogen und hierbei die an die Zellen gekoppelten Fluorochrome im Fluss von einem Laser zur Emission eines spezifischen Farbspektrums angeregt. Das emittierte Licht wird detektiert und digital als Datensatz gespeichert. Ein Farbspektrum wird hier jeweils separat in einem eigenen Kanal gemessen. Eine einzelne Zelle kann so mit mehreren Antikörpern für verschiedene Antigene markiert werden, solange Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren verwendet werden. Heutzutage steht eine große Bandbreite an verschiedenen Fluorochromen zur Verfügung, was die Analyse einer einzelnen Zelle auf mehrere Merkmale gleichzeitig ermöglicht.

Im Anschluss erfolgt die Auswertung der aufgezeichneten Datensätze mit einer dafür entwickelten Software. Die Auswahl der Zellen wurde hierbei zunächst auf die Zellpopulation von Interesse eingegrenzt und dann eventuell auf ihre Zytokinniveaus untersucht.

5.3.2 Oberflächenfärbung

Bei Färbung der Oberflächenmoleküle wurden zunächst 10^6 Zellen in FACS-Puffer

suspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen zusammen mit den jeweiligen Antikörpern in der jeweils idealen Konzentration für 20 Minuten bei 4° C im Dunklen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer konnte anschließend die Messung im Durchflusszytometer BD LSR II Flow Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) erfolgen. Für eine Unterscheidung der lebenden von toten Zellen wurde Propidiumiodid oder die Live/Dead® Fixable Blue-Lösung (Invitrogen) verwendet. Sollten die Zellen nicht sofort im Anschluss, sondern erst im Verlauf analysiert werden, war eine Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS erforderlich.

Zur Kompensation eventueller Interferenzen, die zwischen den einzeln gemessenen Kanälen auftreten können, wurden Kompensationsbeads eingesetzt. Diese Beads sind in der Positivkontrolle mit Antikörpern bestückt, welche die jeweils verwendeten Fluoreszenzantikörper binden. Den Negativ-Beads fehlen diese Antikörper. Auf diese Weise können Positiv- und Negativ-Kontrolle besser voneinander abgegrenzt werden. Der Vorteil der Beads besteht darin, dass wertvolle Zellproben vom Kompensationsvorgang ausgenommen werden und für die eigentliche Messung verbleiben.

5.3.3 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Zur Analyse der intrazellulären Bestandteile der Zelle, wie Zytokine, war es zunächst erforderlich, die Zellen 4 Stunden mit PMA und Ionomycin zu stimulieren und die Ausschüttung der Zytokine durch Zugabe von Brefeldin A zu verhindern. Im Anschluss wurden die Zellen zur Lebend-/Tot-Färbung mit Ethidiumbromid-Monoazid (EMA) unter Licht bei 4° C 20 Minuten inkubiert. Hierbei dringt EMA in tote Zellen ein und vernetzt sich mit der DNS. Nach zwei Waschgängen mit FACS-Puffer wurde mit der Oberflächenfärbung wie gewohnt fortgefahren.

Bei der Färbung der Zytokine war es notwendig, die Zellen als nächstes mit Fixpuffer

(IC Fixation Buffer, eBioscience, Frankfurt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur zu fixieren, um im folgenden Schritt die Zellwand zu permeabilisieren (Permeabilization Buffer, eBioscience, Frankfurt). Schließlich ließen sich im letzten Schritt die Zytokine mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 20 Minuten bei Raumtemperatur markieren und nach wiederholten Waschgängen im Durchflusszytometer analysieren.

5.3.4 CFSE-Färbung

Pro 10⁶ Zellen wurden 1 ml einer 1,25 µM CFSE-Färbelösung zu den Zellen im Falcon-Röhrchen gegeben und die Zellen bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach exakt 8 Minuten wurde die Färbelösung mit PBS 10-fach verdünnt, abzentrifugiert und nochmals mit PBS gewaschen.

5.4 Magnetische Zellsortierung

Die Isolierung der NK-Zellen für die weitere Verwendung in Kokulturen wurde mit Hilfe der immunmagnetischen Zellseparation, im Englischen *magnetic activated cell sorting* (MACS®), durchgeführt. Sie basiert auf der Markierung von Zellen durch mit Magnetpartikeln gekoppelten Antikörpern, mit deren Hilfe im nächsten Schritt diese markierten Zellen mit einem starken Mag-

neten seligiert werden. Es können dabei entweder die Zellen von Interesse (Positivselektion) markiert werden oder – wie bei der NK-Zell-Isolierung – alle Nicht-NK-Zellen (Negativ-Selektion).

Bei der NK-Zell-Isolierung wurden alle Nicht-NK-Zellen mit Antikörpern markiert, um die NK-Zellen unverändert für die weitere Verwendung zu belassen. Es war essen-

ziell, die Zellen nach der Lösung aus dem jeweiligen Gewebe gründlich zu waschen. So konnten verbleibende Gewebereste, die die Magnetsäule bei der Isolierung hätten verstopfen können, weitestgehend entfernt werden. Als weiterer Schritt wurden die Erythrozyten 60-90 Sekunden mit Lysepuffer lysiert, um diese Population bereits vor der MACS[®] auszuschließen. Hiernach mussten die Zellen erneut gründlich gewaschen werden, um die lysierten Zellbestandteile zu entfernen, welche sonst die optimale Bindung der Antikörper eingeschränkt hätte.

Die MACS[®] wurde strikt nach Protokoll des Herstellers (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst in MACS-Puffer aufgenommen und 5 Minuten bei 4° C mit dem Antikörper-Cocktail und im folgenden Schritt nach einem Waschgang mit den magnetischen Beads 10 Minuten bei 4° C inkubiert. Inkubationszeiten und Mischungsverhältnis von

Antikörpern bzw. magnetischen Beads variierten dabei, abhängig vom verwendeten Herstellerprotokoll.

Nach einmaligem Waschen wurden je 10⁸ Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und in die an den Magneten angebrachte Säule (LS Säule) pipettiert. In das unter der Säule platzierte Falcon-Röhrchen gelangten nun die nicht markierten Zellen (hier die NK-Zellen). Die markierten Zellen verbleiben dabei in der magnetisierten Säule. Um möglichst viele NK-Zellen zu erhalten, wurde in drei Durchgängen je 3 ml MACS[®]-Puffer auf die Säulen pipettiert, um die NK-Zellen möglichst gründlich aus den Säulen zu waschen. Schließlich wurden die erhaltenen NK-Zellen gezählt und Proben für die Reinheitsmessung abgenommen. Für die Reinheit der isolierten NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Oberflächenfärbung die NK1.1⁺CD3⁻Zellpopulation ermittelt.

5.5 Chromfreisetzungstest

Um die Zytotoxizität von NK-Zellen zu testen, besteht die Möglichkeit, diese Effektorfunktion durch die radioaktive Freisetzung aus mit Chrom-51 (⁵¹Cr) beladenen Zielzellen quantitativ zu bestimmen. Chrom-51, ein γ -Strahler, ist ein radioaktives Chrom-Isotop.

Als Zielzellen wurden YAC-Zellen kultiviert,

die durch geringe Expression der MHC-I-Moleküle ein starkes Aktivierungssignal für NK-Zellen darstellen (Kiessling u.a., 1975). 3x10⁶ YAC-Zellen wurden in einer möglichst vitalen und proliferativen Phase geerntet und nach einem Waschgang in 200 µl FKS aufgenommen. Die Natrium-Chromat-Lösung wurde entsprechend der

aktuellen Aktivität abgemessen und die YAC-Zellen hierin 90 Minuten bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die aktuelle Aktivität des Chroms wurde hierbei nach folgenden Gesetzmäßigkeiten berechnet:

$$A_t = A_0 \times e^{-\lambda t}$$

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

A_0 : Aktivität [Ci] zum Zeitpunkt t_0 (bekannte Größe)

A_t : Aktivität [Ci] zum Zeitpunkt t

t : Zeitintervall seit Zeitpunkt t_0

λ : Zerfallskonstante

$T_{1/2}$: Halbwertszeit

e : Eulersche Zahl

In der Zwischenzeit wurden die Effektorzellen (hier NK-Zellen) frisch präpariert bzw. aus Kokulturen abgenommen und ausgezählt.

Nach Inkubation wurden die Zielzellen in drei Waschgängen mit 10%-FKS-RPMI vom überschüssigen Chrom-51 befreit und ausgezählt. Effektor- und Zielzellen wurden in genauen Effektor/Ziel-Verhältnissen (100:1 bis 6,25:1) in je 100 µl Medium in einer 96-Lochplatte ausplattiert und für 4 Stunden bei 37° C im Brutschrank inku-

5.6 ELISA

Die Bestimmung verschiedener Zytokine in Zellüberständen wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die

Um nach Messung den Mittelwert bilden zu können, wurden stets Duplikate angelegt. Als Negativkontrollen dienten Überstände von Zielzellen ohne Effektorzellen (unspezifische Freisetzung), als Positivkontrolle die Messung der Zielzellen selbst (maximale Freisetzung). Im Anschluss erfolgte die Übertragung von je 50 µl zellfreiem Überstand auf eine 96-Loch-Luma-Platte, die über Nacht getrocknet wurde. Am folgenden Tag wurde die Strahlung der einzelnen Proben in Zählimpulsen pro Minute (cpm) in einem γ -Szintillationszähler bestimmt.

Die spezifische Zelllyse wurde anhand der gemessenen Werte mit folgender Formel ermittelt:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{(n_s - n_{us})}{(n_{max} - n_{us})} \times 100 \%$$

n_s : spezifische Freisetzung [cpm]

n_{us} : unspezifische Freisetzung [cpm]

n_{max} : maximale Freisetzung [cpm]

Die Werte der einzelnen Gruppen wurden anschließend in Tabellen übertragen und graphisch dargestellt.

Quantifizierung von Proteinen mittels Antikörpern, die an ein Enzym gekoppelt sind. Durch Umsetzung eines Substrats durch das Enzym entsteht ein Reaktionsprodukt, wel-

ches im Folgenden gemessen wird und Rückschluss auf das markierte Antigen gibt. Hierbei wurde strikt nach Anweisungen des Herstellers des ELISA-Kits Becton Dickinson verfahren.

Zu Beginn müssen spezielle ELISA-Lochplatten mit Fänger-Antikörpern über Nacht bei 4° C benetzt werden, woran später die Proteine fest binden. Im Folgenden wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Nach wiederholten Waschvorgängen und

Blockierung mit Blockpuffer wurden die jeweiligen Proben aufpipettiert und 2 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Enzym-gekoppelten Antikörper zugegeben, die spezifisch das Antigen binden. Nach einstündiger Inkubation wird schließlich das Substrat für 30 Minuten zugegeben und die Reaktion dann sofort mit Stopplösung angehalten.

5.7 Molekularbiologische Methoden

5.7.1 RNS-Extraktion

Es wurden 4×10^6 Zellen in 800 µl TRIReagent™ aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 160 µl Brom-Chlor-Propan, 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und 15 Minuten Zentrifugation bei 12000 RPM erfolgte die Auftrennung. Die RNS wurde mit 75% Ethanol gewaschen, erneut resuspendiert und zur vollständigen Lösung bei 60° C im Heizblock 10 Minuten inkubiert. Die Reinheitsmessung erfolgte im Nano-Drop-Spektralphotometer.

5.7.2 Gelelektrophorese

Zur qualitativen Beurteilung von cDNS-Proben und zur Prüfung der verwendeten

Primer erfolgte eine Gelelektrophorese. Agarose-Gel wurde aus 108 ml dest. H₂O, 3 g Agarose, 12 ml 10xTAE-Puffer und 4,5 µl Ethidiumbromid hergestellt und in der Gelelektrophoreseapparatur mit 1xTAE-Puffer bedeckt. Anschließend wurden je 10 µl der cDNS-Proben in 2 µl Ladepuffer auf die Taschen des Agarose-Gels gegeben und 40 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt und zuletzt mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

5.7.3 Reverse Transkription von RNS in cDNS

Die Umschreibung der RNS in cDNS erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim) und den angegebenen Primern (4.5) nach Herstellerangaben

und unter Verwendung des Thermocyclers TGradient (Biometra, Göttingen).

5.7.4 cDNS-Amplifikation und Berechnung der relativen Expression

Zur Quantifizierung der cDNS wurde das Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNS interkaliert und nur dann Licht über den Förster-Resonanzenergietransfer emittiert, wenn Donor- und Akzeptorsonde beieinander liegen. Die Proben wurden im Light Cycler® 2.0 (Roche, Mannheim) gemessen. Dabei wurde die relative Expression auf das Haushaltsgen HPRT normiert.

Die relative Expression wurde nach folgender Formel berechnet (Kronenberger u.a., 2008):

$$2^{(KP1-KP3)-(KP2-KP4)}$$

KP1: Kreuzungspunkt (KP) der Amplifikation von HPRT in Lymphomzellen

KP2: KP von HPRT in WT-LK-Zellen

KP3: KP des Genes von Interesse von Lymphomzellen

KP4: KP des Genes von Interesse in WT-LK-Zellen

6 Ergebnisse

6.1 IFN- γ -Freisetzung aus NK-Zellen nach Inkubation mit Kulturüberstand der Tumorzelllinie 291

Frühere Arbeiten konnten eindeutig zeigen, dass NK-Zellen sowohl *in vivo* nach Einwanderung in spontan gewachsene Lymphome als auch *in vitro* nach Kokultur mit aus c-myc-Lymphomen gewonnenen Nicht-NK-Zellen ihre Fähigkeit verlieren, IFN- γ zu produzieren (J. Pötzl, persönliche Mitteilung). Dabei sind endogene ebenso wie exogene, transferierte NK-Zellen betroffen, was einen Zusammenhang mit dem vorherr-

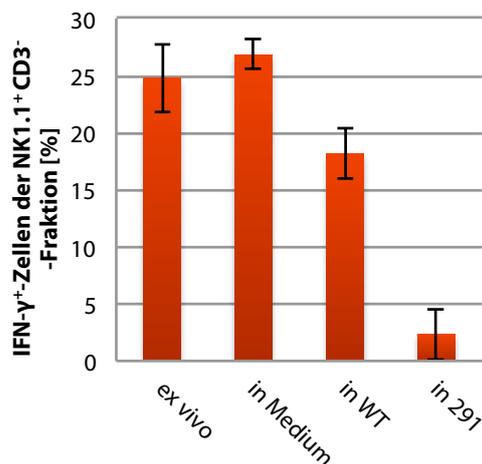


Abb. 6.1 Kokultur von NK-Zellen mit 291-Zellen (n=4): $0,5 \times 10^6$ WT-NK-Zellen wurden nach Entnahme mit 4×10^6 WT-Nicht-NK-Zellen, 4×10^6 291-Zellen bzw. reinem Medium für 18h inkubiert und anschließend nach Stimulation mit PMA/Ionomycin durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurden *Ex-vivo*-NK-Zellen mit eingeschlossen (Johann Pötzl, persönliche Mitteilung).

schenden Tumormilieu nahelegt.

Zunächst wurde ein *In-vitro*-Modell mit der Lymphomzelllinie 291, einer aus einem spontan wachsenden c-myc-Lymphom abgeleiteten Zelllinie, etabliert, um die genauen Zusammenhänge *in vitro* zu verstehen. Hierfür sollte zunächst die Wirkung von 291-Zellen auf WT-NK-Zellen untersucht werden. Für eine ausreichende INF- γ -Produktion war es erforderlich, dem Medium IL-2 (30 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) zuzugeben. Beide Zytokine sind gut bekannte Stimulantien der NK-Zell-Aktivierung (Waldmann u.a., 2001; Smyth u.a., 2002). Auf diese Weise ließen sich in normalem Medium IFN- γ^+ -NK-Zellfraktionen von 40-90 % messen. Als Kontrolle dienten im Folgenden NK-Zellen ohne PMA-Ionomycin-Stimulation bzw. Isotyp-Kontrollfärbungen.

Aufgrund der starken Schwankungen der positiv gemessenen Fraktion und ungleichmäßigen Verschiebungen der NK-Zellpopulation wurden im Folgenden die *mean fluorescence intensity* (MFI) angegeben (mit Ausnahme der Abb. 6.1).

Wie aus Abb. 6.1 ersichtlich, produzierten die NK-Zellen bei der 18-stündigen Kokultur mit der 291-Zelllinie kein $\text{INF-}\gamma$ mehr (Abb. 6.1; unveröffentlichte Daten von J. Pötzl).

Nun war zu klären, ob zellgebundene Faktoren auf der Zelloberfläche der Nicht-NK-Zellen oder gelöste Komponenten den ausschlaggebenden Einfluss auf die NK-Zell-Funktion nehmen. Hierzu wurden Kulturüberstände von 291-Zellen (291-TÜ) angelegt, mit denen anschließend WT-NK-Zellen inkubiert werden sollten. Die Zellkultur wurde 48 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel abzentrifugiert, der Tumorüberstand abgenommen und bei -20°C zwischengelagert.

Die Koinkubation der NK-Zellen mit diesen Tumorüberständen führte ebenso zu

einer deutlichen Einschränkung der sekretorischen Effektorfunktion, was erstmals auf eine in den Tumorüberständen gelöste Komponente hinwies, die für die Inhibition verantwortlich war (Abb. 6.2).

Unklar war, ob es sich dabei um einen inhibierenden Stoff handelte, der überproduziert wurde, oder ob die Tumorzellen durch beschleunigte Proliferation und ihren Metabolismus Nährstoffe im Medium verbrauchten, die folglich den NK-Zellen für deren Stoffwechsel nicht zur Verfügung standen. Letzteres wäre eher als artifizieller Effekt des *In-vitro*-Modells zu werten, wenn man davon ausgeht, dass die Zellen in der *In-vivo*-Situation ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden.

Die Grundidee bestand darin, durch Aufkonzentrierung des Tumorüberstandes mög-

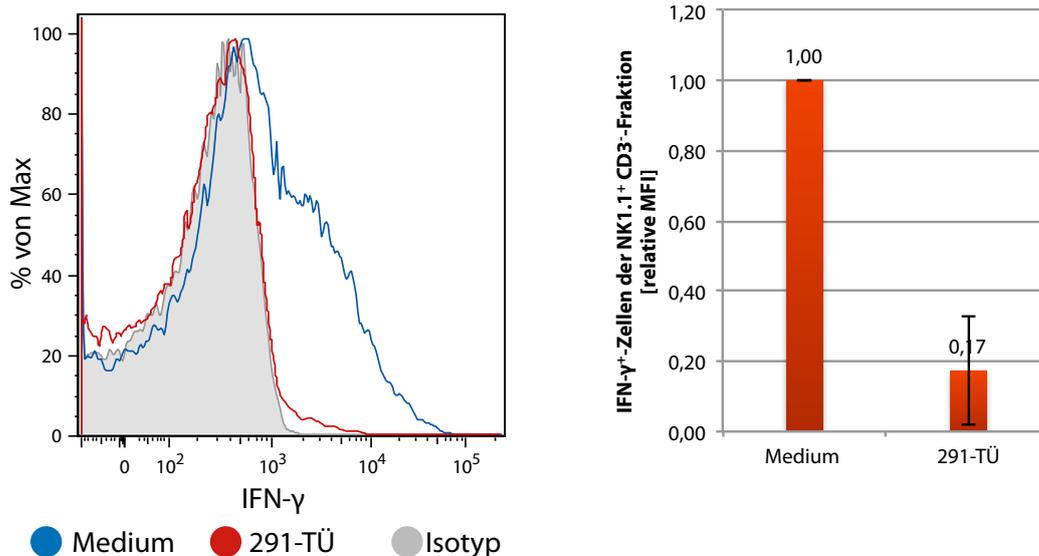


Abb. 6.2 Kokultur von NK-Zellen mit 291-Tumorüberständen: $0,5 \times 10^6$ NK-Zellen wurden *ex vivo* mit $200\ \mu\text{l}$ 291-TÜ bzw. $200\ \mu\text{l}$ Medium (5% FKS-RPMI) nach Zugabe von IL-2 und IL-15 über 18h inkubiert und nach Stimulation mit PMA/Ionomycin durchflusszytometrisch analysiert. Der TÜ wurde zuvor nach Inkubation von 291-Zellen über 48h ohne Mediumwechsel abgenommen und aliquotiert. Die sekretorische NK-Zell-Funktion ist nach Koinkubation mit 291-TÜ deutlich inhibiert. Links Darstellung eines repräsentativen Einzelexperimentes, rechts Mittelwerte und Standardabweichungen von 9 Einzelexperimenten.

lichst alle darin enthaltenen Stoffe zu bewahren und durch Zugabe von frischem Medium alle für die Zellen benötigten Nährstoffe zu resubstituieren. Hierzu wurden 400 µl 291-Tumorüberstand in einem Vakuumkonzentrator über eine Stunde eingengt, sodass lediglich 10 bis 20 % des ursprünglichen Volumens zurückblieb. Im Vakuumkonzentrator wird durch Anlegen eines Vakuums der Siedepunkt schon bei niedrigen Temperaturen erreicht, was die schonende Verdunstung von Flüssigkeiten ohne Verlust oder Denaturierung der darin gelösten Stoffe ermöglicht. Nach der Eingen-

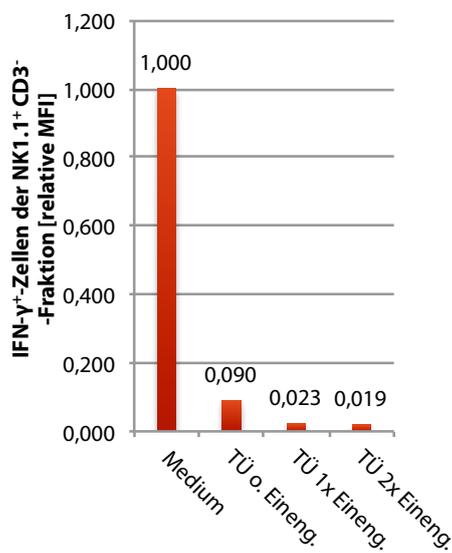


Abb. 6.3 WT-NK-Zellen in 291-Tumorüberstand (TÜ) mit/ohne Einengung des TÜ: Die Überstände wurden wie üblich hergestellt und anschließend je 400µl mittels Vakuumkonzentrator für 1h um ca. 90% eingengt. Der eingengte TÜ wurde in 5%FKS-Medium resuspendiert, in einem Ansatz im gleichen Volumen wie zuvor (400 µl = 1x Einengung) und in einem zweiten in der Hälfte des ursprünglichen Volumens (200µl = 2x Einengung). Der Versuch wurde einmal durchgeführt. Die Inkubation der NK-Zellen zeigte eine ebenso starke Inhibition der IFN-γ-Sekretion wie bei nicht eingengten TÜ. Somit ergibt sich kein Hinweis für den Effekt des „verbrauchten“ Mediums.

gung wurde der TÜ in 400 µl bzw. 200 µl 5%-FKS-RPMI-Medium resuspendiert, um die gleichen Nährstoffbedingungen für die NK-Zellen wiederherzustellen. In einem weiteren Ansatz wurde der TÜ nur in der Hälfte des ursprünglichen Volumens aufgenommen, um die Konzentration der gelösten Faktoren zu verdoppeln. Die Inkubation frisch isolierter WT-NK-Zellen mit dem eingengten 291-TÜ resultierte ebenso wie mit dem nicht eingengten TÜ in einer deutlichen Einschränkung der IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Die doppelt konzentriert eingengten TÜ hatte dabei einen vergleichbaren, maximal inhibierenden Effekt auf NK-Zellen. Auf diesem Weg ließen sich eventuelle Effekte eines „verbrauchten“

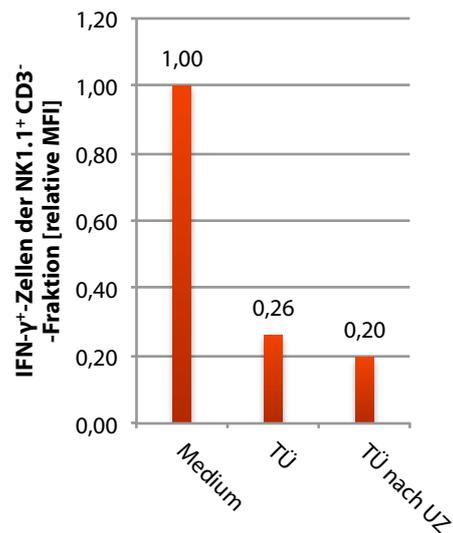


Abb. 6.4 WT-NK-Zellen in 291-TÜ mit/ohne Ultrazentrifugation: Je 600 µl 291-TÜ wurden über 2h bei 50000 UpM ultrazentrifugiert und je 400 µl Überstand unter Zurückbleiben des Sediments abgenommen und weiter für die Inkubation der NK-Zellen verarbeitet. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Mediums ausschließen (Abb. 6.3).

Somit war das Augenmerk auf die Suche nach dem inhibierenden Faktor gerichtet. Exosomen, also Mikrovesikel, die von Tumorzellen sezerniert werden, sind in den vergangenen Jahren zunehmend als immun-supprimierende Komponente in den Fokus der Tumorimmunologie gerückt (Zhang und Grizzle, 2011). Auch diese Möglichkeit sollte überprüft werden. Dazu wurden die 291-TÜ mit einer Ultrazentrifuge zwei Stunden bei 50000 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert, was die Exosomen am Boden sedimentieren lässt und so die Überstände als Exosomen-frei betrachtet werden können. Die hieraus gewonnenen TÜ wurden dann in direktem Vergleich mit nicht zentrifugierten TÜ für die Inkubation

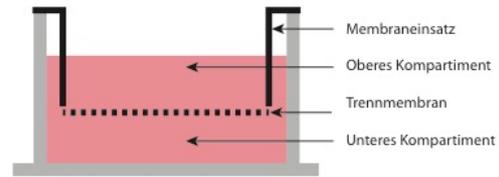


Abb. 6.5 Aufbau eines Well des 96-Loch-HTS-Transwell®-Systems von Corning®: In diesem Doppelkammersystem sind zwei Kammern durch eine Membran von einander getrennt. Die Porengröße der verwendeten Trennmembran beträgt 0,4 µm und ist somit durchlässig für lösliche Stoffe, nicht aber für Zellen.

von WT-NK-Zellen verwendet. Doch auch mit diesem TÜ zeigten die NK-Zellen eine deutlich reduzierte IFN-γ-Produktion (Abb. 6.4). Exosomen ließen sich somit als mögliche Ursache der Inhibition ebenfalls ausschließen.

Kokultur mit c-myc-Zellen ohne Zell-Zell-Kontakt

WT-NK-Zellen zeigten bei der Kokultur

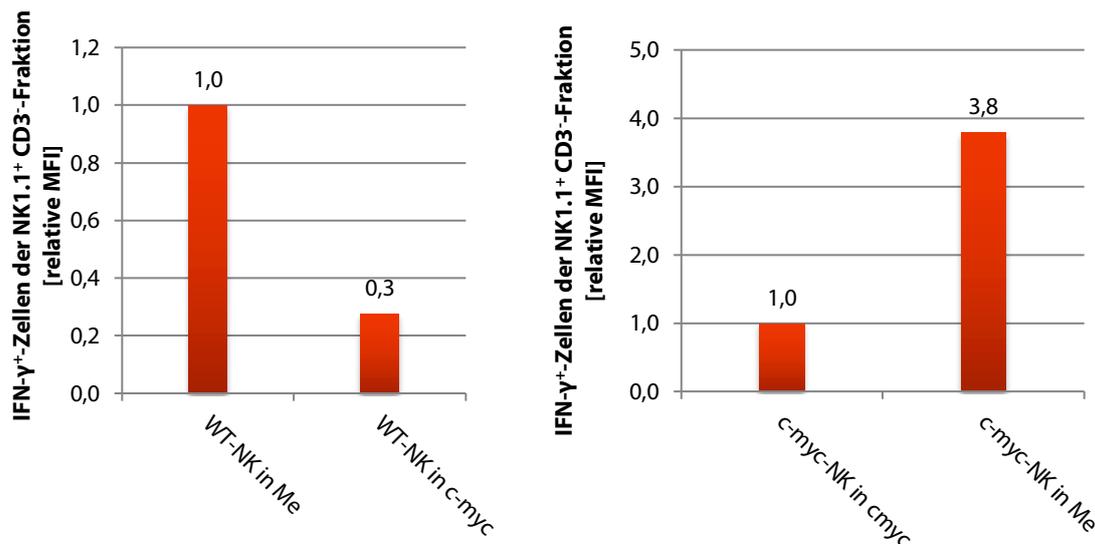


Abb. 6.6 NK-Zellen in der Doppelkammer mit Nicht-NK-Zellen: Je $0,5 \times 10^6$ NK-Zellen wurden *ex vivo* aus einer erkrankten c-myc- bzw. WT-Maus mit 4×10^6 Nicht-NK-Zellen (WT bzw. c-myc) in einer Transwell®-Doppelkammer für 18h kokultiviert. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. WT-NK-Zellen sezernieren deutlich weniger IFN-γ nach Transwell-Kokultur mit c-myc-Zellen. c-myc-NK-Zellen gewinnen ihre Fähigkeit, IFN-γ zu sezernieren, nach Transfer in frisches Medium zurück.

mit *c-myc*-Nicht-NK-Zellen eine deutlich verminderte Effektorfunktion verglichen mit NK-Zellen in Medium oder WT-Nicht-NK-Zellen und das auch ohne Zell-Zell-Kontakt, wie die Versuche in einem Doppelkammersystem (Abb. 6.5.) zeigten – in Übereinstimmung mit der Inhibition in 291-TÜ. Somit scheinen auch hier lösliche Faktoren für die eingeschränkte NK-Zell-Funktion verantwortlich zu sein.

Umgekehrt erholen sich NK-Zellen, welche aus *c-myc*-Tumoren isoliert und mit Medium bzw. WT-Nicht-NK-Zellen inkubiert wurden, und können wieder ausreichend IFN- γ produzieren, im Gegensatz zu denen, die mit *c-myc*-Tumorzellen (“*c-myc*-Nicht-NK-Zellen”) inkubiert wurden (Abb. 6.6).

Auch unveröffentlichte Daten von Johann Pözl wiesen bereits darauf hin, dass NK-Zellen aus *c-myc*-Lymphomen sich regenerieren können, sobald man sie aus dem Milieu des Tumors entnimmt und sie in das Milieu einer gesunden Maus transferiert. Dies konnte bislang jedoch nur *in vivo* bzw. *in vitro*, aber mit Zell-Zell-Kontakt gezeigt werden.

In diesem Ansatz konnte also erstmals gezeigt werden, dass es lösliche Faktoren von *c-myc*-Tumoren auch ohne Zell-Zell-Kontakt vermögen, WT-NK-Zellen in ihrer Effektorfunktion zu inhibieren, und *c-myc*-

NK-Zellen im Umfeld von WT-Nicht-NK-Zellen bzw. Medium weniger eingeschränkt waren.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Inhibition von NK-Zellen reversibel ist, sobald man die Zellen dem Umfeld eines *c-myc*-Lymphoms entzieht, wurde ein weiterer Versuch zur Regenerierung der NK-Zellen durchgeführt. Dazu wurden WT-NK-Zellen isoliert und 18 Stunden in Medium bzw. 291-TÜ inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer der Zellen in reines Medium für weitere 24 Stunden. Eine IFN- γ -Messung wurde nach 18 und 24 Stunden durchgeführt. In Abb 6.7 lässt sich die Inhibition der NK-Zellen nach 18 Stunden sehr eindrucksvoll erkennen. Nach 24 Stunden Regenerierung in Medium zeigen die NK-Zellen bereits eine annähernd gleich hohe IFN- γ -Produktion wie NK-Zellen, die zuvor in „reinem“ Medium inkubiert wurden.

Diese Fähigkeit zur Regenerierung unterstreicht nochmals die Vermutung, dass es sich um einen löslichen Faktor handelt, dessen Wirkung durch Entfernen umkehrbar ist. Auch diese Erkenntnis ist gut vereinbar mit vorherigen *In-vivo*-Ergebnissen, die eine Regenerationsfähigkeit von *c-myc*-NK-Zellen nach Transfer in eine WT-Maus nahelegten. Hierbei war es bislang jedoch unmöglich, zwischen löslichem und Zellvermitteltem Faktor zu unterscheiden.

Zytokinmilieu von 291-Tumorüberständen

Eine Reihe von Zytokinen ist dafür bekannt, dass sie im Rahmen der Kanzerogenese für ein inhibierendes Zytokinmilieu sorgen. Dabei ist es möglich, dass diese Zytokine von regulatorischen Immunzellen wie Treg, aber auch von Tumorzellen selber

produziert werden. Zu diesen immunsupprimierenden Zytokinen werden unter anderem IL-6, IL-10 und TGF- β gezählt (Zitvogel u.a., 2006; Vesely u.a., 2011).

In einem nächsten Ansatz wurden daher neutralisierende Antikörper gegen IL-6, IL-10 und TGF- β im Voraus in den T \bar{U} gegeben. Diese sollten die Zytokine binden,

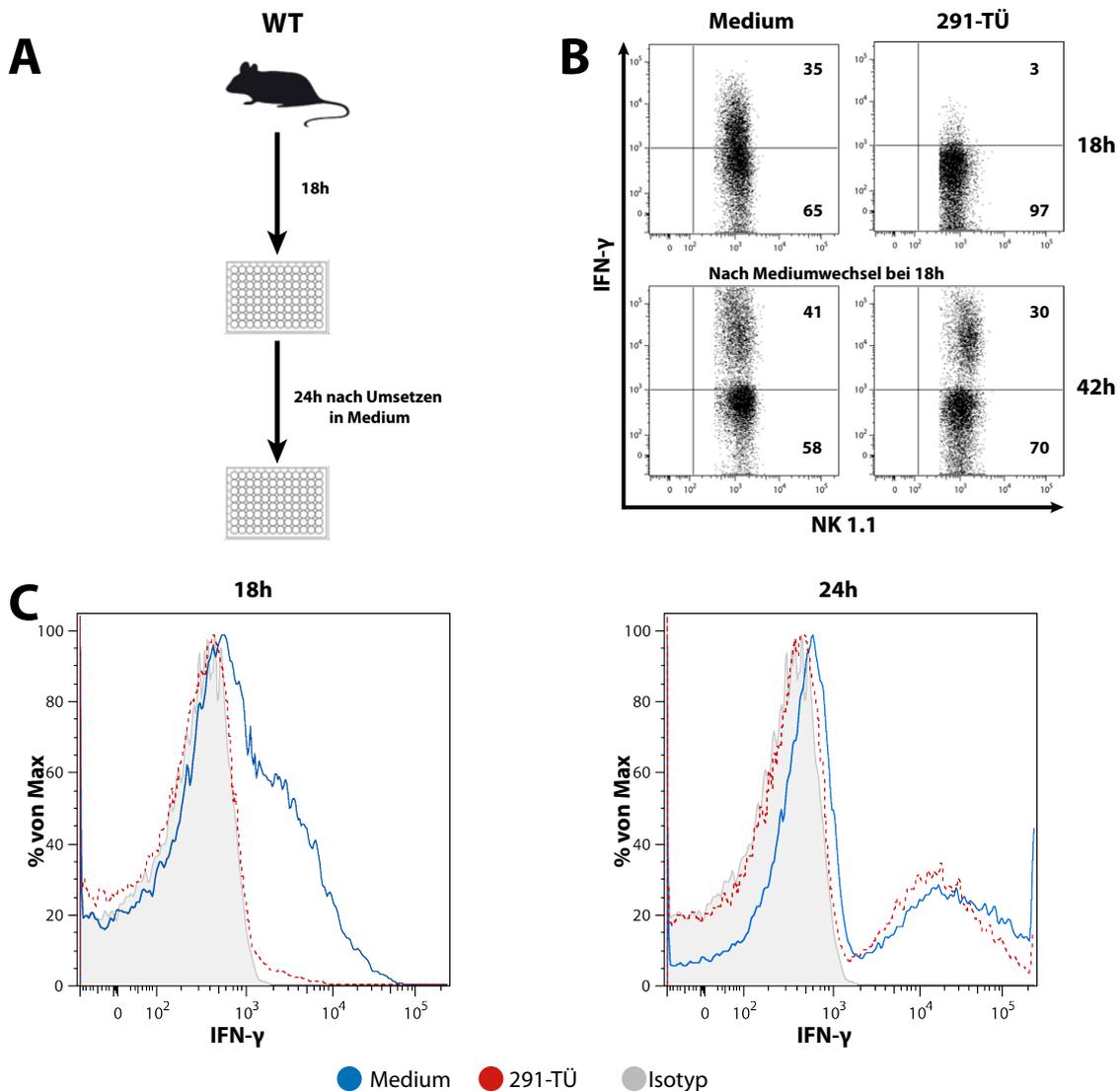


Abb. 6.7 Regenerierung von NK-Zellen nach Inkubation in 291-T \bar{U} *in vitro*: A: Je $0,5 \times 10^6$ WT-NK- wurden nach MACS-Isolierung in 200 μ l 291-T \bar{U} bzw. Medium für 18 h inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen schon nach 18 h stimuliert und durchflusszytometrisch analysiert. Der andere Teil wurde für weitere 24 h in Medium inkubiert und anschließend stimuliert und per FACS analysiert. Wie bei allen Ansätzen wurden hier IL-2 und IL-15 zum Medium bzw. 291-T \bar{U} zugegeben. **B und C:** Die NK-Zellen, welche nach 18 h in 291-T \bar{U} deutlich inhibiert sind, sind bereits 12 h nach Transfer in Medium wieder in der Lage, INF- γ auf ähnlichem Niveau zu produzieren wie nicht inhibierte NK-Zellen. Dargestellt wird ein repräsentatives Ergebnis.

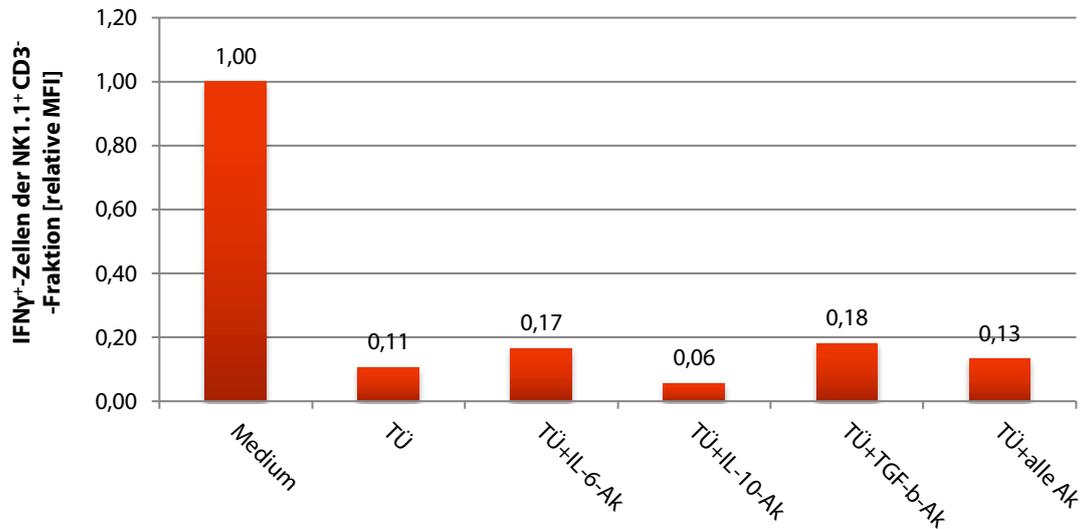


Abb. 6.8 NK-Zellen in 291-TÜ mit IL-6-, IL-10- und TGF- β -Antikörpern: Die neutralisierenden Antikörper wurden in einer Konzentration von 2,0 $\mu\text{g/ml}$ im Voraus in den 291-TÜ gegeben und erst im Anschluss je 1×10^6 NK-Zellen in 200 μl des entsprechenden 291-TÜ resuspendiert, um die Zytokine schon zu Beginn der Inkubation gebunden zu haben. In einem Ansatz wurden alle Antikörper gemeinsam hinzugegeben, um einen kumulativen Effekt nicht zu übersehen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. Nach 18h Inkubation im Brutschrank zeigten die NK-Zellen jedoch eine ähnlich stark eingeschränkte Effektorfunktion wie mit dem unbehandelten 291-TÜ.

sofern sie vorhanden wären, und ihre Wirkung auf NK-Zellen mindern. Doch weder die Ansätze mit den einzelnen Antikörpern noch alle Antikörper gemeinsam vermochten einen positiven Effekt zu erzielen, was klar gegen einen inhibierenden Effekt von eventuell vorhandenen immunsupprimierenden Zytokinen spricht (Abb. 6.8).

Da hieraus jedoch nicht geschlossen werden konnte, dass wirklich keine dieser Zytokine von 291-Zellen exprimiert werden, sollte eine Messung der *messenger*-RNS mittels *real-time-quantitative-PCR* (q-PCR) erfolgen. Zunächst wurde hierfür RNS aus 291-Zellen und WT-Lymphknotenzellen (als Kontrollgruppe zur Berechnung der relativen Expression) isoliert, mittels reverser

Transkriptase komplementäre DNS (cDNS) erzeugt und diese in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Die so gewonnene cDNS wurde anschließend qualitativ (Gelelektrophorese) und quantitativ (q-PCR) mit der Light Cycler-Methode auf IL-6, IL-10 und TGF- β analysiert (zur Methode siehe auch Kap. 5.8). Die Expression wurde auf das Haushaltsgen HPRT normiert. Im Verhältnis zu WT-Lymphknotenzellen zeigten die 291-Zellen keine Über- oder Unterexpression bezüglich der drei Zytokine und so konnte auf transkriptioneller Ebene eine Produktion der untersuchten Zytokine durch Tumorzellen ausgeschlossen werden (Abb. 6.9).

Es sollten im Folgenden mittels ELISA

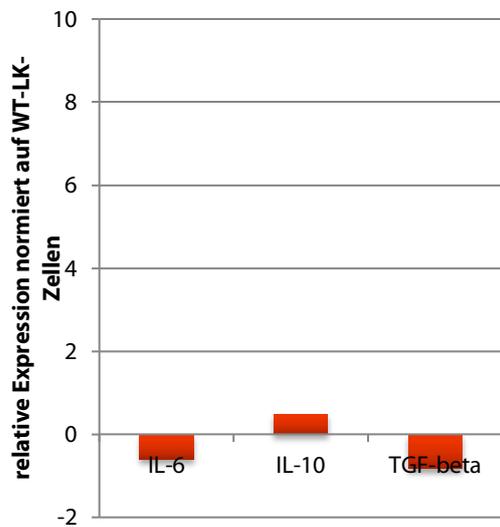


Abb. 6.9 Relative Expression von 291-Zellen zu WT-Lymphknoten: Normiert wurde die Expression auf die Expression des Haushaltsgens HPRT und die Expression in WT-LK-Zellen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. Die 291-Zellen zeigten keine Überexpression der untersuchten Zytokine.

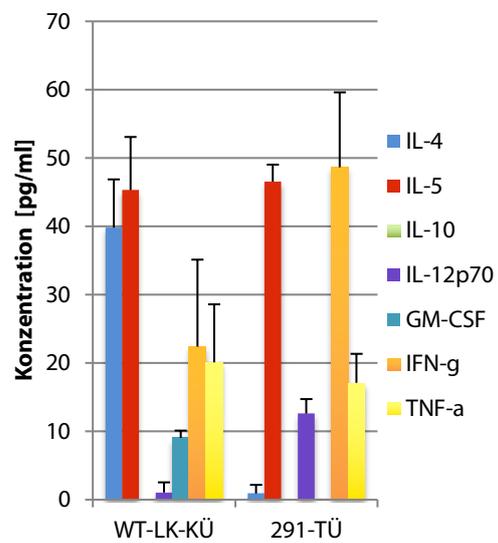


Abb. 6.10 Relative Expression von 291-Zellen zu WT-LK-Zellen: BioPlex™ von Kulturüberständen (KÜ) von CBL-Lymphknoten und 291-Zellen. Durchführung nach Herstellerprotokoll (BioRad). n = 2. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 291- und WT-LK-Zellen gemessen werden.

bzw. mit Hilfe der BioPlex™-Plattform die Zytokinspiegel der 291-TÜ direkt quantitativ gemessen werden. Als Kontrolle dienten äquivalent hergestellte Überstände von WT-Lymphknotenzellen. Die BioPlex™-Untersuchung beinhaltet eine Auswahl an sieben Zytokinen, die für Interaktion und Proliferation von NK-Zellen mit anderen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems entscheidend sind. Die gemessenen

291-TÜ wiesen keine über die Norm erhöhten Konzentrationen – insbesondere von IL-10 – auf (Abb. 6.10). Das Vorhandensein von TGF-β wurde in einem separaten ELISA getestet, doch auch hier zeigten sich keine zur Norm erhöhten Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Dies machte eine inhibierende Wirkung durch Vorhandensein eines supprimierenden Zytokinmilieus unwahrscheinlich.

6.2 Laktat-Stoffwechsel von c-myc-Tumoren

Bei der Entstehung des vorherrschenden Tumormilieus spielt der Stoffwechsel des progressiv wachsenden Tumors eine ausschlaggebende Rolle. Eine Vielzahl von Tumoren bedienen sich der Möglichkeit, sich von der zunehmend kompromittierten Sauerstoffversorgung unabhängig zu machen: sie bedienen sich bereits bei noch ausreichender Sauerstoffversorgung der aeroben Glykolyse, also der Energiegewinnung durch die Verstoffwechslung von Pyruvat zu Laktat – unabhängig von der Atmungskette. Dies verschafft ihnen bei progressivem Tumorwachstum einen entscheidenden Überlebensvorteil gegenüber anderen Zellen. Auch das Protoonkogen MYC ist bekannterweise in die Umstellung auf aerobe Glykolyse involviert (Doherty und Cleveland, 2013).

Bei der aeroben Glykolyse entstehen in den Tumorzellen große Mengen an Laktat, welches zusammen mit Protonen aus der Zelle transportiert wird, einhergehend mit einem Sinken des extrazellulären pH-Wertes. Da dieses Phänomen Einfluss auf die umgebenden Zellen und damit auch auf die infiltrierenden Zellen des Immunsystems nimmt, sollte im weiteren ermittelt werden, ob es im c-myc-Tumormodell eine Rolle spielt.

Hierfür wurden zunächst die standardisiert hergestellten Überstände von WT-Lymphknotenzellen, 291-Zellen und c-myc-Lymphknotenzellen auf ihre Laktat-Konzentration gemessen (Abb. 6.11). Die 291-TÜ enthielten durchweg Laktat-Konzentrationen knapp über 20 mmol/l. Die Messung der c-myc-TÜ ergab teils

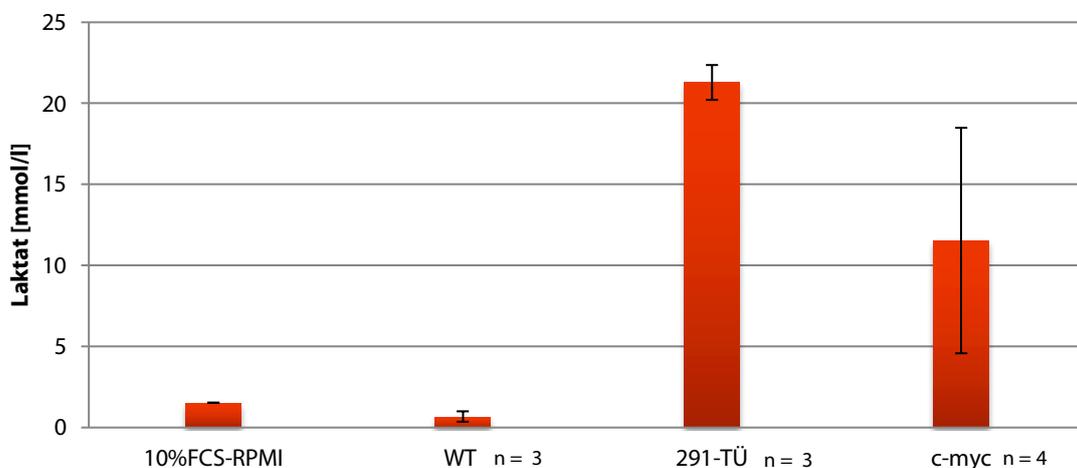


Abb. 6.11 Laktat-Konzentrationen in Tumorüberstand: Überstände von WT-LK-Zellen, 291-Zellen bzw. c-myc-LK-Zellen wurden nach 18h abgenommen. Laktat-Konzentrationen wurden vom Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Großhadern, gemessen. $p = 0,000195$ (WT und 291-TÜ); $p = 0,0665$ (WT und c-myc). 291- und c-myc-TÜ weisen einen signifikant höheren Laktatspiegel auf.

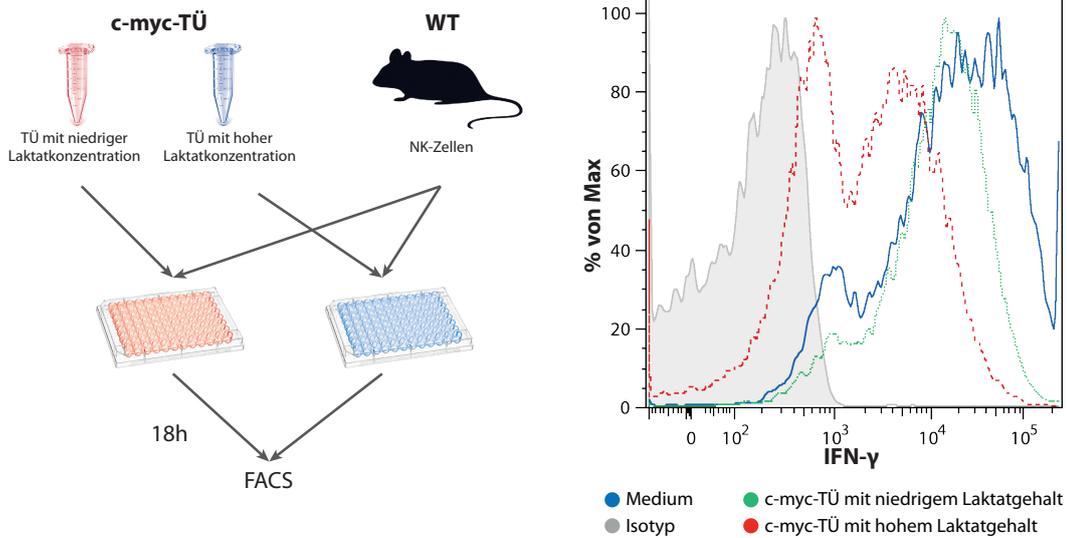


Abb. 6.12 WT-NK-Zellen in c-myc-TÜ mit unterschiedlich hohem Laktatgehalt: $0,5 \times 10^6$ WT-NK-Zellen wurden mit je 200 μ l c-myc-TÜ bzw. Medium für 18h inkubiert. Dabei wurden c-myc-TÜ mit zuvor gemessenen Laktatkonzentrationen verwendet und gezielt jene mit hoher Laktatkonzentration (17 mmol/l) denen mit niedriger (0,05 mmol/l) gegenübergestellt. Das verwendete 10%-FKS-Medium enthielt ca. 1,5 mmol/l Laktat. Der hohe Laktatspiegel in c-myc-TÜ ist für eine eingeschränkte INF- γ -Sekretion verantwortlich.

große Schwankungen, was unter anderem damit zu erklären wäre, dass die Tumoren in unterschiedlichen Entwicklungsstadien erfasst wurden und damit die aerobe Glykolyse unterschiedlich stark ausgeprägt war. Dennoch lässt sich ein Trend zur höheren Laktat-Konzentration bei c-myc-Tumoren erkennen. Zudem wiesen 291-TÜ einen deutlich erniedrigten pH-Wert (6,80-7,00) gegenüber Medium (7,40-7,60) auf.

Es lässt sich festhalten, dass myc-Tumoren auf aerobe Glykolyse zurückgreifen, was folglich zur Anreicherung des extrazellulären Raums mit Laktat führt, einhergehend mit dem Absinken des pH-Wertes.

Es galt nun zu prüfen, ob hohe Laktatkonzentrationen in c-myc-Überständen mit der Inhibition der NK-Zellen korrelieren. Dazu wurden WT-NK-Zellen in c-myc-TÜ mit hohem Laktatgehalt (17mmol/l) 18 Stunden

bzw. niedrigem Laktatgehalt (0,05 mmol/l) inkubiert. NK-Zellen in TÜ mit hohem Laktatgehalt zeigten dabei eine stärkere Einschränkung der IFN- γ -Produktion als solche in TÜ mit niedrigem Laktatgehalt. Zudem wiesen auch NK-Zellen in c-myc-TÜ mit niedriger Laktat-Konzentration bereits eine verminderte Effektorfunktion auf, was auf eine zusätzliche Komponente der NK-Zell-Inhibition hinweist (Abb. 6.12). Dennoch ließ dieser Ansatz den Zusammenhang zwischen Laktatgehalt in c-myc-TÜ und der NK-Zell-Funktion annehmen und diente als weitere Grundlage für folgende Untersuchungen.

Einfluss von pH-Wert und Laktat auf die INF- γ -Produktion von NK-Zellen

Um den direkten Einfluss von Laktat bzw. des induzierten pH-Wertes nachzuweisen,

war es erforderlich, die einzelnen Parameter gezielt und separat zu manipulieren.

Durch Zugabe der entsprechenden Menge von Natriumlaktat (Na-Laktat) zu Medium sollte die Laktatkonzentration auf einen Wert angehoben werden, der dem in 291- und c-myc-Tumorüberständen in etwa entspricht (20 mM). Das Hinzufügen von Natriumlaktat bewirkt allerdings einen Anstieg des pH-Wertes, welcher durch Titration mit Salzsäure (HCl) wiederum auf den Wert gewöhnlichen Mediums (7,40 - 7,60) abgesenkt werden muss. Der Einfluss des pH-Wertes allein wurde separat analysiert. Hierzu wurde das Medium durch Hinzugabe von HCl unter ständiger Messkontrolle auf pH-Werte von 291-TÜ einge-

stellt. Weiterhin wurde zu 291-TÜ Natronlauge (NaOH) gegeben, um den pH-Wert auf den von unbehandeltem Medium anzuheben (Abb. 6.13). Nach Herstellung der unterschiedlichen Medien bzw. Tumorüberstände wurden nun WT-NK-Zellen darin inkubiert und anschließend zur IFN- γ -Produktion stimuliert. Da die pH-Werte nach Lagerung nicht dauerhaft stabil waren, erschien es wichtig, den pH möglichst kurz vor Inkubation mit Hilfe der pH-Elektrode zu kontrollieren und gegebenenfalls anzupassen.

Das reine Absenken des pH auf 7,06 bewirkt bereits eine eindrucksvolle Absenkung der NK-Zell-Funktion, wohingegen die Zugabe von Na-Laktat NK-Zellen deutlich geringer einschränkt. Das Anheben des pH-Wertes von 291-TÜ auf Werte des Mediums hatte keinerlei positive Effekte auf die Effektorfunktion. Die Zugabe von Milchsäure, also ein Laktat-Molekül mit je einem Proton, kommt der realen Situation nahe, da der Transport von Laktat aus Tumorzellen heraus je ein Proton über den Monocarboxylat-Transporter (MCT) erfordert. Auch die Messung des pH-Wertes nach Zugabe von 20 mM Milchsäure entsprach den Werten von 291-TÜ. Die Inkubation mit 20 mM Milchsäure bewirkte eine vergleichbar starke Inhibition der NK-Zellen wie in 291-TÜ (Abb. 6.14).

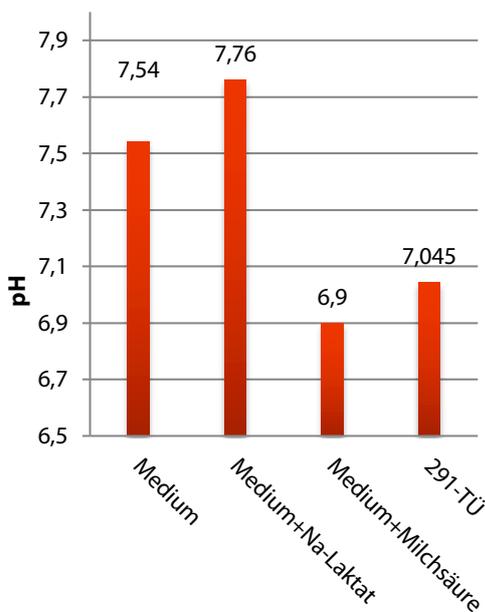


Abb. 6.13 pH-Werte von Medium bzw. 291-TÜ: Es wurden 20mM Na-Laktat bzw. Milchsäure zum Medium hinzugegeben. Es zeigten sich deutlich niedrigere pH-Werte in Medium mit Milchsäure und in 291-TÜ. Die Säulen zeigen Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten.

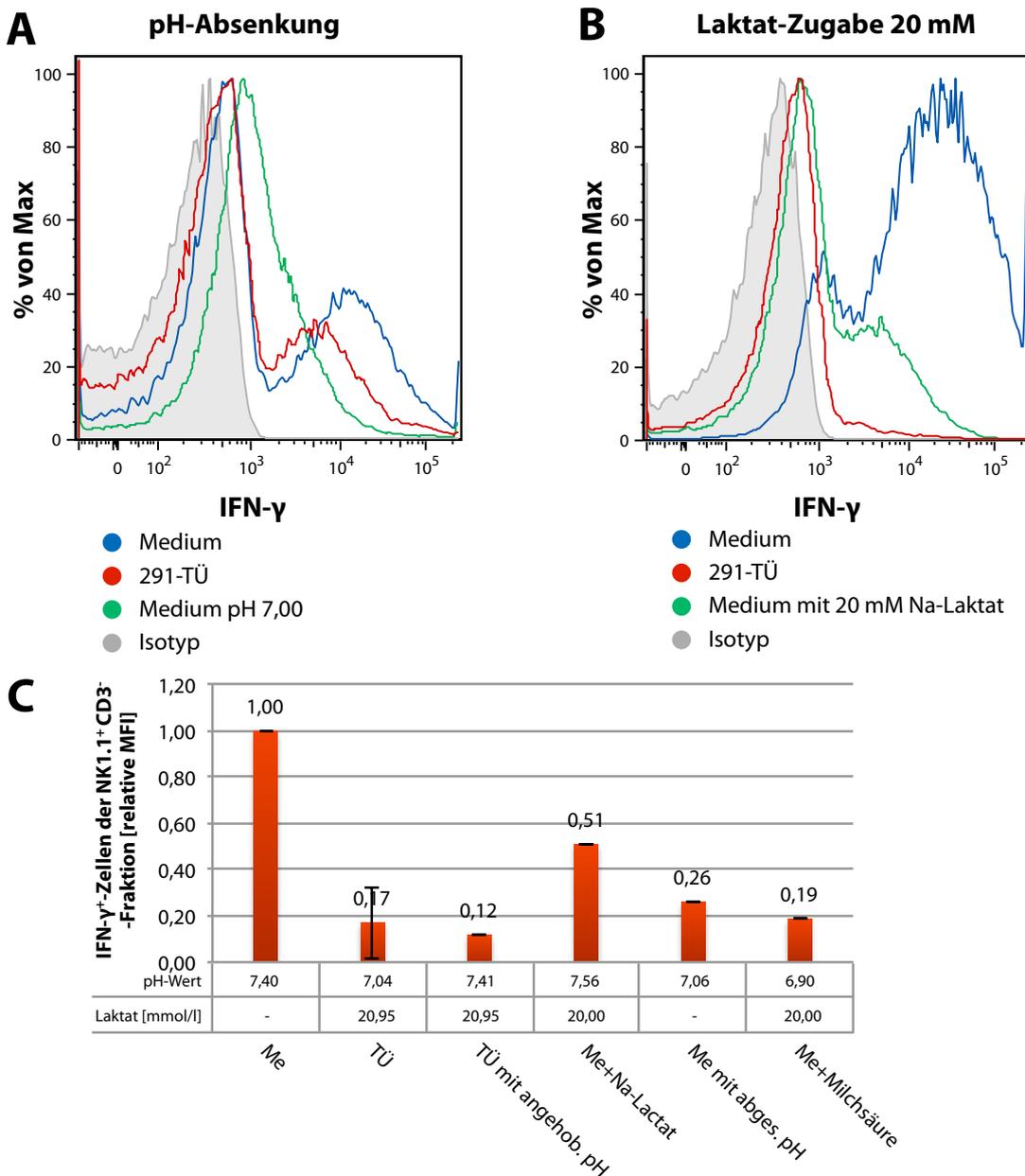


Abb. 6.14 Einfluss des pH-Wertes bzw. der Laktat-Konzentration auf die IFN- γ -Freisetzung: Der pH-Wert der Medien wurde mit HCl bzw. NaOH unter ständiger Kontrolle mit Hilfe einer pH-Elektrode auf den erwünschten Wert eingestellt. Bei Zugabe von Milchsäure wurde der (gewünschte) pH-Abfall toleriert, bei Zugabe von Na-Laktat erfolgte die Titration des pH-Werts auf physiologische Werte. $0,5 \times 10^6$ WT-NK-Zellen wurden nach MACS-Isolierung in den jeweiligen Medien bzw. Tumorüberständen für 18h inkubiert. **A:** Die Absenkung des pH-Werts allein genügt, um die NK-Zellfunktion einzuschränken **B:** Auch die Zugabe des Laktats alleine schränken die IFN- γ -Freisetzung ein – obgleich geringer als bei Absenken des pH-Wertes. **C:** Übersicht der überprüften Konstellationen. In TÜ reicht hingegen eine Anhebung des pH-Werts nicht aus, um die Funktion der NK-Zellen wiederherzustellen. Die Säulen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 bis 5 unabhängigen Experimenten.

Laktat und Protonen scheinen also einen kumulativen Effekt auf die sekretorische NK-Zell-Funktion zu haben, wobei Protonen den größeren Teil des Effekts übernehmen. Das Anheben des pH alleine reichte

nicht, die Inhibition aufzuheben. Das in den Tumorüberständen verbleibende Laktat, welches sich nicht eliminieren ließ, trug hier vermutlich mitunter zu der weiterhin bestehenden Inhibition bei.

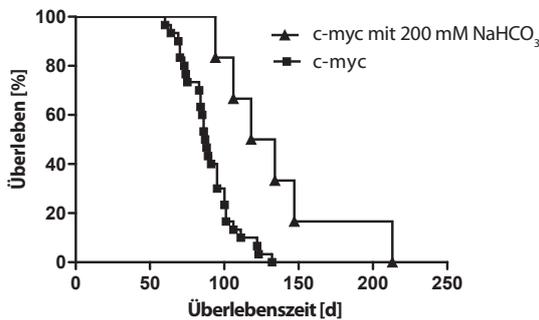


Abb. 6.15 Überleben von c-myc-Mäusen: 6 c-myc-Mäuse wurden ca. ab dem 40. Lebenstag mit 200 mM NaHCO₃ versetztem Trinkwasser getränkt. Als Kontrolle wurden normal getränkte c-myc-Mäuse verwendet (n = 30). Es zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil der mit Natriumbikarbonat getränkten Mäuse. Log-rank Test p=0,0021

Da der Zusammenhang zwischen der Laktatproduktion, einhergehend mit dem Absinken des pH-Wertes, und der Inhibition der NK-Zellen hergestellt war, stellte sich schließlich die Frage, wie sich dieses Milieu *in vivo* beeinflussen ließe. Insbesondere zur Manipulation des pH-Wertes zeigt die Literatur die Möglichkeit auf, durch Fütterung der Mäuse mit Natriumbikarbonat (NaHCO₃), den pH-Wert in Tumorgewebe solider Tumore anzuheben. Dabei wirkt NaHCO₃ als physiologischer Puffer gezielt an dem Ort, wo sich der pH-Wert außerhalb des physiologischen Bereichs (7,35-

7,45) befindet, ohne den systemischen pH-Wert bzw. den Säure-Base-Haushalt der Mäuse zu beeinflussen. Mögliche Nebenwirkungen wie metabolische Alkalose oder Gewichtsabnahme konnten dabei ausgeschlossen werden (Robey u.a., 2009).

Ziel war es nun, zu untersuchen, ob die Beimengung von NaHCO₃ einen positiven Effekt auf das Überleben der Mäuse bzw. der NK-Zellfunktion hat. Dazu wurde NaHCO₃ den c-myc-Mäusen im Trinkwasser mit einer Konzentration von 200 mM ab ca. dem 40. Lebenstag zugeführt. Kontrollen ergaben keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere.

Die Analyse der Überlebensdauer zeigte, dass die Tränkung mit 200 mmol/l NaHCO₃ den c-myc-Mäusen einen signifikanten Überlebensvorteil einbrachte (p=0,0021). Während normal getränkte Mäuse durchschnittlich 87,5 Tage überlebten, lag der Überlebensdurchschnitt bei den mit NaHCO₃ getränkten Mäusen bei 126,0 Tagen, wobei eine Maus sogar 213 Tage überlebte (Abb. 6.15).

6.3 Zytotoxizität von NK-Zellen nach Kokultur mit 291-Zellen

Da die Zytotoxizität durch NK-Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Abwehr von soliden Tumoren leistet, war es notwendig, einen möglichen Einfluss von löslichen Faktoren der Tumorzellen auf diese zweite NK-Zell-Hauptfunktion zu untersuchen. Auch hierzu sollten zunächst WT-NK-Zellen in 291-Tumorüberstand (291-TÜ) inkubiert werden und anschließend die Zytotoxizität gegenüber der murinen Lym-

phomzelllinie YAC-1-Zellen mittels Chrom-Freisetzungstest überprüft werden (Kiessling u.a., 1975). Die frisch isolierten WT-NK-Zellen wurden dazu 18 Stunden in 291-TÜ inkubiert. Auch hier war es – wie bei den IFN- γ -Messungen – notwendig, IL-2 (30 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) zum Medium bzw. TÜ zuzugeben, um die Zytotoxizität zu verstärken. Anschließend wurden YAC-Zellen als Zielzellen des Chrom-

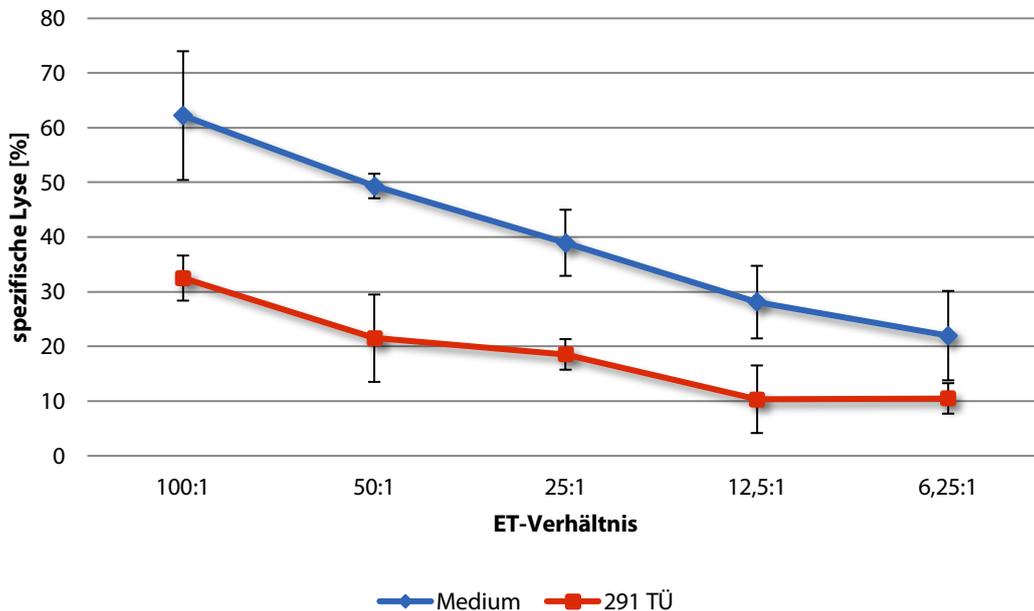


Abb. 6.16 Kokultur von NK-Zellen in 219-Tumorüberstand: Je 1×10^6 WT-NK-Zellen wurden 18 h in 200 μ l 10%-RPMI bzw. 291-TÜ im BS inkubiert. Am folgenden Tag wurden zunächst 3×10^6 YAC-1-Zellen in 200 μ l FKS zzgl. der entsprechenden Menge der Natrium-Chromat-Lösung über 90 min im BS inkubiert. Im Anschluss wurden die NK-Zellen (Effektoren) nach Auszählung in entsprechendem Verhältnis mit den YAC-Zellen (Zielzellen) in Medium gegeben und 4h kokultiviert. Um etwaige Schwankungen zu minimieren, wurden die Proben stets doppelt angelegt. Für die unspezifische Freisetzung wurden Ansätze nur mit YAC-1-Zellen angelegt, für die Maximalwerte sollten die YAC-1-Zellen selbst gemessen werden. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Überstandes bzw. der Zielzellen (für Maximalwerte) und die Ausplattierung auf eine LumaPlate™-96 und Antrocknung über Nacht. Am folgenden Tag erfolgte die Messung im γ -Szintillationszähler. Die Ergebnisse stammen aus 3 Einzelversuchen. Bei jedem Einzelversuch wurden für Medium und 291-TÜ stets Triplikate angelegt.

Freisetzungstests aus der Zellkultur vorbereitet und mit den NK-Zellen der einzelnen Proben 4 Stunden kokultiviert. Die Messungen im γ -Szintillationszähler zeigen eine deutliche Inhibition der Zytotoxizität der NK-Zellen nach 18 Stunden Inkubation in 291-TÜ in allen Effektor-Zielzell-Verhältnissen (ET-Verhältnis). Lösliche Faktoren in 291-TÜ scheinen somit auch auf diese NK-Zellen-Funktion Einfluss zu nehmen. Es reichte ebenfalls bereits eine Inkubation von 18 Stunden aus, um einen Effekt zu erzielen (Abb. 6.16).

Es war nun von Interesse, Unterschiede zwischen der Inhibition beider Funktion

herauszuarbeiten, die auf unterschiedliche mögliche Ursachen hinweisen könnten.

Im einem weiteren Schritt wurde daher die Fähigkeit zur Regenerationsfähigkeit nach einer Inhibition analysiert. Es wurden WT-NK-Zellen in 291-TÜ für 18 Stunden inkubiert, um sie im Anschluss in normales Medium umzusetzen und ihnen somit die Möglichkeit zu geben, sich innerhalb von 24 Stunden (also nach 42 Stunden im Brutschrank) zu regenerieren.

Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die NK-Zellen, die nach 18 Stunden in 291-TÜ stark inhibiert waren, sich nach Umsetzen in Medium nicht erholen konnten, sondern weiterhin auf ähnlichem Niveau stark inhi-

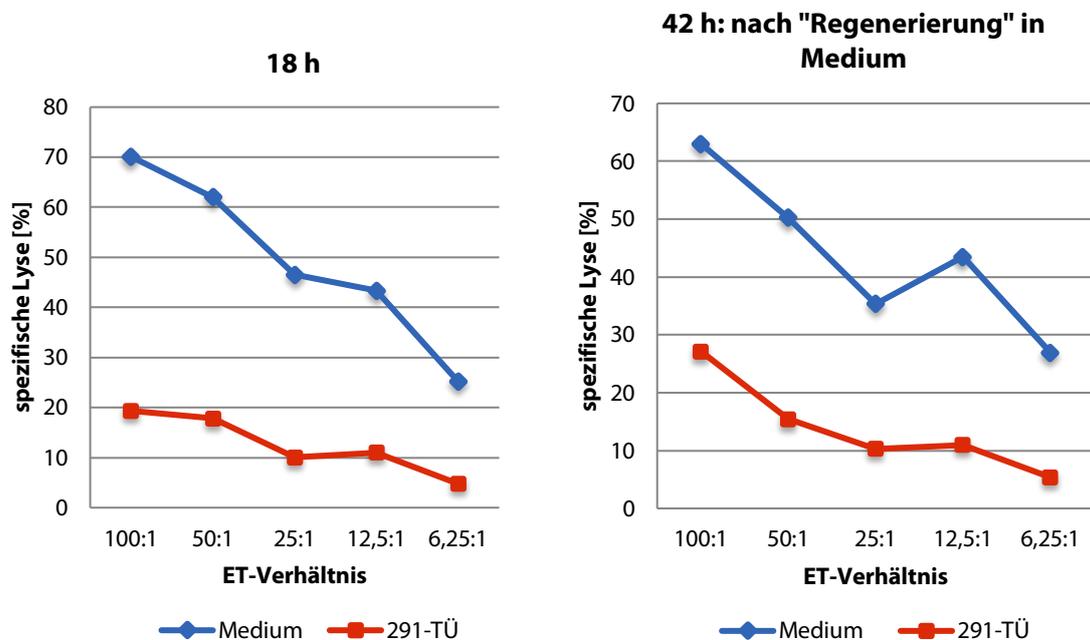


Abb. 6.17 Zytotoxizität nach Kokultur in 291-Tumorüberstand: Je 1×10^6 WT-NK-Zellen wurden 18 h in $200 \mu\text{l}$ 10%-RPMI bzw. 291-TÜ im BS inkubiert. Ein Teil der Ansätze wurde schon nach 18 Stunden ein Chrom-Freisetzungstest durchgeführt. Der andere Teil der NK-Zellen wurde gewaschen und in frisches Medium umgesetzt. Nach 24 Stunden Passagezeit im Brutschrank erfolgte der Chrom-Freisetzungstest mit diesen Zellen. Es wurden für Medium und 291-TÜ stets Duplikate angelegt. Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate.

biert waren (Abb. 6.17). Dies stellt einen klaren Gegensatz zur Regegenerationsfähigkeit von NK-Zellen bezüglich der IFN- γ -Produktion dar (Abb. 6.10).

Da jedoch auch bei der Zytotoxizität lösliche Faktoren für die Inhibition mitverantwortlich sein müssen, sollte untersucht werden, ob auch hier pH-Wert oder Laktatkonzentration als Zeichen einer aeroben Glykolyse der Tumorzellen die Zytotoxizität beeinflussen. Durch Zugabe von Salzsäure wurden der pH-Wert normalen Mediums auf den von 291-TÜ (etwa pH 7,00) unter

Messkontrolle abgesenkt oder Natriumbikarbonat bis zu einer Konzentration von 22 mM hinzugegeben. Nach 18 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Zytotoxizität gemessen, allerdings wurde hier kein signifikanter Effekt ersichtlich (Daten nicht gezeigt) und auch bei der Zugabe von Salzsäure und Laktat in einem Ansatz war allemal eine leichte Inhibition im Vergleich zum Medium zu erkennen (Abb. 6.18).

Die fehlende Regegenerationsfähigkeit der NK-Zellen und der ausbleibende Effekt von pH-Wert und Natriumbikarbonat stellen

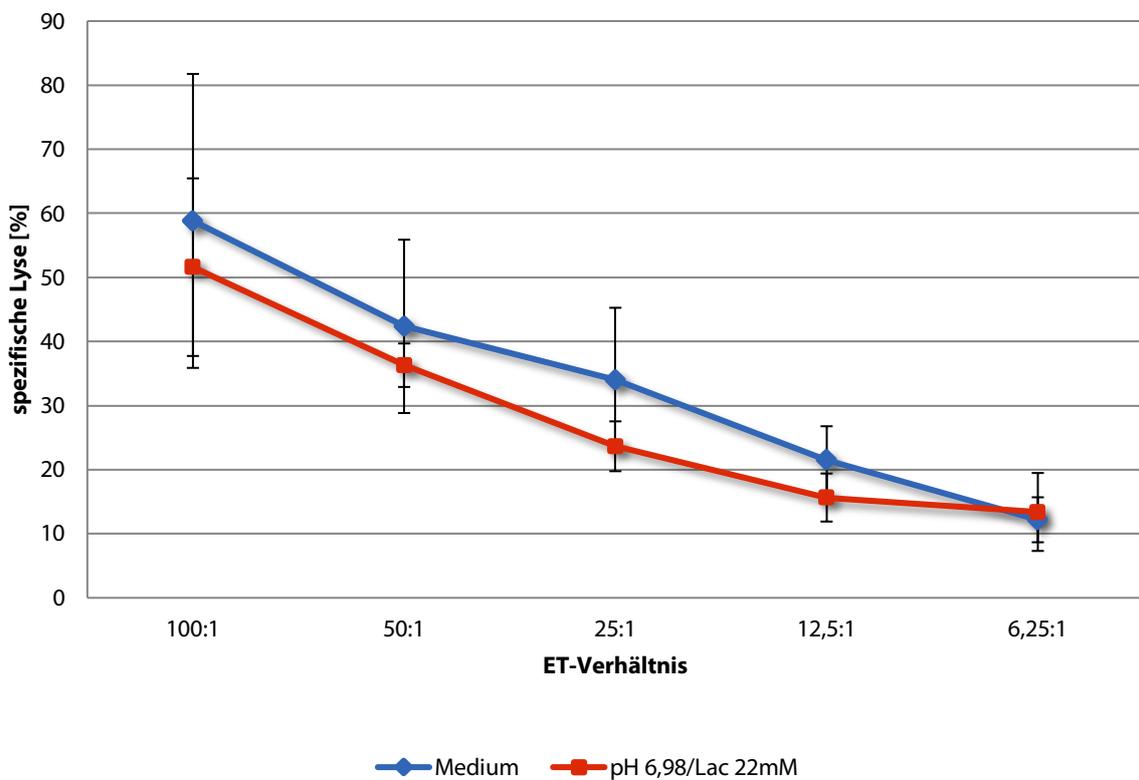


Abb. 6.18 Kokultur von NK-Zellen in Medium mit abgesenktem pH (6,98) und hohem Laktat (22mM): 1×10^6 WT-NK-Zellen wurden 18h in 200 μ l Medium bzw. Medium mit artifiziiell abgesenkten pH-Wert auf 6,98 und Zugabe von 22 mM Natrium-Laktat im Brutschrank inkubiert. Die pH-Werte wurden regelmäßig mittels pH-Messelektrode kontrolliert. Nach 18h erfolgte der Chrom-Freisetzungstest gegen YAC-Zellen. Die Daten stammen aus zwei Einzelversuchen. Bei jedem Einzelversuch wurden für Medium bzw. pH 6,98/Lac 22mM stets Triplikate angelegt.

einen deutlichen Unterschied zu den bei der IFN- γ -Produktion erfassten Mechanismen dar, was einen weiteren nicht identifizierten ursächlichen Faktor für die Inhibition nahelegt.

Dass jedoch beide Hauptfunktionen der NK-Zellen durch lösliche Faktoren der 291-Lymphome eingeschränkt werden, machen die hier gezeigten Untersuchungen sehr wahrscheinlich.

6.4 NK-Zell-Einwanderung in 291-Tumoren

Ein weiterer Baustein dieser Arbeit war in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Peter Nelson (Klinische Chemie, LMU München) der Versuch, NK-Zell-Einwanderung in Tumorgewebe zu charakterisieren und zu verbessern. Hierzu wurde ein Protein entwickelt, welches den Kopf des Chemokins CXCL10 und den Mucin-ähnlichen Stiel von CX3CL1 vereint. Hierdurch wurde das Protein spezifisch für CXCL10-Rezeptoren wie CXCR3. Die Integration eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) in die transmembrane Seite des CX3CL1-Stiels ermöglichte die Einbindung in Zellmembranen (Muenchmeier u.a., 2013). CXCL10 gilt als äußerst potentes Chemokin, um NK-Zellen gezielt CXCR3-vermittelt zu rekrutieren, und ist wie auch die CXCR3-Expression auf NK-Zellen Bedingung für die Einwanderung in Tumorgewebe (Wendel u.a., 2008). Nach ausgiebiger Erprobung der Effizienz der Integration des GPI-Ankers in Zellmembranen und der gezielten Rekrutierung von NK-Zellen über CXCL10-CXCR3-Interaktion in der Laminaflusskammer *in vitro* sollte das Protein *in vivo* auf seine Fähigkeit getestet werden, NK-Zellen zu rekrutieren.

291-B-Zell-Lymphomzellen wurden hierfür

in gesunde C57BL/6-Mäuse implantiert und die NK-Zell-Einwanderung nach intratumoraler CXCL10-Mucin-GPI-Injektion in ausgewachsene Tumoren durchflusszytometrisch und histologisch untersucht.

Im Vorfeld konnte eine CXCR3-Expression der 291-Lymphomzellen sowohl in der FACS-Analyse als auch in der RT-PCR ausgeschlossen werden. Dies war entscheidend, um einen möglichst großen Unterschied zwischen injiziertem Protein und der unbehandelten Kontrolle sichtbar zu machen.

Die unbehandelten Tumoren wiesen überwiegend eine ausgeprägte Vaskularisation mit nur vereinzelt Nekrosen auf (Abb.

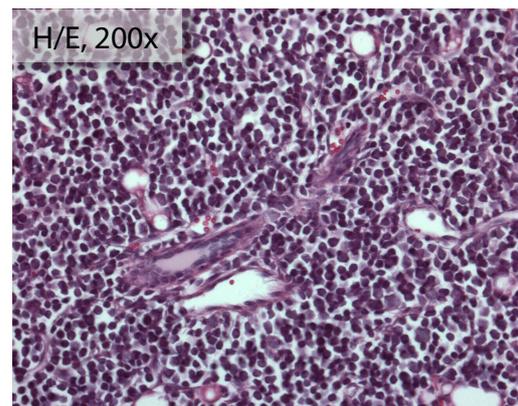


Abb. 6.19 Vaskularisation von transplantierten 291-Tumoren in der Maus: Für das Setzen der Tumoren wurden 10^7 291-Zellen in 150 μ l PBS in beide Flanken einer C57BL/6-Maus injiziert. Nach ca. 10-14 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Tumoren für histologische Analysen entnommen. Die gute Vaskularisation in 291-Tumoren ist deutlich zu sehen. Nekrosen waren daher selten. Peripher waren vereinzelt hämorrhagische Areale zu sehen. (H/E-Färbung, N. Münchmeier).

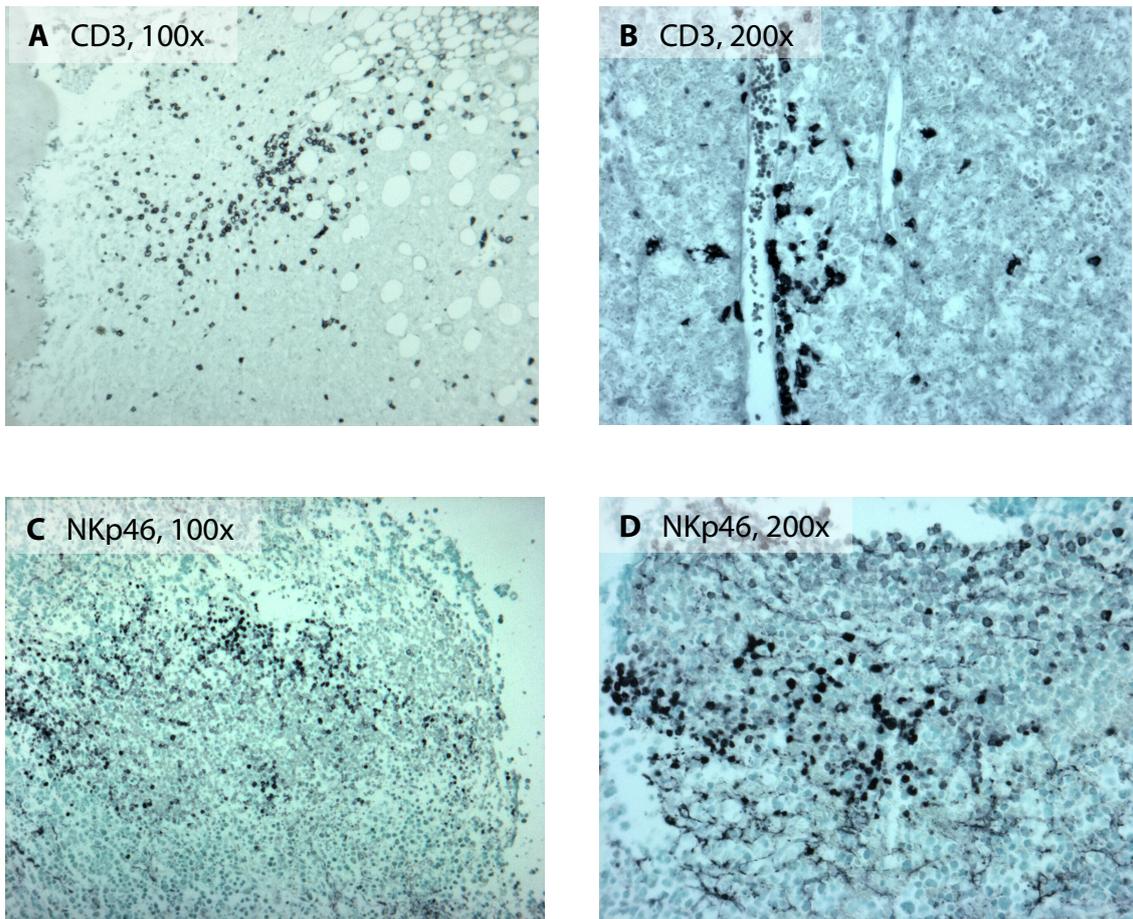


Abb. 6.20 NK-Zell-Infiltration in 291-Tumoren: A+B: Insgesamt verbreitete CD3⁺-Zelleinwanderung in den gesamten Tumor mit relativ hoher Zellzahl verglichen zu NKp46⁺-Zellen. Ansammlungen von CD3⁺-Zellen v.a. perivaskulär (B) und vermehrt in großen, gut durchbluteten Tumoren. In Gebieten mit hoher CD3⁺-Zell-Präsenz waren in der Regel kaum NKp46⁺-Zellen anzutreffen. **C+D:** Deutlich weniger NKp46⁺-Zellen als CD3⁺-Zellen; NKp46⁺-Zellen vorwiegend im peripheren Teil des Tumors; häufig in hämorrhagischen Arealen; hier eher vereinzelt CD3⁺-Zellen. IHC-Färbung mit CD3- bzw. NKp46-Antikörpern, N. Münchmeier.

6.19). Die starke Vaskularisation stellte eine gute Voraussetzung für die mögliche Rekrutierung von Immunzellen dar. Je größer die Tumoren gewachsen waren, desto mehr CD3⁺- und NKp46⁺-Zellen infiltrierten das Tumorgewebe, weshalb für weitere Versuche möglichst Tumoren in frühen Entwicklungsstadien verwendet wurden, um zu Versuchsbeginn möglichst Tumoren mit geringem Zell-Infiltrat vorzufinden. CD3⁺-Zell-Infiltrate waren im gesamten

Tumorgewebe weit verbreitet, vor allem perivaskulär in gut durchbluteten Arealen. NKp46⁺-Zellen waren insgesamt deutlich rarer und unregelmäßiger verteilt als CD3⁺-Zellen und vorwiegend in peripherem Tumorgewebe, teils in hämorrhagischen Arealen in Gruppen vorhanden. Auffallend war, dass in Gebieten mit hoher CD3⁺-Zell-Präsenz eher wenige NKp46⁺-Zellen vorzufinden und umgekehrt in Clustern von NKp46⁺-Zellen deutlich weniger CD3⁺-

Zellen anzutreffen waren (Daten von Münchmeier; Abb. 6.20).

Um das Protein auf seine Rekrutierungsfähigkeit *in vivo* zu testen, wurden jeweils 10^7 291-Zellen subkutan in beide Flanken der Mäuse gespritzt.

Um eine mögliche Beeinflussung des Versuchs durch die Größe des Tumors zu minimieren, wurden vor der Injektion in allen Versuchsgruppen Tumoren mit unterschiedlichen Größen aufgenommen (8 mm x 6 mm bis 16 mm x 14 mm).

Das gereinigte CXCL10-mucin-GPI und als Kontrolle das rekombinant humane CXCL10 (rhCXCL10) bzw. sEGFP-GPI wurden in 50 µl Volumen in je drei Tumoren injiziert. Das rhCXCL10 wurde dabei in der dem CXCL10-mucin-GPI entsprechenden Menge (2 ng) und einer 500-fach höheren Menge (1 µg) gespritzt, um Effekte in höheren Konzentrationen nicht zu übersehen. Die Herstellung von größeren Mengen CXCL10-mucin-GPI war zu diesem Zeitpunkt aus technischen Gründen nicht realisierbar.

Vier Stunden nach Injektion wurden die Mäuse geopfert und die Tumoren aus den Flanken präpariert. Eine Hälfte des Tumors wurde für die histologische Analyse direkt in Formaldehyd eingelegt, die andere Hälfte wurde mit einem 40 µm Zellsieb gefiltert und die suspendierten Zellen für die FACS-

Messung weiterverarbeitet.

Abb. 6.21 zeigt die Fraktion in Prozent der NK-Zellen (NK1.1⁺CD3⁺Zellen) innerhalb der Lymphozytenpopulation. Das CXCL10-mucin-GPI wies hierbei die höchste Fraktion (0,34 %) und den höchsten Einzelwert (0,55 %) auf. Das rhCXCL10 zeigte in derselben Konzentration (2 ng) eine geringere NK-Zell-Einwanderung (0,16 %) und

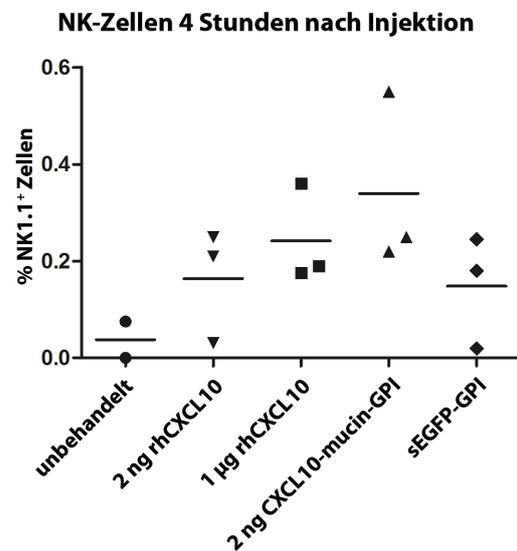


Abb. 6.21 NK-Zell-Infiltration in 291-Tumoren 4h nach Injektion: Nach Auswachsen der gesetzten Tumoren wurde 2 ng gereinigtes CXCL10-mucin-GPI in die Tumoren injiziert. Als Kontrolle dienten 2 ng bzw. 1 µg recombinant humanes CXCL10 (rhCXCL10), sowie dieselbe Menge ebenfalls gereinigtes sEGFP-GPI. 2 weitere Tumoren wurden unbehandelt belassen. 4 h nach Injektion wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entnommen. Die eine Hälfte eines jeden Tumors unterlief durchflusszytometrische Messungen, die andere wurde zur histologischen Beurteilung mit Hämatoxylin/Eosin (H/E) und immunhistochemisch gefärbt (CD3 und NKp 46). Die Graphik zeigt den Prozentsatz der NK1.1⁺CD3⁺Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation abzüglich der ungefärbten Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert die Messung eines Tumors, die Linie den Gruppenniveau.

auch in der 500-fach höheren Konzentration von 1 µg wurden nicht die Werte des CXCL10-mucin-GPI erreicht (0,24 %).

Auch wenn sich aufgrund der niedrigen Fallzahlen keine Signifikanz nachweisen

ließ, so ließ sich dennoch ein positiver Effekt *in vivo* sichtbar machen, was für die Verbesserung der NK-Zelleinwanderung spricht.

7 Diskussion

7.1 Laktat in der Schlüsselposition des Tumormilieus

Maligne Tumoren des Menschen sind allgemein gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit, dem Zelltod und supprimierenden Faktoren zu widerstehen, Angiogenese zu induzieren und Invasion und Metastasierung voranzutreiben (Douglas und Robert, 2011). Überdies spielt die Selektion der malignen Zellpopulation durch verschiedene Überlebensvorteile eine entscheidende Rolle. Diese Selektion impliziert, dass Charakteristika des malignen Phänotyps zu einem signifikanten Wachstumsvorteil führen und durch die Entstehung des Tumormilieus sogar ein toxisches Umfeld für den anderen Phänotyp generieren. Zu diesen Charakteristika wird auch die Glykolyse gezählt. Die zunehmende Tumorexpansion kompromittiert die adäquate Vaskularisierung und damit Oxygenierung des Gewebes. Die anaerobe Glykolyse ermöglicht auch in hypoxischen Stoffwechsellagen den Tumorzellen ausreichend Energie zur Verfügung zu stellen.

Die Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks und des interstitiellen pH-Werts korreliert dabei mit zunehmender Distanz zum versorgenden Blutgefäß und legt eine Verschie-

bung der Stoffwechsellage hin zur anaeroben Glykolyse nahe (Gabriel u.a., 1997).

Physiologischerweise wird Glukose mittels Transporter (v.a. GLUT-1 und -4) in die Zelle transportiert und dort über einen mehrschrittigen enzymatischen Prozess, die Glykolyse, in Pyruvat verwandelt. Hierbei entstehen 2 Adenosintriphosphat (ATP). Unter normoxischen Bedingungen wird hieraus nach Durchlauf des Citratzyklus unter Sauerstoffverbrauch in den Mitochondrien der Großteil der Energie (36 ATP) generiert, bekannt als oxidative Phosphorylierung.

Unter hypoxischen Umständen kann Pyruvat nicht über die oxidative Phosphorylierung abgebaut werden. So wird überschüssiges Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert und mittels des Protonen-gekoppelten Monocarboxylat-Transporters (MCT) aus der Zelle geschafft. Dies wird als anaerobe Glykolyse bezeichnet.

Hier entsteht im Gegensatz zur oxidativen Phosphorylierung jedoch mit 2 ATP deutlich weniger Energie als bei oxidativer Phosphorylierung (Sitkovsky und Lukashev,

2005).

Einige Tumoren haben die Fähigkeit entwickelt, Glykolyse auch im Umfeld mit noch ausreichender Sauerstoffversorgung zu betreiben, was als aerobe Glykolyse bezeichnet wird. Otto Warburg hatte dieses Phänomen schon 1927 beschrieben, weshalb es auch als Warburg-Effekt bekannt ist (Warburg u.a.,

tomographie (^{18}F FDG-PET) wieder aufgegriffen, welche in der Lage ist, den hohen Glukoseverbrauch von Tumoren bildlich darzustellen. So können heutzutage viele Tumoren und deren Metastasierung mit sehr hoher Spezifität und Sensibilität diagnostiziert werden (Czernin und Phelps, 2002).

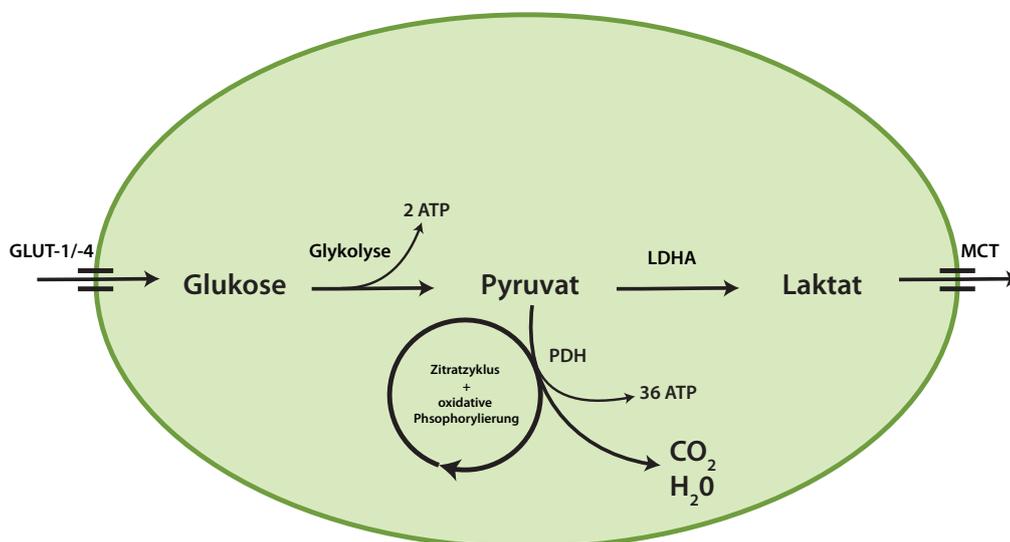


Abb. 7.1 Glukosestoffwechsel: Glukose wird über Glukosetransporter (v.a. GLUT-1 und 4) in die Zelle transportiert und nach mehreren enzymatischen Schritten zu Pyruvat umgewandelt. Dieses wird unter normoxischen Bedingungen nach Durchlauf des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung zu CO_2 und Wasser abgebaut. In Tumorzellen wird Pyruvat jedoch vornehmlich zu Laktat abgebaut und dieses über den Monocarboxylat-Transporter (MCT) nach extrazellulär transportiert

1927). Warburg stellte die Hypothese auf, dass Tumorzellen aufgrund eines Mitochondriendefekts auf die Glykolyse zurückgriffen, was jedoch später experimentell widerlegt werden konnte (Gatenby und Gillies, 2004). Nachdem der Warburg-Effekt einige Jahrzehnte wieder in Vergessenheit geriet, wurde die Idee nicht zuletzt bei der Entwicklung der ^{18}F Fluorodesoxyglukose-Positronenemissions-

Der hohe Glukosebedarf in den Tumorzellen wird durch Veränderungen des Glukosetransports (v.a. GLUT-1) und der Phosphorylierungsschritte gedeckt (Mathupala u.a., 1997; Rivenzon-Segal u.a., 2003).

Weshalb aber wählen Tumorzellen diese energetisch viel ineffizientere Verstoffwechslung von Glukose? Gatenby und Gillies vermuten, dass die aerobe Glykolyse bei Tumoren keineswegs zufällig oder gar nach-

teilig ist, sondern als Evolution der Karzinogenese aufzufassen ist und Tumoren den Vorteil verschafft, die nötigen Metaboliten bereitzustellen.

Die verstärkte Tumorprogression ist offenbar vornehmlich auf einen Wachstumsvorteil des Tumors gegenüber anderen Zellen, begünstigende Faktoren für Wachstum, Invasion und Metastasierung sowie auf eine verminderte Immunüberwachung zurückzuführen (Gatenby und Gillies, 2004).

MYC vermittelt anaerobe Glykolyse

Das Onkoprotein MYC spielt eine ausschlaggebende Rolle bei der Ausbildung des Stoffwechsels hin zur aeroben Glykolyse: MYC ist an der Induktion glykolytischer Enzyme, Glukosetransporter und Transkriptionsfaktoren wie HIF (siehe weiter unten) beteiligt (Osthus u.a., 2000; Dang u.a., 2009; Rob u.a., 2011; Doherty und Cleveland, 2013). Ebenso induziert MYC direkt die Laktatdehydrogenase A (LDHA) (Shim u.a., 1997) und fördert den Abbau von Glutamin, was wiederum in einer höheren Produktion von Laktat resultiert. Zudem induziert MYC die Transkription von Splicing-Faktoren, welche die Produktion von PKM2 induziert, eine Isoform der Pyruvatkinase, die die Glykolyse begünstigt (Osthus u.a., 2000; Christofk u.a., 2008; David u.a., 2010; Doherty und Cleveland, 2013).

Wie bereits erwähnt, sind niedrige Sauerstoffkonzentrationen häufig in solidem

Tumorgewebe anzutreffen. Das rasche Tumorstadium überholt dabei die Vaskularisierung des Tumorgewebes und sorgt für ein hypoxisches Umfeld mit zunehmendem Abstand vom versorgenden Blutgefäß. Unklar jedoch ist, ob die Hypoxie auch für das azide und Laktat-haltige Milieu verantwortlich ist oder ob das vom Tumor freigesetzte Laktat und hiermit Protonen die Gewebsazidose induzieren (Gabriel u.a., 1997; Sitkovsky und Lukashev, 2005).

Ebendieses hypoxische Umfeld aktiviert den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) und trägt maßgeblich zur Umstellung auf aerobe Glykolyse bei. Der Transkriptionsfaktor ist an der Expression von über 70 Genen beteiligt, welche physiologisch unter hypoxischen Bedingungen pH-Regulation, Glukosetransport und Glykolyse steuern. So sind unter anderem GLUT-1, HK2, PKM2, PDK1, LDHA und MCT-4 von der Induktion betroffen. MYC aktiviert die Expression einer Reihe dieser Enzyme und stellt somit einen Schritt zur aeroben Glykolyse dar (Gordan u.a., 2007; Dang u.a., 2008; Gottfried u.a., 2012).

Bei dem Transport des sich ansammelnden Laktats ist der bereits erwähnte Protonengekoppelte Monocarboxylat-Transporter (MCT) notwendig, der das Laktat zusammen mit einem Proton nach extrazellulär befördert. Der MCT wird gesteuert durch

den Konzentrationsgradienten von Laktat und dem pH-Wert. Somit sammeln sich das in den Tumorzellen gebildete Laktat und Protonen extrazellulär an und senken den extrazellulären pH-Wert. Der niedrige pH-Wert induziert Faktoren wie IL-8, VEGF, Cathepsin B und eine Reihe anderer Proteasen, die Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung begünstigen (Rozhin u.a., 1994; Xu und Fidler, 2000; Swietach u.a., 2007).

Aber auch hohe Laktatspiegel korrelierten in vergangenen Untersuchungen mit einem erhöhten Risiko für Metastasierung und vermindertem Überleben von Patienten (Schwickert u.a., 1995; Walenta u.a., 2000). Ebenso konnte eine gesteigerte Motilität von Tumorzellen unter Laktat nachgewiesen werden, was eine Metastasierung begünstigt (Goetze u.a., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst nachgewiesen werden, dass lösliche Faktoren des Tumormilieus auch ohne Zell-Zell-Kontakt ausreichen, um zu einer Einschränkung der NK-Zell-Funktion zu führen. Sowohl bei 291-Zellen als auch bei endogen gewachsenen c-myc-Zellen war dieser Effekt ohne Zell-Zell-Kontakt ersichtlich.

Dass dies an einem mangelndem Nährstoffangebot lag, konnte widerlegt werden. Somit war die Aufmerksamkeit auf die Suche

nach möglichen inhibierenden Faktoren in Tumorüberständen gerichtet, da diese von den Tumorzellen ausgeschiedene Stoffe enthalten und maßgeblich zur Etablierung des Tumormilieus beitragen. Die bereits bekannten inhibitorischen Zytokine, wie IL-10, TGF- β , IL-6 oder auch Exosomen, konnten hier nicht nachgewiesen werden.

Jedoch zeigten sich in allen 291-TÜ und vielen c-myc-TÜ deutlich erhöhte Laktatkonzentrationen zusammen mit abgesenkten pH-Werten. Dies spricht klar für die oben beschriebene Verschiebung des Energiestoffwechsels, hin zur aeroben Glykolyse. Wie in der Literatur beschrieben, begünstigt die Expression von MYC diesen Schritt durch Induktion einer Vielzahl von Genen.

In der Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen hohen Laktatkonzentrationen bzw. niedrigem pH-Wert und der Inhibition der INF- γ -Produktion von NK-Zellen im Rahmen eines Lymphommodells nachgewiesen werden. Dies lässt ähnliche Mechanismen vermuten, die für die T-Zell-Inhibition in Tumoren verantwortlich sind (Mendler u.a., 2012). Die lytische Funktion scheint ebenfalls durch lösliche Faktoren der Lymphomzellen eingeschränkt zu werden. Ob Laktat oder Protonen hierfür verantwortlich sind, bleibt unklar. Die Daten lassen zusätzliche Faktoren vermuten, die bislang nicht nachgewiesen werden konnten.

Der Einfluss von pH-Wert und Laktat auf Metastasierung Tumorprogress weckte Hoffnungen auf mögliche therapeutische Optionen, nämlich das saure Tumormilieu durch die Gabe von alkalisierenden Puffern zu neutralisieren. Robey et al. zeigten, dass die Gabe von Natriumbikarbonat (NaHCO_3) zu Trinkwasser von Mäusen am Modell eines injizierten Mammakarzinoms in einer deutlichen Reduktion der Anzahl und Größe von Metastasen resultierte sowie das Überleben verbesserte (Robey u.a., 2009).

Diese Erkenntnisse konnten auch in dieser Arbeit durch Fütterungsversuche von *c-myc*-Mäusen bestätigt werden, in denen die Gabe von Natriumbikarbonat im Trinkwasser einen signifikanten Überlebensvorteil der Mäuse erbrachte. Die systemische Anreicherung an NaHCO_3 stellt möglicherweise eine höhere Pufferkapazität im gesamten Organismus dar. NaHCO_3 steigert vor allem den extrazellulären pH-Wert (pH_e) im Zentrum des glykolytischen Tumors, wo die pH-Absenkung am ausgeprägtesten zu sehen war, und belässt den intrazellulären pH (pH_i) und den systemischen pH im restlichen Körper weitestgehend unverändert (Robey u.a., 2009). Dies könnte im sonst sauren Tumormilieu dazu führen, dass in das Tumorgewebe einwandernde Immunzellen keinen Funktionsverlust erleiden

und so durch Ausübung ihrer sekretorischen Funktion länger das Tumorwachstum in Schach halten.

Ausschlaggebend für die Effektivität des Puffersystems zur Regulierung des pH-Werts ist vorrangig der pK_a -Wert des Puffers. Dabei ist ein pK_a -Wert, der sich im Bereich des vorherrschenden pH-Werts befindet, am günstigsten. Bei NaHCO_3 liegt der $\text{pK}_a = 6,1$, die in Tumoren gemessenen pH-Werte liegen jedoch bei ca. 6,8 und der physiologische pH bei 7,35-7,45. So wäre ein Puffer mit einem pK_a mit einem pK_a um 7,0 noch effektiver und ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen und Therapieversuche (Silva u.a., 2009).

Wirkung von pH-Wert und Laktat auf das Immunsystem

Die durch das saure und hypoxische Mikromilieu verursachte Suppression des Immunsystems ist bei T-Zellen und dendritischen Zellen schon länger nachgewiesen (Loeffler u.a., 1990; Gabriel u.a., 1997; Fischer u.a., 2007; Gottfried u.a., 2008). T-Zellen greifen ebenfalls auf anaerobe Glykolyse zurück. Das hierbei anfallende Laktat wird über den MCT zusammen mit einem Proton nach extrazellulär transportiert (Wang u.a., 1976; MacDonald und Koch, 1977). Im sauren Tumormilieu sinkt der Protonengradient über die Zellwand und der gradienten-gesteuerte MCT transpor-

tiert weniger Laktat nach extrazellulär. So sammelt sich Laktat in den T-Zellen an, es kommt zum Erlahmen des Energiestoffwechsels und zur Inhibition der Signaltransduktion (Abb. 7.2). T-Zellen zeigten eine verminderte Proliferation, lytische und sekretorische Funktion sowie einen erhöhten Zelltod *in vitro* wie *in vivo*. Entscheidend ist die Unterscheidung zwischen Milchsäure (Laktat mit Proton), Natriumlaktat (Laktat mit Natrium) und reinen Protonen (lediglich Absenkung des pH-Wertes). Die stärkste Inhibition der Zellfunktion wird bei Milchsäure – also Laktat und Proton –, die geringste bei Natriumlaktat apparent. Dies lässt sich durch die Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten der beiden Komponenten Laktat und Proton erklären: Ist sowohl der Protonen- als auch Laktatgradient niedrig (Abb. 7.2, C), wird der Abtransport über den MCT am stärksten eingeschränkt (Fischer u.a., 2007; Mendler u.a., 2012).

Die Zusammenhänge zwischen pH-Wert bzw. Laktatkonzentration und Immunfunktionen können in der vorliegenden Arbeit nun auch für NK-Zellen nachgewiesen werden und suggerieren ähnliche Mechanismen. Mendler u.a. versuchten die Mechanismen auf Ebene der Signaltransduktion aufzudecken. Sie legten die Beteiligung der p38- und JNK/c-Jun-Signalkaskade in

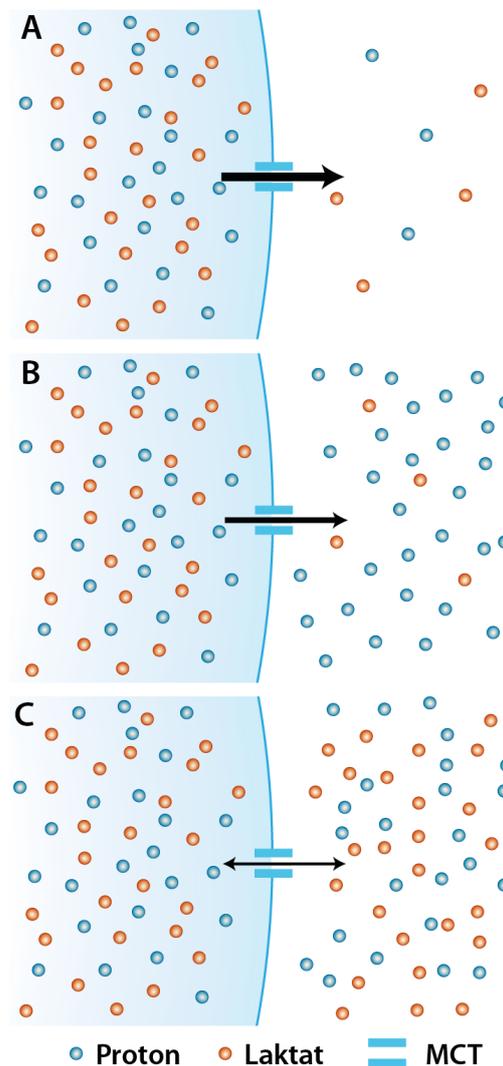


Abb. 7.2 Transport von Laktat und Protonen über den Monocarboxylat-Transporter (MCT): A: Bei niedriger extrazellulärer Laktat- und Protonenkonzentration besteht für beide Komponenten ein hoher Konzentrationsgradient und damit besteht eine starke Zugkraft nach extrazellulär. B: Mit steigender Protonenkonzentration sinkt entsprechend der Gradient bzgl. Protonen und der Zug nach extrazellulär sinkt. C: Ist die extrazelluläre Konzentration für Protonen und Laktat ähnlich hoch wie intrazellulär, besteht kein Gradient über die Zellwand und der Abtransport ist nicht mehr gewährleistet.

CD8⁺-Zellen nahe und zeigten eine verminderte Enzymaktivität eben dieser Signalwege. Diese wirkte sich eher auf die sekretorische Funktion bezüglich INF- γ als auf die

lytische Funktion der T-Zellen aus (Mendler u.a., 2012).

Auch eine Inhibition durch die MAPKAP-Kinase 3 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 3) über den p38- und ERK1/2-Pfad ist bei NK-Zellen beschrieben. Hier scheint vor allem die sekretorische Funktion der NK-Zellen betroffen zu sein (Köther u.a., 2014).

Ähnliches ließ sich auch in dieser Arbeit erkennen: die sekretorische Funktion der NK-Zellen ist durch pH-Absenkung und Laktat deutlich inhibiert. Eine Hemmung der Zytotoxizität konnte zwar durch den Tumorüberstand von Lymphomzellen gezeigt werden, ein signifikanter Zusammenhang mit pH-Wert oder Laktat konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. So scheinen für die Zytotoxizität andere Mechanismen maßgeblich zu sein.

Es bedarf es weiterer Bemühungen, die genauen Zusammenhänge auf Ebene der Signaltransduktion und Transkription aufzudecken. Erst das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen auf molekularer und genetischer Ebene kann helfen, weitere therapeutische Optionen zu entwickeln.

7.2 NK-Einwanderung essenziell für Tumorabwehr

Die NK-Zell-Einwanderung wirkt sich positiv auf die Prognose verschiedener solider Tumoren aus (Herpen, 2005; Hsia u.a., 2005; Menard u.a., 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass NK-Zellen spezifisch zu einer Größenreduktion von CXCL10-positiven Melanomen beitragen (Wennerberg u.a., 2014). Zudem ist bekannt, dass die Expression von CXCR3, des Rezeptors des Chemokins CXCL10, Bedingung für die NK-Zelleinwanderung ist und CXCL10 neben CXCL9 und CXCL11 den wichtigsten Liganden darstellt (Wendel u.a., 2008).

Oft ist die Effektorzelleinwanderung in solide Tumoren eingeschränkt, was das Abtöten der Tumorzellen verhindert und damit eine Tumorprogression und Prognoseverschlechterung bewirkt. Dies bot den therapeutischen Ansatzpunkt, CXCL10 in die Tumorzellwand zu integrieren und so als Trigger für NK-Zelleinwanderung zu gewinnen. Dabei behalf man sich der Methode, den Kopf des Chemokins CXCL10 an einen GPI-Anker zu koppeln, damit sich dieser in die Zellwand von Tumor-, Gewebs- oder Endothelialzellen integrieren könne (Medof u.a., 1996). Nach gelungener Kopplung von CXCL10 und GPI-Anker konnte dessen Wirksamkeit bezüglich der

Rekrutierung von NK-Zellen zunächst in der Flusskammer *in vitro* verifiziert werden (nicht gezeigte Daten von N. Münchmeier). Im folgenden Schritt konnte die NK- und T-Zelleinwanderung anhand exogen subkutan gesetzter 291-Lymphomzellen untersucht werden. Hier zeigte sich in den unbehandelten Tumoren – gut vereinbar mit Erkenntnissen aus der Literatur – trotz ausreichender Vaskularisierung eine nur geringe, peripher betonte NK-Zelleinwanderung. Im Gegensatz zu NK-Zellen waren T-Zellen zahlreich vor allem im Tumorzentrum vertreten. Dies stellte gute Voraussetzungen dar, um eine Steigerung der mangelhaften NK-Zelleinwanderung zu prüfen.

So konnte nach Injektion des GPI-Ankergekoppelten Proteins auch *in vivo* eine gesteigerte, wenn auch nicht signifikante, NK-Zelleinwanderung nachgewiesen werden. Bereits das nicht gekoppelte, frei lösliche CXCL10 erwies sich als effektiv, NK-Zellen anzulocken, was wiederum die Vermittlung durch die CXCL10-CXCR3-Interaktion nahelegt.

Zum einen zeigen diese Ergebnisse Möglichkeiten auf, Zyto- und Chemokine in bestehende Zellwände von Tumorgewebe zu integrieren und so die Einwanderung von Immunzellen zu verbessern. Zum anderen

stellen Chemokine wie CXCL10 so möglicherweise eine vielversprechende supportiv-ve Therapieoption dar. Es sind weitere Anstrengungen notwendig, die genauen Zusammenhänge der NK-Zelleinwanderung zu untersuchen, um die Methode bis hin zu einer wirkungsvollen NK-Zelleinwanderung weiterzuentwickeln.

7.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt das Umfeld eines endogen wachsenden Lymphoms, in dem NK-Zellen ihrer Aufgabe der Tumorabwehr zunehmend nicht mehr gerecht werden. Es wurden hierfür ursächliche, von den Tumorzellen ausgehende Mechanismen herausgearbeitet und mögliche Lösungsansätze in Aussicht gestellt.

Künftige Anstrengungen sollten der experimentellen Ausarbeitung und Verifizierung dieser Lösungsansätze *in vivo* gelten.

Zum einen ist es erforderlich, die genauen Mechanismen der NK-Zellinhibition auch intrazellulär auf Ebene der Signaltransduktion und Stoffwechselwege genauer zu verstehen. Hieraus könnten noch spezifischere Lösungsansätze entstehen.

Außerdem wäre die Etablierung weiterer, noch wirksamerer Puffersysteme zur Neutralisierung des aziden Tumormilieus von Interesse. Hiervon könnten nicht nur NK-Zellen, sondern auch T-Zellen profitieren, für die eine Funktionseinschränkung durch Laktatazidose bereits nachgewiesen werden konnte (Mendler u.a., 2012). Weiterhin sollte eine *In-vivo*-Analyse von NK-Zellen mit und ohne eingesetztem alkalisierendem Puffersystem erfolgen, um die Zusammenhänge auch *in vivo* zu verifizieren.

Sollte nachgewiesen werden können, dass

NK-Zellen in diesen Systemen auch in einem endogen wachsenden Tumor ihre Funktion verbessern können, gibt dies Hoffnung sowohl für adoptive NK-Zell-Transfers als auch für Ansätze, in denen endogene NK-Zellen durch Wiedererlangen ihrer sekretorischen Funktion maßgeblich zur Tumorabwehr beitragen.

NK-Zell-basierte Therapien rücken aufgrund der Schlüsselposition der NK-Zellen auch im Rahmen klinischer Studien immer wieder in den wissenschaftlichen Fokus. Bislang scheiterten jedoch viele an der eingeschränkten sekretorischen oder zytotoxischen Funktion der Zellen oder aber an schweren Nebenwirkungen der begleitenden Zytokintherapien (insbesondere IL-2) (Burns u.a., 2003; Ishikawa u.a., 2004; Cheng u.a., 2013).

Für beide Szenarien hat die Verbesserung von NK-Zelleinwanderung ebenso einen hohen Stellenwert. Sollte es mit der beschriebenen Methode der Koppelung von Chemokinen an GPI-Anker gelingen, die NK-Zelleinwanderung maßgeblich zu verbessern – sowohl für endogene wie exogene Zellen – stellt dies gerade zusammen mit der Verbesserung des Tumormilieus eine vielversprechende therapeutische Komponente dar. Auch die Koppelung an andere Che-

mokine oder Botenstoffe im weitesten Sinne, welche Immunzellen anlocken und stimulieren, könnte hilfreich sein und sollte in diesem Rahmen getestet werden.

Beide Methoden könnten NK-Zell-basierten Immuntherapien zugutekommen, deren bisheriger Erfolg durch mangelnde NK-Zell-Einwanderung und das inhibierende Tumormilieu eingeschränkt war.

8 Literaturverzeichnis

- ADAM, C., S. KING, T. ALLGEIER, H. BRAUMÜLLER, C. LÜKING, J. MYSLIWETZ, A. KRIEGESKORTE, D. BUSCH, M. RÖCKEN UND R. MOCIKAT (2005). "DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction." *Blood* 106(1): 338-344.
- ANFOSSI, N., P. ANDRÉ, S. GUIA, C. S. FALK, S. ROETYNCK, C. A. STEWART, V. BRESO, C. FRASSATI, D. REVIRON, D. MIDDLETON, F. ROMAGNÉ, S. UGOLINI UND E. VIVIER (2006). "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." *Immunity* 25(2): 331-342.
- BORNKAMM, G. (2009). "Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 124(8): 1745-1755.
- BRENNER, C., S. KING, M. PRZEWOZNIK, I. WOLTERS, C. ADAM, G. BORNKAMM, D. BUSCH, M. RÖCKEN UND R. MOCIKAT (2010). "Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells." *European journal of immunology* 40(2): 494-504.
- BURKITT, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." *The British journal of surgery* 46(197): 218-223.
- BURNET, F. M. (1957). "Cancer - a biological approach." *British Medical Journal*(1): 841-847.
- BURNS, L. J., D. J. WEISDORF, T. E. DEFOR, D. H. VESOLE, T. L. REPKA, B. R. BLAZAR, S. R. BURGER, A. PANOSKALTSIS-MORTARI, C. A. KEEVER-TAYLOR, M. J. J. ZHANG UND J. S. MILLER (2003). "IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial." *Bone marrow transplantation* 32(2): 177-186.
- CERWENKA, A. UND L. LANIER (2001). "Natural killer cells, viruses and cancer." *Nature reviews. Immunology* 1(1): 41-49.
- CHENG, M., Y. CHEN, W. XIAO, R. SUN UND Z. TIAN (2013). "NK cell-based immunotherapy for malignant diseases." *Cellular & molecular immunology* 10(3): 230-252.
- CHRISTOFK, H. R., M. G. VANDER HEIDEN, M. H. HARRIS, A. RAMANATHAN, R. E. GERSZTEN, R. WEI, M. D. FLEMING, S. L. SCHREIBER UND L. C. CANTLEY (2008). "The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth." *Nature* 452(7184): 230-233.
- COCA, S., J. PEREZ-PIQUERAS, D. MARTINEZ, A. COLMENAREJO, M. SAEZ, C. VALLEJO, J. MARTOS UND M. MORENO (1997). "The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma." *Cancer* 79(12): 2320-2328.
- CZERNIN, J. UND M. PHELPS (2002). "Positron emission tomography scanning: current and future applications." *Annual review of medicine* 53: 89-112.
- DANG, C. V., J.-W. W. KIM, P. GAO UND J. YUSTEIN (2008). "The interplay between MYC and HIF in cancer." *Nature reviews. Cancer* 8(1): 51-56.
- DANG, C. V., A. LE UND P. GAO (2009). "MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities." *Clinical Cancer Research* 15(21): 6479-6483.
- DAVID, C., M. CHEN, M. ASSANA, P. CANOLL UND J. MANLEY (2010). "HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer." *Nature* 463(7279): 364-368.
- DOHERTY, J. UND J. CLEVELAND (2013). "Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics." *The Journal of clinical investigation* 123(9): 3685-3692.
- DOUGLAS, H. UND A. W. ROBERT (2011). "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell*.
- DUNN, G., A. BRUCE, H. IKEDA, L. OLD UND R. SCHREIBER (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nature immunology* 3(11): 991-998.
- EHRlich, P. (1909). "Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung." *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde*(5): 273-290.
- EPSTEIN, M., B. ACHONG UND Y. BARR (1964). "VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA." *Lancet* 1(7335): 702-703.
- FARAG, S. S., T. A. FEHNIGER, L. RUGGERI, A. VELARDI UND M. A. CALIGIURI (2002). "Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect." *Blood* 100(6): 1935-1947.
- FEHNIGER, T., S. CAI, X. CAO, A. BREDEMAYER, R. PRESTI, A. FRENCH UND T. LEY (2007). "Acquisition

- of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs." *Immunity* 26(6): 798-811.
- FISCHER, K., P. HOFFMANN, S. VOELKL, N. MEIDENBAUER, J. AMMER, M. EDINGER, E. GOTTFRIED, S. SCHWARZ, G. ROTHE, S. HOVES, K. RENNER, B. TIMISCHL, A. MACKENSEN, L. KUNZ-SCHUGHART, R. ANDREESSEN, S. KRAUSE UND M. KREUTZ (2007). "Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells." *Blood* 109(9): 3812-3819.
- GABRIEL, H., Y. FAN, D. MARC UND K. J. RAKESH (1997). "Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation." *Nature Medicine*.
- GALON, J., A. COSTES, F. SANCHEZ-CABO, A. KIRILOVSKY, B. MLECNIK, C. LAGORCE-PAGÈS, M. TOSOLINI, M. CAMUS, A. BERGER, P. WIND, F. ZINZINDOHOUE, P. BRUNEVAL, P.-H. H. CUGNENC, Z. TRAJANOSKI, W.-H. H. FRIDMAN UND F. PAGÈS (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science (New York, N.Y.)* 313(5795): 1960-1964.
- GANAL, S., S. SANOS, C. KALLFASS, K. OBERLE, C. JOHNER, C. KIRSCHNING, S. LIENENKLAUS, S. WEISS, P. STAHELI, P. AICHELE UND A. DIEFENBACH (2012). "Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota." *Immunity* 37(1): 171-186.
- GATENBY, R. UND R. GILLIES (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nature reviews. Cancer* 4(11): 891-899.
- GHIRINGHELLI, F., C. MÉNARD, M. TERME, C. FLAMENT, J. TAIEB, N. CHAPUT, P. PUIG, S. NOVAULT, B. ESCUDIER, E. VIVIER, A. LECESNE, C. ROBERT, J.-Y. BLAY, J. BERNARD, S. CAILLAT-ZUCMAN, A. FREITAS, T. TURSZ, O. WAGNER-BALLON, C. CAPRON, W. VAINCHENCKER, F. MARTIN UND L. ZITVOGEL (2005). "CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner." *The Journal of experimental medicine* 202(8): 1075-1085.
- GOETZE, K., S. WALENTA, M. KSIAZKIEWICZ, L. A. KUNZ-SCHUGHART UND W. MUELLER-KLIESER (2011). "Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release." *International journal of oncology* 39(2): 453-463.
- GORDAN, J. D., C. B. THOMPSON UND M. C. SIMON (2007). "HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation." *Cancer cell* 12(2): 108-113.
- GOTTFRIED, E., M. KREUTZ UND A. MACKENSEN (2008). "Tumor-induced modulation of dendritic cell function." *Cytokine & growth factor reviews* 19(1): 65-77.
- GOTTFRIED, E., M. KREUTZ UND A. MACKENSEN (2012). "Tumor metabolism as modulator of immune response and tumor progression." *Seminars in cancer biology* 22(4): 335-341.
- GRIFFIOEN, A. W., C. A. DAMEN UND G. H. BLIJHAM (1996). "Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium."
- GUIA, S., C. COGNET, L. DE BEAUCOUDREY, M. TESSMER, E. JOUANGUY, C. BERGER, O. FILIPE-SANTOS, J. FEINBERG, Y. CAMCIOGLU, J. LEVY, S. AL JUMAAH, S. AL-HAJJAR, J.-L. STEPHAN, C. FIESCHI, L. ABEL, L. BROSSAY, J.-L. CASANOVA UND E. VIVIER (2008). "A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo." *Blood* 111(10): 5008-5016.
- HERPEN, C. M. L. v. (2005). "Intratumoral Recombinant Human Interleukin-12 Administration in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Modifies Locoregional Lymph Node Architecture and Induces Natural Killer Cell Infiltration in the Primary Tumor." *Clinical Cancer Research* 11(5): 1899-1909.
- HSIA, J., J. CHEN, C. CHEN, C. HSU UND J. MIAW (2005). "Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma." *Chang Gung*
- HUANG, D., F.-D. SHI, S. JUNG, G. C. PIEN, J. WANG, T. P. SALAZAR-MATHER, T. T. HE, J. T. WEAVER, H.-G. LJUNGGREN UND C. A. BIRON (2006). "The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system." *The FASEB Journal* 20(7): 896-905.
- HUANG, H. L., YONGQING; XIANG, JIM (2002). "Synergistic effect of adoptive T-cell therapy and intratumoral interferon γ -inducible protein-10 transgene expression in treatment of established tumors." *Cellular Immunology* 217(1-2): 1222.
- ISHIGAMI, S., S. NATSUGOE, K. TOKUDA, A. NAKAJO, X. CHE, H. IWASHIGE, K. ARIDOME, S. HOKITA UND T. AIKOU (2000). "Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma." *Cancer* 88(3): 577-583.
- ISHIKAWA, E., K. TSUBOI, K. SAJIO, H. HARADA, S. TAKANO, T. NOSE UND T. OHNO (2004).

- "Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma." *Anticancer research* 24(3b): 1861-1871.
- KÄRRE, K., H. LJUNGGREN, G. PIONTEK UND R. KIESSLING (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." *Nature* 319(6055): 675-678.
- KERDILES, Y., S. UGOLINI UND E. VIVIER (2013). "T cell regulation of natural killer cells." *The Journal of experimental medicine* 210(6): 1065-1068.
- KHAN, I. A., S. Y. THOMAS, M. M. MORETTO, F. S. LEE, S. A. ISLAM, C. COMBE, J. D. SCHWARTZMAN UND A. D. LUSTER (2006). "CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection." *PLoS pathogens* 2(6).
- KIESSLING, R., E. KLEIN UND H. WIGZELL (1975). "'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype." *European journal of immunology* 5(2): 112-117.
- KIM, S., J. POURSIÈNE-LAURENT, S. M. TRUSCOTT, L. LYBARGER, Y.-J. J. SONG, L. YANG, A. R. FRENCH, J. B. SUNWOO, S. LEMIEUX, T. H. HANSEN UND W. M. YOKOYAMA (2005). "Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." *Nature* 436(7051): 709-713.
- KÖTHER, K., C. NORDHOFF, D. MASEMANN, G. VARGA, J. H. BREM, M. GAESTEL, V. WIXLER UND S. LUDWIG (2014). "MAPKAP kinase 3 suppresses *Ifng* gene expression and attenuates NK cell cytotoxicity and Th1 CD4 T-cell development upon influenza A virus infection." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- KOVALCHUK, A., C. QI, T. TORREY, L. TADDESSE-HEATH, L. FEIGENBAUM, S. PARK, A. GERBITZ, G. KLOBECK, K. HOERTNAGEL, A. POLACK, G. BORNKAMM, S. JANZ UND H. MORSE (2000). "Burkitt lymphoma in the mouse." *The Journal of experimental medicine* 192(8): 1183-1190.
- KRONENBERGER, K., E. NÖSSNER, B. FRANKENBERGER, U. WAHL, M. DREYLING, M. HALLEK UND R. MOCIKAT (2008). "A polyvalent cellular vaccine induces T-cell responses against specific self-antigens overexpressed in chronic lymphocytic B-cell leukemia." *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 31(8): 723-730.
- LAKSHMI NARENDRA, B., K. ESHVENDAR REDDY, S. SHANTIKUMAR UND S. RAMAKRISHNA (2013). "Immune system: a double-edged sword in cancer." *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 62(9): 823-834.
- LOEFFLER, D. A., P. C. KENG, R. B. BAGGS UND E. M. LORD (1990). "Lymphocytic infiltration and cytotoxicity under hypoxic conditions in the EMT6 mouse mammary tumor." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 45(3): 462-467.
- MACDONALD, H. R. UND C. J. KOCH (1977). "Energy metabolism and T-cell-mediated cytotoxicity. I. Synergism between inhibitors of respiration and glycolysis." *The Journal of experimental medicine* 146(3): 698-709.
- MARTÍN-FONTECHA, A., L. THOMSEN, S. BRETT, C. GERARD, M. LIPP, A. LANZAVECCHIA UND F. SALLUSTO (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." *Nature immunology* 5(12): 1260-1265.
- MATHUPALA, S. P., A. REMPEL UND P. L. PEDERSEN (1997). "Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 29(4): 339-343.
- MEDOF, M. E., S. NAGARAJAN UND M. L. TYKOCINSKI (1996). "Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins." *The FASEB journal*.
- MENARD, C., J. Y. BLAY, C. BORG, S. MICHIELS, F. GHIRINGHELLI, C. ROBERT, C. NONN, N. CHAPUT, J. TAIEB, N. F. DELAHAYE, C. FLAMENT, J. F. EMILE, A. L. CESNE UND L. ZITVOGEL (2009). "Natural Killer Cell IFN- Levels Predict Long-term Survival with Imatinib Mesylate Therapy in Gastrointestinal Stromal Tumor-Bearing Patients." *Cancer Research* 69(8): 3563-3569.
- MENDLER, A., B. HU, P. PRINZ, M. KREUTZ, E. GOTTFRIED UND E. NOESSNER (2012). "Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 131(3): 633-640.
- MOCIKAT, R., H. BRAUMÜLLER, A. GUMY, O. EGETER, H. ZIEGLER, U. REUSCH, A. BUBECK, J. LOUIS, R. MAILHAMMER, G. RIETHMÜLLER, U. KOSZINOWSKI UND M. RÖCKEN (2003). "Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses." *Immunity* 19(4): 561-569.
- MORRISON, B. E., S. J. PARK, J. M. MOONEY UND B. MEHRAD (2003). "Chemokine-mediated recruitment

- of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis." *The Journal of clinical investigation* 112(12): 1862-1870.
- MUENCHMEIER, N., S. BOECKER, L. BANKEL, L. HINZ, N. RIETH, C. LAPA, A. MENDLER, E. NOESSNER, R. MOCIKAT UND P. NELSON (2013). "A Novel CXCL10-Based GPI-Anchored Fusion Protein as Adjuvant in NK-Based Tumor Therapy." *PloS one* 8(8).
- MUKAI, S., J. KJÆRGAARD, S. SHU UND G. E. PLAUTZ (1999). "Infiltration of tumors by systemically transferred tumor-reactive T lymphocytes is required for antitumor efficacy." *Cancer research* 59(20): 5245-5249.
- OSTHUS, R., H. SHIM, S. KIM, Q. LI, R. REDDY, M. MUKHERJEE, Y. XU, D. WONSEY, L. LEE UND C. DANG (2000). "Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc." *The Journal of biological chemistry* 275(29): 21797-21800.
- PARKIN, J. UND B. COHEN (2001). "An overview of the immune system." *Lancet* 357(9270): 1777-1789.
- PRZEWOZNIK, M., N. HÖMBERG, M. NAUJOKS, J. PÖTZL, N. MÜNCHMEIER, C. BRENNER, D. ANZ, C. BOURQUIN, P. NELSON, M. RÖCKEN UND R. MOCIKAT (2012). "Recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma: implications for therapeutic cell transfer." *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 35(3): 217-222.
- RIVENZON-SEGAL, D., S. BOLDIN-ADAMSKY, D. SEGER, R. SEGER UND H. DEGANI (2003). "Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 107(2): 177-182.
- ROB, A. C., S. H. ISAAC UND W. M. TAK (2011). "Regulation of cancer cell metabolism." *Nature Reviews Cancer*.
- ROBEY, I., B. BAGGETT, N. KIRKPATRICK, D. ROE, J. DOSESCU, B. SLOANE, A. HASHIM, D. MORSE, N. RAGHUNAND, R. GATENBY UND R. GILLIES (2009). "Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases." *Cancer research* 69(6): 2260-2268.
- RONALD, J. B., F. ANDREA, K. SARAH, B. FABIAN, S. DIMITRA, B. KLARA, K. DIONYSIOS, O. B.-J. ANNE, A. G. PHYLLIS UND C. GEORGE (2008). "Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy." *Nature Medicine* 14(1): 28-36.
- ROZHIN, J., M. SAMENI, G. ZIEGLER UND B. SLOANE (1994). "Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells." *Cancer research* 54(24): 6517-6525.
- SATO, E., S. H. OLSON, J. AHN, B. BUNDY, H. NISHIKAWA, F. QIAN, A. A. JUNGBLUTH, D. FROSINA, S. GNJATIC, C. AMBROSONE, J. KEPNER, T. ODUNSI, G. RITTER, S. LELE, Y.-T. T. CHEN, H. OHTANI, L. J. OLD UND K. ODUNSI (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(51): 18538-18543.
- SCHREIBER, R., L. OLD UND M. SMYTH (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science (New York, N.Y.)* 331(6024): 1565-1570.
- SCHWICKERT, G., S. WALENTA, K. SUNDFØR, E. K. ROFSTAD UND W. MUELLER-KLIESER (1995). "Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis." *Cancer research* 55(21): 4757-4759.
- SHANKARAN, V., H. IKEDA, A. BRUCE, J. WHITE, P. SWANSON, L. OLD UND R. SCHREIBER (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* 410(6832): 1107-1111.
- SHIM, H., C. DOLDE, B. C. LEWIS, C. S. WU, G. DANG, R. A. JUNGSMANN, R. DALLA-FAVERA UND C. V. DANG (1997). "c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13): 6658-6663.
- SHIMIZU, J., S. YAMAZAKI UND S. SAKAGUCHI (1999). "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163(10): 5211-5218.
- SILVA, A., J. YUNES, R. GILLIES UND R. GATENBY (2009). "The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion." *Cancer research* 69(6): 2677-2684.
- SITKOVSKY, M. UND D. LUKASHEV (2005). "Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors." *Nature reviews. Immunology* 5(9): 712-721.
- SMYTH, M., Y. HAYAKAWA, K. TAKEDA UND H. YAGITA (2002). "New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer." *Nature reviews.*

Cancer 2(11): 850-861.

SMYTH, M., M. TENG, J. SWANN, K. KYPARISSOUDIS, D. GODFREY UND Y. HAYAKAWA (2006). "CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 176(3): 1582-1587.

SWIETACH, P., R. VAUGHAN-JONES UND A. HARRIS (2007). "Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9." *Cancer metastasis reviews* 26(2): 299-310.

TAKANAMI, I., K. TAKEUCHI UND M. GIGA (2001). "The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma." *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 121(6): 1058-1063.

VESELY, M., M. KERSHAW, R. SCHREIBER UND M. SMYTH (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." *Annual review of immunology* 29: 235-271.

VILLEGAS, F., S. COCA, V. VILLARRUBIA, R. JIMÉNEZ, M. CHILLÓN, J. JAREÑO, M. ZUIL UND L. CALLOL (2002). "Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer." *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 35(1): 23-28.

VIVIER, E., J. NUNÈS UND F. VÉLY (2004). "Natural killer cell signaling pathways." *Science (New York, N.Y.)* 306(5701): 1517-1519.

VIVIER, E., D. RAULET, A. MORETTA, M. CALIGIURI, L. ZITVOGEL, L. LANIER, W. YOKOYAMA UND S. UGOLINI (2011). "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." *Science (New York, N.Y.)* 331(6013): 44-49.

VIVIER, E., E. TOMASELLO, M. BARATIN, T. WALZER UND S. UGOLINI (2008). "Functions of natural killer cells." *Nature immunology* 9(5): 503-510.

VIVIER, E. UND S. UGOLINI (2010). "NK cells: receptors and functions."

VIVIER, E., S. UGOLINI, D. BLAISE, C. CHABANNON UND L. BROSSAY (2012). "Targeting natural killer cells

and natural killer T cells in cancer." *Nature reviews. Immunology* 12(4): 239-252.

WALDMANN, T., S. DUBOIS UND Y. TAGAYA (2001). "Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy." *Immunity* 14(2): 105-110.

WALENTA, S., M. WETTERLING, M. LEHRKE, G. SCHWICKERT, K. SUNDFØR, E. ROFSTAD UND W. MUELLER-KLIESER (2000). "High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers." *Cancer research* 60(4): 916-921.

WANG, T., C. MARQUARDT UND J. FOKER (1976). "Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation." *Nature* 261(5562): 702-705.

WARBURG, O., F. WIND UND E. NEGELEIN (1927). "THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY." *The Journal of general physiology* 8(6): 519-530.

WENDEL, M., I. GALANI, E. SURI-PAYER UND A. CERWENKA (2008). "Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands." *Cancer research* 68(20): 8437-8445.

WENNERBERG, E., V. KREMER, R. CHILDS UND A. LUNDQVIST (2014). "CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo." *Cancer immunology, immunotherapy : CII*.

XU, L. UND I. FIDLER (2000). "Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells." *Cancer research* 60(16): 4610-4616.

ZHANG, H.-G. UND W. GRIZZLE (2011). "Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(5): 959-964.

ZITVOGEL, L., A. TESNIERE UND G. KROEMER (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." *Nature reviews. Immunology* 6(10): 715-727.

9.4 Eidesstattliche Versicherung

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

Untersuchungen zur NK-Zell-Funktion im Tumormilieu spontan wachsender Lymphome

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, 05.02.2018

Doktorand (Lorenz Bankel)