

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der
Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner

Mechanismen der Neuroblastomerkenkung durch Natürliche Killerzellen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Kathrin Fredecke
aus Helmstedt

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Frohn
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Boris Perras

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2007

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 28.08.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

-Dekan der Medizinischen Fakultät-

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	7
1.1 Das Neuroblastom.....	7
1.1.1 Was ist ein Neuroblastom?	7
1.1.2 Stadien des Neuroblastoms.....	8
1.1.3 Therapie und Heilungschancen beim Neuroblastom.....	8
1.2 Natürliche Killerzellen.....	9
1.2.1 Herkunft und Morphologie.....	9
1.2.2 NK-Zellen und HLA.....	10
1.2.3 Rezeptoren auf NK-Zellen.....	11
1.2.3.1 CD56.....	12
1.2.3.2 CD16.....	12
1.2.3.3 KIRs.....	12
1.2.3.4 Lektin-ähnliche Rezeptoren.....	14
1.2.3.5 NCR (natural cytotoxicity receptor).....	14
1.2.3.6 LFA-1 (leucocyte function-associated antigen 1).....	14
1.2.3.6 Interleukin 2 Rezeptor.....	14
1.2.4 Zytokine und NK-Zellen.....	15
1.2.5 Wirkungsmechanismen der NK-Zellen.....	15
1.2.6 Vermehrung von NK-Zellen für klinische Applikationen (Expansion)..	16
1.2.7 NK-Zellen und das Neuroblastom.....	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material	19
2.1 Geräte.....	19
2.2 Laborbedarf.....	19

2.3 Reagenzien, Chemikalien.....	20
2.4 Zellkulturen.....	21
2.5 Zellkultur-Reagenzien, -Medien und –Zusätze.....	21
2.6 Antikörper.....	22
2.7 Enzyme und Oligonukleotide (Primer).....	22
2.8 Isolierungskits.....	23
2.9 Lösungen / Puffer.....	23

3. Methoden 24

3.1 Einzelschritte der Methodik.....	24
3.2 Zellkulturen.....	24
3.2.1 SKNMC.....	24
3.2.2 Kelly.....	25
3.2.3 IMR32.....	25
3.2.4 IMR5.....	25
3.2.5 SHSY5Y.....	26
3.2.6 K562.....	26
3.2.7 Einfrieren von Zellen.....	26
3.2.8 Auftauen von Zellen.....	27
3.3 Präparation der NK-Zellen	27
3.3.1 Zellisolierung.....	28
3.3.2 Feederzellen.....	28
3.3.3 NK-Zell-Expansion.....	28
3.3.4 Färbung der NK-Zellen mit D275.....	29
3.4 Vorbereitung der Zytotoxizitätstests.....	30
3.4.1 Co-Kultur von Effektor- und Targetzellen.....	30
3.4.2 INF γ -Stimulation der Neuroblastomzellen.....	31
3.4.3 HLA-Blockierung der mit INF γ -stimulierten Neuroblastomzellen.....	31

3.4.4 Blockierung der CD56-Rezeptoren	32
3.5 Zytotoxizitätstests.....	32
3.5.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie.....	32
3.5.2 Zweifarbfluoreszenzzytotoxizitätsmessung.....	34
3.5.3 Darstellung der Messdaten.....	36
3.5.4 Statistik.....	37
3.6 Quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen.....	37
3.6.1 Bestimmung der HLA- bzw. ICAM-1-Expression.....	37
3.6.2 Bestimmung der CD56 - Expression auf Effektor- und Targetzellen..	38
3.7 Polymerase - Kettenreaktion (PCR).....	39
3.7.1 Prinzip der PCR.....	39
3.7.2 Gelelektrophorese.....	39
3.7.3 DNA-Isolierung.....	40
3.7.4 Mykoplasmen - PCR.....	40
3.7.5 Bestimmung der HLA-C-Gruppen der Zellen.....	42
4. Ergebnisse	45
4.1 Lyse der unstimulierten Neuroblastomzellen.....	45
4.2 Lyse der mit INF γ -stimulierten Neuroblastomzellen.....	46
4.3 HLA- und ICAM-1- Zunahme nach INF γ -Stimulation	48
4.4 Lyse der mit INF γ -stimulierten und mit HLA - Ak blockierten Zellen.....	52
4.5 Zytotoxizitätstests mit HLA-C Gruppenspezifität.....	55
4.6 Zytotoxizitätstests mit CD56 - Antikörpern.....	56
5. Diskussion	59
5.1 NK-Zellen.....	59
5.2 HLA.....	60

5.3 ICAM-1.....	63
5.4 Apoptosegene.....	64
5.5 Allospezifität von NK-Zellen.....	66
5.6 CD56.....	68
5.7 Limitation der Versuche.....	69
5.8 Überblick.....	70

6. Zusammenfassung_____ **71**

7. Literaturverzeichnis_____ **73**

7.1 Zeitschriften und andere Literaturstellen.....	73
7.2 Elektronische Datenbanken.....	84

8. Anhang_____ **85**

8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	85
8.2 Danksagung.....	88
8.3 Lebenslauf.....	89

1. EINLEITUNG

1.1 Das Neuroblastom

1.1.1 Was ist ein Neuroblastom?

Das Neuroblastom ist eine bösartige Erkrankung des sympathischen Nervensystems. Der Primärsitz des Tumors ist dementsprechend dort zu finden, wo sympathisches Nervengewebe vorkommt, also entlang der Wirbelsäule, im Kopf- und Halsbereich, im Nacken-, Brust-, Bauch- und Beckenraum. Am häufigsten treten Tumoren in der Nebenniere und im Bauchraum auf.

Betroffen vom Neuroblastom sind hauptsächlich Kinder, bei denen diese Art von Krebserkrankung die dritthäufigste nach den Leukämien und Hirntumoren ist. In Deutschland erkranken jährlich etwa 140 Kinder am Neuroblastom, davon sind 90 % jünger als sechs Jahre alt (Deutsches Kinderkrebsregister). Bei der Hälfte der Patienten finden sich bei Diagnosestellung bereits Metastasen, die bevorzugt in regionalen und entfernten Lymphknoten, im Knochenmark, im Skelett, in der Leber und in der Haut auftreten.

90 % dieser Tumoren weisen eine neuroendokrine Aktivität auf. Sie bilden Katecholamine, deren Ausscheidungsmetaboliten Vanillinmandelsäure und Homovanillinmandelsäure im Harn nachgewiesen werden können. Außerdem kann es aufgrund dieser Stoffe zu Symptomen wie Bluthochdruck, Gereiztheit, Schwitzen, Erröten und Fieber kommen. Die Durchführung eines Früherkennungsprogramms, in dem Kinder auf Ausscheidungsmetaboliten getestet wurden, wurde im Jahre 2001 in Deutschland wieder beendet, da es dadurch zu keiner besseren Überlebensprognose für die Kinder kam. Häufig gab es "Überdiagnosen" und demzufolge eine Überbehandlung der Kinder. Eine Mortalitätssenkung konnte durch das Früherkennungsprogramm nicht festgestellt werden (Schilling et al., 2002).

Ein weiteres häufiges Symptom ist der Gewichtsverlust. Andere Symptome finden sich meist in Abhängigkeit von der Lage des Tumors. So kann z.B. ein Tumor im Bauchraum zu einem Blähbauch, Schmerzen in diesem Bereich, Appetitlosigkeit und zu Problemen

bei Verdauung und Wasserlassen führen, wohingegen ein Tumor im Brustbereich häufiger zu anhaltendem Husten, Schmerzen und Kurzatmigkeit führt. Insgesamt sind die Symptome aber eher unspezifisch, wodurch die Diagnose erschwert wird. Neuroblastom-typische Symptome, bei deren Vorliegen immer diese Art von Krebs ausgeschlossen werden muss, sind eher selten, dazu gehören die Querschnittssymptomatik, therapieresistenter Durchfall, das Horner-Syndrom und das Ataxie-Opsomyoklonus-Syndrom (Tate et al., 2005).

1.1.2 Stadien des Neuroblastoms

Unterschieden werden verschiedene Stadien des Neuroblastoms. Als Stadium 1 wird ein lokalisierter Tumor ohne befallene Lymphknoten bezeichnet, als Stadium 2 ein einseitiger, auch ausgedehnter Tumor mit oder ohne befallene Lymphknoten derselben Seite. Im Stadium 3 handelt es sich entweder um einen einseitigen Tumor mit Befall von Lymphknoten der anderen Seite oder um einen Tumor, der sich auf beide Seiten des Körpers ausgedehnt hat. Im Stadium 4 sind auch entfernte Lymphknoten, Knochen, Knochenmark Leber und / oder andere Organe von Tumorzellen befallen. Eine Sonderstellung kommt dem Stadium 4S zu, wobei es sich um einen lokalisierten Tumor handelt, der in Haut, Leber und / oder Knochenmark metastasiert ist. Dieses Stadium findet man ausschließlich bei Säuglingen im ersten Lebensjahr. Es neigt häufig zur Spontanheilung. Die Ursache dafür ist noch nicht vollständig geklärt. Genetische Ursachen scheinen dabei aber eine Rolle zu spielen (Ambros et al., 1995).

1.1.3 Therapie und Heilungschancen beim Neuroblastom

Die Therapie beim Neuroblastom (außer Stadium 4S) besteht primär in der operativen Resektion des Tumors, meist in Kombination mit Chemotherapie und Bestrahlung. Im Stadium 4 kommt außerdem häufig die Knochenmarkstransplantation zum Einsatz (Matthay et al., 1999).

Insgesamt sind die Überlebensraten stark abhängig vom Alter des Kindes (Spix et al., 2001) und vom Stadium, in dem das Neuroblastom entdeckt wird. So findet sich in den Stadien 1 und 2 insgesamt eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90 %, während Kinder im Stadium 2 nur eine Überlebensrate von 75 % und Kinder im Stadium 4 sogar nur eine 5-Jahres-Überlebensrate von 20-30 % haben (Deutsches Kinderkrebsregister, Überlebenszeitanalysen). Aus diesem Grund werden immer wieder neue Therapieoptionen für Kinder mit Neuroblastom gesucht. Die Immuntherapie gewinnt dabei zunehmend an Bedeutung. Neuroblastomzellen exprimieren kein HLA und können somit nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Für eine NK-Zell-Therapie bieten sich beim Neuroblastom jedoch gute Voraussetzungen (Prigione et al., 2004).

1.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

1.2.1 Herkunft und Morphologie

NK-Zellen gehören mit den T- und B-Zellen zu den Lymphozyten. Sie machen bis zu 15 % der Blutlymphozyten aus. Morphologisch erscheinen NK-Zellen als große granulierende Lymphozyten, weshalb sie auch als LGL (Large granular lymphocyte) bezeichnet worden sind (Timonen et al., 1981).

NK-Zellen unterscheiden sich von den T- und B- Lymphozyten unter anderem durch das Fehlen des T-Zell-Rezeptors. T- Lymphozyten, die im Thymus aus ihren Vorstufen entstehen, tragen den T-Zell-Rezeptor, mit dem sie Fremdartigene gebunden an HLA (Humanes Leukozytenantigen) erkennen und dann entweder als zytotoxische T-Zelle diese befallenen Zellen abtöten oder als T-Helferzelle B-Zellen und Makrophagen aktivieren können. B-Lymphozyten, die sich in der fetalen Leber und im reifen Knochenmark differenzieren, tragen auf ihrer Oberfläche Antikörper (sog. Immunglobuline) vom Typ IgD, mit denen sie freie Antigene binden können und darauf mit einer Antikörperproduktion reagieren.

NK-Zellen, die sich wie die T-Zellen aus einer Thymozytenpopulation entwickeln, reifen außerhalb des Thymus. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Zielzellen, z.B. Tu-

morzellen und auch virusinfizierte Zellen, ohne antigene Aktivierung lysieren zu können, weshalb sie auch zum nicht-adaptiven Immunsystem zählen.

1.2.2 NK-Zellen und HLA

Es werden zwei verschiedene Gruppen von HLA unterschieden: die HLA-I- und die HLA-II-Antigene. HLA-I-Antigene werden von jeder kernhaltigen Zelle des Körpers exprimiert. NK-Zellen können das HLA erkennen und darauf reagieren. 1990 wurde dazu die "missing-self" Hypothese veröffentlicht (Ljunggren und Kärre, 1990). Die "missing-self" Hypothese besagt, dass NK-Zellen „selbst“-HLA erkennen und bevorzugt Zellen töten, die HLA nicht oder nur so abgeändert exprimieren, dass sie nicht als "selbst" erkannt werden können. Dies ist sehr häufig bei virusinfizierten Zellen und Tumorzellen der Fall. Damit agieren NK-Zellen komplementär zu T-Lymphozyten, die für die Erkennung einer Zielzelle HLA-Moleküle benötigen.

Viele Studien belegen eine erhöhte Zytotoxizität durch NK-Zellen, wenn die Zielzellen wenig oder kein HLA-I tragen (Gidlund et al., 1981; Ljunggren und Kärre, 1985; Storkus et al., 1987). Allerdings gibt es auch viele Ergebnisse, die gegen diese Theorie sprechen, wobei NK-Zellen unabhängig von der HLA-Expression der Zielzelle zur Lyse führen (Chervenak und Wolcott, 1988; Leiden et al., 1989; Stam et al., 1989). Dies macht das Vorhandensein weiterer Erkennungsmechanismen wahrscheinlich.

Die HLA-I-Komplexe werden in verschiedene Antigene eingeteilt. Es werden HLA-A, -B, -C, -E und -G unterschieden. In der Interaktion mit NK-Zellen spielt insbesondere das HLA-C eine Rolle (Colonna et al., 1993; Gumperz und Parham, 1995).

NK-Zellen unterscheiden zwei Gruppen der HLA-C-Antigene: eine Gruppe der NK-Zellen (Gruppe 1) erkennt HLA-C-Antigene der Gruppe 1 (HLA-Cw1,-Cw3,-Cw7,-Cw8), die Serin an Position 77 und Asparagin an Position 80 in der Sequenz der schweren Kette tragen, und die andere Gruppe (Gruppe 2) erkennt HLA-C-Moleküle der Gruppe 2 (HLA-Cw2,-Cw4,-Cw5,-Cw6,-Cw15), die Asparagin an Position 77 und Lysin an Position 80 haben (Bianconi et al., 1995). Erkannt werden die verschiedenen Gruppen mit Hilfe der Killer Zelle-Immunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR = killer cell immun-

globulin-like receptors), insbesondere der p58 Familie (Winter und Long, 1997), wobei der CD158a Rezeptor (KIR2DL1) an HLA-C-Antigenen der Gruppe 2 und der CD158b Rezeptor (KIR2DL2 und KIR2DL3) an Antigenen der Gruppe 1 bindet. Dadurch ergibt sich in vitro auch bei NK-Zellen eine Allospezifität, wobei die Zahl der unterscheidbaren Konstellationen aufgrund der oben genannten Möglichkeiten sehr überschaubar ist im Gegensatz zur Allospezifität bei T-Zellen. Folgende Tabelle soll dies verdeutlichen:

		KIR		
		1/1	1/2	2/2
Zielzellen der Gruppe	1/1	-	+	+
	1/2	-	-	-
	2/2	+	+	-

Tab. 1.1: Allospezifität von NK-Zellen

Das Erkennen von Ziel- und "selbst" - Zellen durch NK-Zellen ist abhängig von ihrem KIR und von der HLA-C-Gruppe der Zielzelle, da die NK-Zelle mit ihrem KIR die zwei verschiedenen HLA-C-Gruppen unterscheiden und somit binden kann.

- : Erkennung von „selbst“ -Zellen und damit theoretisch verstärkte Hemmung der Lyse

+: erkennen von „fremd“ -HLA und somit theoretisch verminderte Hemmung oder Stimulation der Lyse

1.2.3 Rezeptoren auf NK-Zellen

Auf NK-Zellen gibt es eine Reihe von verschiedenen Rezeptoren, die die NK-Zellen sowohl aktivieren als auch inhibieren können. Die Expression der einzelnen Rezeptoren ist unterschiedlich, so dass sich verschiedene Subpopulationen von NK-Zellen unterscheiden lassen.

1.2.3.1 CD56

Ein Rezeptor, der von NK-Zellen exprimiert wird, ist das CD56 (Leu19). Dabei handelt es sich um eine Isoform des Neuralen Adhäsionsmoleküls (NCAM = neural cell adhesion molecule) (Lanier et al., 1989), das auch auf vielen anderen Zellen neuronalen Ursprungs vorkommt (Edelmann, 1986), z. B. auf Zellen des Gehirns, neuromuskulären Verbindungen und auf dem Neuroblastom. Besonders am CD56 ist, dass es homophil, d. h. mit sich selbst binden kann. Die Vermutung lag nahe, dass das CD56 eine Rolle bei der NK-Zell-Aktivierung spielt. Hierzu gibt es verschiedene Aussagen: es gibt Ergebnisse, die sowohl eine aktivierende als auch inhibierende Wirkung durch homophile NCAM-Bindung ausschließen (Lanier et al., 1991), und andere, die eine Abnahme der Zytotoxizität von LAK- (lymphokine activated killer-) Zellen beschreiben, wenn CD56 (Leu19) mit Antikörpern blockiert wird (Palucka et al., 1992).

1.2.3.2 CD16

Ein weiteres Oberflächenmolekül der NK-Zellen ist das CD16 Molekül (Fc γ -Rezeptor III). Mit diesem Rezeptor können NK-Zellen auch "antikörperaktiviert" Zellen lysieren. Diese sogenannte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC: antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) wird ausgelöst, indem das CD16 Molekül niedrigaffin am Fc-Teil des Immunglobulin G (IgG) einer opsonierten Zelle bindet und dadurch die NK-Zelle aktiviert wird (Ojo und Wigzell, 1978).

1.2.3.3 KIRs

Die Familie der Killer Zell immunglobulinähnlichen Rezeptoren umfasst Rezeptoren, die meistens HLA Klasse-I Moleküle binden und entweder NK-Zell Zytotoxizität hemmen, z. B. p58 (Moretta et al., 1993) oder NKB1 (Litwin et al., 1994), oder NK-Zellen aktivieren, z. B. p50 (Moretta et al., 1995, Biassoni et al. 1996). Außerdem gibt es Rezeptoren, deren Liganden und Funktionen noch nicht geklärt sind (Vilches et al., 2000). Eine Übersicht über die KIRs soll Tabelle 1.2 geben.

Rezeptor	Ligand	Funktion	Struktur	Ausprägung interindividuell
KIR2DL1-3* CD 158a/b, p58	HLA-C	Inhibition	Ig-ähnlich	dichotom
KIR2DS1-2*	HLA-C	Aktivierung	Ig-ähnlich	dichotom
KIR2DL4	HLA-G?	?		
KIR2DS4 (p50.3)		Aktivierung	Ig-ähnlich	immer
KIR3DL1 ^{&} (NKB1)	HLA-Bw4 Motiv	Inhibition	Ig-ähnlich	dichotom
KIR3DL2	HLA A; -B	Inhibition	Ig-ähnlich	
NKG2-A /CD94	HLA-E	Inhibition	Lektin	dichotom
NKG2 B,C /CD94	HLA-E	Aktivierung	Lektin	dichotom
NKG2-D	MICA/B	Aktivierung	Lektin	immer
2B4 (CD 244)	CD 48	Aktivierung	Ig-ähnlich	immer

Tab. 1.2: Rezeptoren auf NK-Zellen (Auswahl)

In den letzten Jahren ist eine große Zahl von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren entdeckt worden. Strukturell gehören sie entweder zu der Klasse der Immunglobulinähnlichen Moleküle oder besitzen Lektin-Aktivität. Das interindividuelle Verteilungsmuster ist unterschiedlich: manche Rezeptoren sind dichotom verteilt, d.h., einige NK-Zellen eines Individuums tragen den Rezeptor und andere nicht; andere Rezeptoren werden immer oder wieder andere nur bei Aktivierung ausgeprägt.

* Rezeptoren erkennen polymorphe HLA-Allele und kommen somit potentiell als Träger einer Alloreaktivität in Frage & Rezeptor erkennt HLA-Allel mit eingeschränktem Polymorphismus (ca. 78% der Individuen besitzen ein korrespondierendes HLA-Allel) (Frohn, 2003).

1.2.3.4 Lektin-ähnliche Rezeptoren

Auch die Lektin-ähnlichen Rezeptoren binden an HLA Gruppe I Moleküle. Die wohl wichtigsten Vertreter dieser Familie sind das CD94 und das NKG2-Molekül (Lazetic et al., 1996), die auf die NK-Zellen eine inhibierende Wirkung haben (Brooks et al., 1997; Carretero et al., 1997). Eine Übersicht über die Lektin-ähnlichen Rezeptoren gibt oben aufgeführte Tabelle 1.2.

1.2.3.5 NCR (natural cytotoxicity receptor)

Weitere Rezeptoren, die eine positive Wirkung auf NK-Zell-Zytotoxizität haben, sind die NCRs (natural cytotoxicity receptors) (Bottino et al., 2000; Moretta et al., 2000). Die ersten drei Rezeptoren, die identifiziert werden konnten, sind NKp46 (Sivori et al., 1997), NKp30 (Pende et al., 1999) und NKp44 (Vitale et al., 1998), wobei NKp44 nur in durch Interleukin 2 (IL-2) aktivierten NK-Zellen exprimiert wird. Diese Rezeptoren binden HLA-unabhängig, wobei die genauen Liganden allerdings noch unbekannt sind. Ihre Expression auf NK-Zellen variiert, und es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen NCR-Dichte auf der Oberfläche von NK-Zellen und der Fähigkeit der NK-Zellen, verschiedene Tumorzellen zu töten (Moretta et al., 2001).

1.2.3.6 LFA-1 (leucocyte function-associated antigen1)

Das LFA-1 gehört zur Leu-CAM (leucocytic cell adhesion molecule) Familie. Es ist ein Integrin, das sich aus einem Komplex von CD11a und CD18 zusammensetzt. Integrine besitzen Bindungsstellen für Adhäsionsmoleküle, sogenannte ICAMs (intracellular adhesion molecules). LFA-1 bindet das ICAM I (CD 54), dem schon eine Funktion bei der LAK- (lymphokine activated killer) Zell-Aktivierung zugesagt wurde (Naganuma et al. 1991), II (CD 50) und III (CD 102). Somit spielt das LFA-1 eine wichtige Rolle bei der NK-Zell-Funktion (siehe auch 1.2.5).

1.2.3.7 Interleukin 2-Rezeptor

Interleukin 2 (IL-2) ist unter anderem in der Lage, Blutlymphozyten zu einer ausgepräg-

ten anti-Tumor-Aktivität *in-vitro* und im Tiermodell zu stimulieren. NK-Zellen steigern dementsprechend ihre zytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen (Rodella et al., 1998).

1.2.4 Zytokine und NK-Zellen

Zytokin ist ein allgemeiner Begriff für eine große Gruppe von Molekülen, die mit in die Signalübermittlung zwischen Zellen im Verlauf von Immunantworten einbezogen sind. Auch NK-Zellen können verschiedene Zytokine produzieren und damit die Immunantwort regulieren. Ein Zytokin, das NK-Zellen bei Aktivierung bilden, ist das Interferon γ (INF γ) (Handa et al., 1983). Dieses Zytokin hat u. a. eine antivirale Wirkung. Zum einen verstärkt es die HLA-Klasse-I und -II Expression auf Zellen, wodurch die Erkennung von viralen Antigenen durch T-Lymphozyten erleichtert wird. Gemäß der "missing-self"-Hypothese sollte dies zur Hemmung der NK-Zell-Lyse führen.

Zum anderen aktiviert es Zellen, die virusinfizierte Zellen zerstören können, z. B. NK-Zellen und Makrophagen. Außerdem hemmt es direkt die virale Replikation. Weiterhin hat INF γ noch zahlreiche immunmodulatorische Wirkungen.

Andere Zytokine, die von NK-Zellen gebildet werden können, sind der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α), IL-5 (Warren et al., 1995), IL-10 (Mehrotra et al., 1998), IL-13 (Hoshino et al., 1999) und Lymphotoxin β (LT/TNF β).

1.2.5 Wirkungsmechanismen der NK-Zellen

NK-Zellen tragen Granula, die proteolytische Substanzen enthalten. Trifft die NK-Zelle auf eine Zielzelle, so bindet sie mit dem LFA-1 an Adhäsionsmoleküle auf deren Oberfläche (Schmidt et al., 1985). Denkbar als Interaktionspartner wäre hier möglicherweise das CD56, insbesondere beim Neuroblastom (siehe auch 1.2.3.1). Von der NK-Zelle wird nun Perforin freigesetzt, wodurch es zur Porenbildung auf der Zielzelle kommt (Podack, 1995). Durch diese Poren können nun Granzym A und B eindringen. Dabei handelt es sich um Serinproteasen, die in der Zielzelle zur Lyse durch osmotische

Dysregulation führen (Ortaldo und Hirserodt, 1989). Hiernach kommt es zur Abkopplung und Regulation der NK-Zelle. Wird die Zytolyse allerdings über ADCC ausgelöst, so führt dies auch zur Apoptose der aktivierten Effektorzelle, induziert über CD16 (Taga et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit zytotoxisch zu agieren, liegt in der Fähigkeit der NK-Zelle, in der Zielzelle Apoptose (=programmierter Zelltod) auszulösen. Dies geschieht mit Hilfe des FAS-Liganden, der zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört. Die NK-Zelle exprimiert diesen Rezeptor nach Aktivierung auf der Oberfläche und kann damit an CD95 binden, was zur Apoptose der Zielzelle führt (Bossi und Griffiths, 1999).

Zusammenfassend läßt sich also sagen, dass die NK-Zellen mit verschiedenen Mechanismen zur Lyse der Zielzellen führen können.

1.2.6 Vermehrung von NK-Zellen für klinische Applikationen (Expansion)

Bei Versuchen mit NK-Zellen wurden schon viele verschiedene Ansätze verwendet. Die früher sehr häufig verwendeten LAK (lymphokine activated killer) -Zellen sind Lymphozyten, die mit IL-2 stimuliert wurden. Dabei handelt es sich also nicht, wie der Name schon sagt, um eine Reinkultur von NK-Zellen, sondern um ein Lymphozytengemisch. Die Funktion der NK-Zellen konnte dabei nicht genau beobachtet werden. Außerdem wurden NK-Zellen verwendet, die mit $\text{INF}\gamma$ stimuliert worden waren.

Für Laborversuche mit NK-Zell Reinkulturen, mussten NK-Zellen vermehrt werden. Noch größere Mengen als in Laborversuchen werden für klinische Applikationen benötigt, um eine möglichst hohe Konzentration von NK-Zellen im Körper zu erreichen. Als Ausgangspunkt für die Vermehrung von NK-Zellen im klinischen Maßstab kann die NK-Zell-Expansion helfen (Frohn et al., 2002). Die NK-Zellen werden in einem entsprechenden serumhaltigen Medium mit Interleukin 2 und sogenannten „Feederzellen“ inkubiert. Dabei handelt es sich um bestrahlte Zellen, die durch Zell-Zell-Kontakte das Wachstum der gewünschten Zellen ermöglichen. Da sie bestrahlt sind, werden sie apoptotisch und verschwinden mit der Zeit aus der Zellsuspension. Essentielle Komponenten sind, außer den schon erwähnten, die Zytokine IL-2 und IL-15. In den ersten 6

Tagen kommt es zu keiner Zunahme der Zellzahl. Es tritt dann eine exponentielle Vermehrung ein, die etwa an Tag 15 die maximale Zellzahl ergibt. Anschließend werden die Zellen in Kultur allmählich apoptotisch.

Die Reinheit der NK-Zellen ist bedeutend höher als vor der Kultur. Außerdem gelingt es mit diesem Verfahren, zytotoxische NK-Zellen zu vermehren. Für unsere Versuche wurden NK-Zellen verwendet, die auf diese Weise hergestellt wurden. Auch für klinische Versuche ist diese Methode geeignet, da hierbei, wie oben bereits erwähnt, eine große Zahl von NK-Zellen gewonnen und anschließend Patienten infundiert werden kann.

1.2.7 NK-Zellen und das Neuroblastom

Da die Überlebensraten von Kindern mit Neuroblastom Stadium 4 gering sind, wird immer wieder versucht, über verschiedene Ansatzpunkte die Chancen dieser Kinder zu verbessern. Da NK-Zellen schon in der Krebstherapie verwendet werden, sind sie auch für Kinder mit Neuroblastom interessant. Bis heute sind jedoch die genauen Mechanismen der Erkennung von Neuroblastom- und auch anderer Zellarten durch NK-Zellen nicht genau geklärt, obwohl es immer wieder neue Ergebnisse hinsichtlich dieser Frage gibt. Dies erschwert das Einsetzen der NK-Zellen in der Therapie.

Es ist schon lange bekannt, dass NK-Zellen, im Gegensatz zu zytotoxischen T-Lymphozyten, Neuroblastomzellen *in vitro* töten (Main et al., 1985). Auch hat es immer wieder Versuche gegeben, NK-Zellen mit verschiedenen Stoffen (z.B. IL- 2) so zu stimulieren, dass sie weit aggressiver gegen Neuroblastomzellen wirken, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* (Favrot et al., 1989; Berthold et al., 1991; Toren et al., 2000). Dabei hat man festgestellt, dass IL-2 zwar zu einer höheren Zytotoxizität führt, dass die Nebenwirkungen aber sehr hoch sind, wenn es Kindern direkt verabreicht wird.

Neuerdings weiß man, dass das Neuroblastom verschiedene Mechanismen anwendet, um nicht von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen erkannt zu werden. Dabei reguliert das Neuroblastom zum einen die Präsentation von HLA-I Molekülen herunter, zum anderen werden aktivierende Liganden, die an den NKG2D Rezeptor der NK-Zelle binden, vermindert exprimiert (Raffaghello et al., 2005). Auch INF γ wurde immer wie-

der in Studien verwendet, da es zu einer HLA-Induktion führt und somit untersucht werden kann, ob dies die Zellen vor den NK-Zellen schützt. Doch die Ergebnisse sind sehr unterschiedlich, weshalb die erneute Durchführung interessant schien. So kamen Handgretinger et al. in ihrer Studie 1989 zu dem Ergebnis, dass INF γ -Stimulation der Zielzellen zu einer erhöhten Zytotoxizität durch NK-Zellen führt, obwohl aufgrund der "missing-self" Hypothese ein anderes Ergebnis zu erwarten gewesen wäre. Insgesamt ist das genaue Verständnis der NK-Zellen für Kinder mit einem Neuroblastom und auch für Patienten mit anderen malignen Tumoren wichtig, um die NK-Zell-Therapie besser möglich zu machen. Für eine klinische Verwendung von NK-Zellen ist zuvor die Gewinnung großer Mengen von NK-Zellen erforderlich. Dies ist jedoch mit Hilfe der Expansion (siehe Punkt 1.2.6) bereits möglich.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte darauf eingegangen werden, in welchem Maße Neuroblastomzellen von NK-Zellen lysiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, welche Rolle einzelne Oberflächenmoleküle bei der Erkennung durch NK-Zellen spielen und wie sie zur Auslösung der Zytolyse von Zielzellen beitragen. Dadurch sollte ein besseres Verständnis der Funktionsweisen von NK-Zellen erreicht werden, immer im Hinblick auf eine mögliche klinische Verwendung von NK-Zellen bei Patienten mit Neuroblastom und anderen Tumoren. Im Einzelnen wurden dabei untersucht:

- die Rolle des HLA-I-Rezeptors und somit die Theorie der „missing-self“ Hypothese,
 - der Einfluss weiterer Oberflächenmoleküle (ICAM-1, CD56) auf die Zytolyse und
 - die mögliche HLA-C-Gruppenspezifität von NK-Zellen, die sowohl für die Tumorthherapie als auch die Transplantationsmedizin von Bedeutung wäre.
-

2. MATERIAL

2.1 Geräte

Brutschrank	(Labotect, Göttingen)
Durchflusszytometer Epics XL	(Coulter Electronics GmbH, Krefeld)
Gefriertruhe -80°C	(Nuair, Plymouth, MN / USA)
Heissluftsterilisator 2712	(Kottermann, Uetze-Hänigsen)
Mikrozentrifuge	(Heraeus Christ, Osterode)
Multipette	(Eppendorf, Hamburg)
Pipetus-Akku	(Hirschmann Laborgeräte, Nürtingen)
Spektralphotometer U-3000	(Hitachi, Bremen)
Sterile Werkbank II, AI B3	(Nuair, Plymouth, MN / USA)
Stickstofftank	(Messer Griesheim, Mundersbach / Sieg)
Super Macs	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Thermocycler 9700	(Perkin-Elmer, Überlingen)
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS	(Heraeus Christ, Osterode)

2.2 Laborbedarf

Drei-Wege-Hahn	(Braun, Heidelberg)
Gewebekulturflaschen, beschichtet, 50 und 260 ml	(Nunc, Roskilde, DK)
Kanülen 0,5 x 25, Nr. 18	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluss, 15 und 50 ml	(Sarstedt, Nürnbrecht)
Latex-Einmalhandschuhe	(Ansell, München)
24-Loch-Platte	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Pipettenspitzen, 1-10 µl, kristall	(Greiner, Nürtingen)

Pipettenspitzen, 10-100 μ l, gelb	(Greiner, Nürtingen)
Pipettenspitzen, 100-1000 μ l, blau	(Greiner, Nürtingen)
Pipettenspitzen, Sterilfilter-Tips 0,5-10 μ l	(Biozym Diagnostik, Oldendorf)
Pipettenspitzen, Sterilfilter-Tips 10-100 μ l	(Biozym Diagnostik, Oldendorf)
Pipettenspitzen, Sterilfilter-Tips 200-1000 μ l	(Biozym Diagnostik, Oldendorf)
Perfusorspritze (klein)	(Braun, Heidelberg)
Reaktionsgefäße 2 ml	(Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 1,5 ml	(Sarstedt, Nürmbrecht)
Röhrchen, 10 und 50 ml	(Sarstedt, Nürmbrecht)
Stangenpipetten, steril 5, 10 und 25 ml	(Greiner, Nürtingen)

2.3 Reagenzien, Chemikalien

7-AAD	(Sigma, Deisenhofen)
Agarose	(Amersham Biosciences, Freiburg)
β -Mercapto-Ethanol	(Sigma, Deisenhofen)
Borsäure	(Merck, Darmstadt)
Bromphenolblau	(Sigma, Deisenhofen)
D275	(Sigma, Deisenhofen)
DMSO	(Merck, Darmstadt)
DNA-Treppe (123 bp)	(Invitrogen, Karlsruhe)
dNTPs	(Promega, Mannheim)
EDTA	(Merck, Darmstadt)
Ethanol	(Merck, Darmstadt)
Ethidiumbromid	(Biorad, München)
MgCl ₂	(Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
PBS	(PAA, Pasching)
Phytohemagglutinin (PHA)	(Murex, Dartford, UK)
10x Taq Puffer	(Perkin Elmer, Vaterstetten)
Tris	(Merck, Darmstadt)

Trypsin / EDTA	(BioWhittaker, Heidelberg)
Xylencyanol	(Sigma, Deisenhofen)

2.4 Zellkulturen

Alle Neuroblastom-Zellkulturen wurden freundlichst überlassen von Prof. Dr. F. Berthold, Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Universität zu Köln. Ursprüngliche Herkunft: DSMZ, Braunschweig

SKNMC	(Neuroblastom)	DSMZ, Braunschweig
Kelly	(Neuroblastom)	DSMZ, Braunschweig
SHSY5Y	(Neuroblastom)	DSMZ, Braunschweig
IMR32	(Neuroblastom)	DSMZ, Braunschweig
IMR5	(Neuroblastom)	DSMZ, Braunschweig
K562	(Chronisch myeloische Leukämie)	DSMZ, Braunschweig
NK-Zellen	(Natürliche Killerzellen)	(Eigenisolation aus Blutspenden)

2.5 Zellkultur-Reagenzien, -Medien und -Zusätze

Aqua ad injectabile, 10 ml-Ampullen	(Braun, Heidelberg)
Concanavalin A	(Sigma, Deisenhofen)
Fetales Kälberserum, FCS	(Life Technologies, Berlin)
Ficoll	(Seromed Biochrom, Berlin)
IFN- γ	(Strathmann Biotec AG, Hannover)
IL-15	(Strathmann Biotec AG, Hannover)
IL-2	(Strathmann Biotec AG, Hannover)
Ionomycin	(Sigma, Deisenhofen)
Kulturmedium RPMI 1640	(Seromed Biochrom, Berlin)

Kulturmedium HAM's F-12	(BioWhittaker, Heidelberg)
Kulturmedium IMDM	(BioWhittaker, Heidelberg)
Kulturmedium DMEM	(BioWhittaker, Heidelberg)
Kulturmedium X-vivo 20	(BioWhittaker, Heidelberg)
L-Glutamin 200 mM	(Seromed Biochrom, Berlin)
NEAA 100x	(BioWhittaker, Heidelberg)
Penicillin-Streptomycin	(PAA, Pasching)

2.6 Antikörper

HLA-ABC	B9.12.1 (Mouse IgG _{2a})	(Immunotech, Marseille)
HLA-ABC	G46-2.6 (Mouse IgG ₁)	(BD PharMingen, San Diego)
HLA-ABC-FITC	G46-2.6 (Mouse IgG ₁)	(BD PharMingen, San Diego)
CD56	B159 (Mouse IgG ₁)	(BD PharMingen, San Diego)
CD56-PE	B159 (Mouse IgG ₁)	(BD PharMingen, San Diego)
CD54 (Leu-54)-PE	LB-2 (Mouse IgG _{2b})	(Bekton Dickinson, San Jose)
CD3-FITC	HIT3A (Mouse IgG _{2a})	(BD PharMingen, San Diego)
CD16-PC5	3G8 (Mouse IgG ₁)	(Beckman Coulter, Krefeld)

2.7 Enzyme und Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL, Berlin synthetisiert.

Primer MGSO: 5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC

Primer GPO-1: 5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A

HLA-C_w Primer: common vorwärts: CGC GGC GAG TCC RAG AGG

Gruppe 1 rückwärts: GTT GTA GTA GCC GCG CAG G

Gruppe 2 rückwärts: GTT GTA GTA GCC GCG CAG T

Amplitaq Gold Polymerase	(Perkin Elmer, Vaterstetten)
Taq Polymerase	(Perkin Elmer, Vaterstetten)

2.8 Isolierungskits

(Die Bestandteile der Kits sind nicht im Einzelnen aufgeführt.)

NK-Zell-Isolationskit	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
DNA-Quiagen-Blood-Kit	(Quiagen, Hilden)

2.9 Lösungen / Puffer

10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer):	89 mM Tris
	89 mM Borsäure
	2 mM EDTA
6 x Gel-Lade-Puffer:	15 % Ficoll Typ 400
	0,05 % Bromphenolblau
	0,05 % Xylencyanol

3. METHODEN

3.1 Einzelschritte der Methodik

Bevor die Methoden beschrieben werden, erfolgt ein kurzer Überblick über die einzelnen Schritte:

- Zellkulturen der Neuroblastom-Zelllinien
- Präparation der NK-Zellen
- Vorbereitung der Zytotoxizitätstests
- Zytotoxizitätstests
- Quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen
- Polymerase-Kettenreaktion

3.2 Zellkulturen

Für die Versuche wurden die Neuroblastomzellen SKNMC, Kelly, IMR32, IMR5 und SHSY5Y verwendet. Als Kontrolle wurde K562 verwendet. Die Angaben zu den Zelllinien stammen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

Die Zellen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht (siehe auch 3.7.4). Bei einem positiven Ergebnis wurden die Zellen nicht für die Versuche verwendet.

3.2.1 SKNMC

Diese Zelllinie wurde 1971 aus einer supraorbitalen Metastase des Neuroblastoms eines Mädchens isoliert. Die Zellen wachsen adhärent und bilden Monolayer. Als Medium wurde 90 % IMDM-Medium + 10 % FCS (fetales Kälberserum) + 2 mM L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin + 100 µl NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren) ver-

wendet. Die Verdopplungszeit dieser Zellen beträgt etwa 48 Stunden, daher wurde die Kultur alle 3-5 Tage gesplittet. Dafür wurden die Zellen mittels Trypsin / EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂-Begasung.

3.2.2 Kelly

Diese Zelllinie wurde von einem Patienten mit Neuroblastom isoliert. Die Zellen wachsen adhärent und bilden Multilayer. Als Medium wurde 90 % RPMI 1640 + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin + 100 µl NEAA verwendet. Die Verdopplungszeit beträgt 30-40 Stunden, daher wurde die Kultur alle 3-5 Tage gesplittet. Dafür wurden die Zellen mittels Trypsin / EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂-Begasung.

3.2.3 IMR32

Diese Zelllinie wurde aus einem Neuroblastom eines einjährigen kaukasischen Jungen 1967 isoliert. Die Zellen wachsen adhärent und bilden Monolayer. Als Medium wurde 90 % RPMI 1640 + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin + 100 µl NEAA verwendet. Die Verdopplungszeit dieser Zellen beträgt etwa 40-50 Stunden, daher wurde die Kultur alle 3-5 Tage gesplittet, ohne die Anwendung von Trypsin. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂-Begasung.

3.2.4 IMR5

Auch diese Zelllinie stammt von einem Neuroblastom eines kaukasischen Patienten. Die Zellen bilden Monolayer. Als Medium wurde 90 % RPMI 1640 + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin + 100 µl NEAA verwendet. Die Kultur wurde

alle 3-5 Tage gesplittet, ohne die Anwendung von Trypsin. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂-Begasung.

3.2.5 SHSY5Y

Diese Zelllinie wurde entwickelt aus SK-N-SH, einer Neuroblastometastase des Knochenmarks eines vier Jahre alten kaukasischen Mädchens. Die Zellen bilden Monolayer, sie ähneln morphologisch Epithel. Als Medium wurden DMEM + HAM's F-12 1:1 gemischt. 90 % wurden dann mit 10 % FCS + 1% Penicillin-Streptomycin + 2 mM L-Glutamin vermischt. Alle 3-5 Tage wurden die Zellen gesplittet, ohne die Anwendung von Trypsin. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂-Begasung.

3.2.6 K562

K562 wurde als Kontroll-Zelllinie verwendet. Diese Zellen sind bekannt dafür, sehr sensibel auf NK-Zellen zu reagieren, weshalb sie sehr häufig im Zusammenhang mit NK-Zell-Versuchen verwendet werden. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Lymphoblasten einer chronisch myeloischen Leukämie.

Als Medium wurden 90 % RPMI + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin gemischt. Etwa alle 3-4 Tage wurden die Zellen gesplittet. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂-Begasung.

3.2.7 Einfrieren von Zellen

Um im Bedarfsfall Zellen zur Verfügung zu haben, wurden von den wachsenden Zellen mehrere Proben zur Sicherheit eingefroren. Dazu wurde ein Einfriermedium benötigt, das aus 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in FCS bestand.

- Zellen ernten und Zellzahl bestimmen
- erforderliche Anzahl Kryotubes auf Eis stellen (10^6 Zellen / Kryotube)
- gewünschte Zellzahl abzentrifugieren (10 Minuten bei 300 g)
- 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium aufnehmen und in Kryotubes füllen
- Kryotubes in Zellstoff einwickeln und bei -80°C einfrieren (für mind. 24 h, aber max. 1 Woche)
- dann in flüssigen Stickstoff überführen.

3.2.8 Auftauen von Zellen

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu bringen, wurde wie folgt vorgegangen:

- Kryotube mit Zellen aus dem Stickstoffbehälter nehmen
- Zellen möglichst schnell auftauen (in der Hand oder in einem 37°C Wasserbad erwärmen, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen zu sehen ist)
- Zellen dann in eine Zellkulturflasche geben und mit vorbereitetem Medium (37°C) füttern
- Medium am nächsten Tag wechseln, um DMSO (von den eingefrorenen Zellen) zu beseitigen, evtl. waschen
- Wachstum der Zellkultur kontrollieren.

3.3 Präparation der NK-Zellen

Bei den in den Versuchen verwendeten NK-Zellen handelt es sich um expandierte NK-Zellen. Die Herstellung wird in den folgenden Punkten kurz beschrieben. Dabei wurde Bezug genommen auf die Veröffentlichung von Luhm et al., 2002.

3.3.1 Zellisolierung

Die NK-Zellen wurden aus dem Buffy-coat (weiße Blutzellen und restliche Erythrozyten) von gesunden Blutspendern isoliert. Zur Isolierung der PBMCs (Monozyten und Lymphozyten) wird ein Buffy-coat über Ficoll geschichtet. Durch isopyknische Zentrifugation werden die PBMCs von den anderen Zellen getrennt und einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Dann werden 60 μ l biotinierte Antikörper zugegeben, die an Monozyten, B- und T-Zellen binden, und die Mischung wird für 15 Minuten auf den Rüttler gestellt. Anschließend werden 120 μ l Anti-Biotin-Microbeads, mit ferromagnetischen Partikeln beladene Antikörper, welche wiederum das Biotin binden, zugefügt und das ganze noch einmal für 20 Minuten auf den Rüttler gestellt. Die Proben werden mit MACS-Puffer gewaschen und über die CS-Säule aufgetrennt. Ein magnetisches Feld wird angelegt, wodurch die markierten Zellen magnetisch werden und in der Säule hängen bleiben. Im Eluat befinden sich dann die isolierten NK-Zellen (negative Selektion).

3.3.2 Feederzellen

PBMCs (siehe Isolierung) werden in der Zellkonzentration von 1×10^6 / ml in X-Vivo 20 Medium + 10 % FCS + 300 U / ml IL-2 + 10 μ g / ml Concanavalin A für 3-5 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal gewaschen und mit 70 Gray bestrahlt, um sie teilungsunfähig zu machen.

3.3.3 NK-Zell-Expansion

1×10^6 / ml NK Zellen werden mit 2×10^6 / ml Feederzellen in X-Vivo 20 Medium + 100 U / ml IL-2 + 10 U / ml IL-15 + 100 μ g / ml Phytohemagglutinin (PHA) und für 24 Stunden mit 1 μ mol / ml Ionomycin inkubiert. Nach 5 Tagen Kultivierung wird die Zellzahl bestimmt und eine Reinheitsmessung mit CD56-PE, CD3-FITC und CD16-PC5 am Durchflusszytometer durchgeführt.

Für einige Experimente wurde eine Co-Kultur mit Neuroblastom- als Feederzellen und NK-Zellen angelegt.

3.3.4 Färbung der NK-Zellen mit D275

Um die NK-Zellen in den späteren Versuchen von den Neuroblastomzellen unterscheiden zu können, wurden die NK-Zellen mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff 3,3' Dioctadecylcarbocyanin (D275) angefärbt, wohingegen die Zielzellen anhand von Oberflächenmarkern erkannt werden konnten.

Bei D275 handelt es sich um einen sehr lipophilen Carbocyaninfarbstoff, der nur in Dimethylsulfoxid (DMSO) löslich ist.

Die Färbung wurde nach Kroesen et al., 1992, wie folgt durchgeführt:

- D275-Stammlösung von 2,0 mg / ml DMSO herstellen
- Zentrifugation der NK-Zellen bei 300 g, 20°C über 10 Minuten
- Zellpellet in D275-Medium (10 µg D275 / ml RPMI-Medium) resuspendieren (Zellkonzentration 10⁶ Zellen / ml)
- Inkubation bei 37°C über 1 Stunde
- erneute Zentrifugation (300 g, 20°C, 10 Minuten)
- anschließend die NK-Zellen 3-4 Mal mit RPMI-Medium waschen, um die Reste des D275-Farbstoffes zu entfernen
- Zellkonzentration auf 10⁶ Zellen / ml einstellen.

Schon in früheren Versuchen stellte sich heraus, dass eine "Übernachtfärbung", wie sie von Kroesen et al., 1992 durchgeführt wurde, zu hohen Vitalitätsverlusten bei den NK-Zellen führt. Eine Färbedauer von einer Stunde hingegen führt zu einer guten Anfärbung der NK-Zellen bei gleichzeitigem Erhalt der Vitalität.

3.4 Vorbereitung der Zytotoxizitätstests

3.4.1 Co-Kultur von Effektor- und Targetzellen

Für die folgenden Zytotoxizitätstests (3.5), in denen jeweils gemessen wurde, ob und wie stark NK-Zellen Neuroblastomzellen töten, wurden die Neuroblastomzellen in unterschiedlichen Verhältnissen mit den NK-Zellen vermischt. Die Zelllinien wurden dafür zunächst aus den Kulturflaschen gelöst, evt. unter der Zuhilfenahme von Trypsin. Dann wurden die Zellen in 2 ml RPMI aufgenommen, um zum einen die Vitalität und zum anderen die Zellzahl bestimmen zu können. Hierzu wurden 100 μ l Probe mit 100 μ l Flowcountbeads und 500 μ l PBS vermischt und eine FACS Messung durchgeführt. Bei zu geringer Vitalität wurden die Zellen ficolliert, d. h., tote Zellen wurden von vitalen getrennt. Dazu wurden die Zellen im Medium ganz langsam auf etwa 5 ml Ficoll geschichtet, so dass sich die beiden Phasen nicht vermischen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 300 g über 20 Minuten. Nun konnten die vitalen Zellen, die sich zwischen den Phasen als eine Art "Teppich" darstellten, mit einer Pipette abgesaugt werden. An diesen Arbeitsschritt schloss sich wiederum oben beschriebene Messung an. War die Vitalität der Zellen gut, wurden sie auf eine Konzentration von 10^6 Zellen / ml eingestellt.

Nun wurden die Neuroblastomzellen mit den gefärbten NK-Zellen (10^6 Zellen / ml) auf einer 24 Loch-Platte in den Target / Effektor-Verhältnissen 1:1, 1:5 und bei einigen Versuchen 1:10 wie folgt aufgetragen und mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette gut durchmischt:

- bei einer Konzentration von 1:1 jeweils 500 μ l des Neuroblastom- und des NK-Zell-Gemischs,
 - bei einer Konzentration von 1:5 200 μ l Neuroblastom- und 800 μ l NK-Zell-Gemisch,
 - bei einer Konzentration von 1:10 100 μ l Neuroblastom- und 900 μ l NK-Zell-Gemisch.
 - Außerdem wurde jeweils eine reine Neuroblastomzellprobe als Kontrolle aufgetragen.
-

Als weitere Kontrolle der Aktivität der Effektorzellen wurde bei jedem Versuch die NK-Zell sensible Zelllinie K562 mit NK-Zellen inkubiert.

Die Loch-Platte mit den Zellgemischen wurde dann für drei Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.4.2 INF γ -Stimulation der Neuroblastomzellen

Für einige Versuche wurden die Neuroblastomzellen mit INF γ stimuliert, bevor sie mit NK-Zellen vermischt wurden, um eine HLA-Induktion auf ihrer Oberfläche auszulösen. Dazu wurden die Zelllinien mit 1000 U / ml INF γ über 24 Stunden stimuliert. Die Stimulation mit höheren Konzentrationen von INF γ führte zu keiner stärkeren Expression von HLA-Molekülen auf den Zellen. Danach wurden die Zellen gewaschen, damit das INF γ keinen Einfluss auf die NK-Zellen haben konnte. Weiterhin wurde so verfahren, wie es in Punkt 3.4.1 beschrieben wurde.

3.4.3 HLA-Blockierung der mit INF γ -stimulierten Neuroblastomzellen

Um die Versuche, die mit INF γ -stimulierten Neuroblastomzellen durchgeführt wurden, zu verifizieren bzw. um zu beweisen, dass die Effekte, die zu beobachten waren, wirklich den induzierten HLA-Molekülen zuzuschreiben sind, wurde ein Gegenversuch durchgeführt. Hierbei wurden die durch INF γ induzierten HLA-Moleküle mit HLA-Antikörpern blockiert, um zu testen, ob der Effekt, der durch INF γ ausgelöst wurde, wieder rückgängig zu machen ist.

Dazu wurden die Neuroblastomzellen, wie in 3.4.2 beschrieben, vorbereitet. Doch bevor sie mit den NK-Zellen auf die Loch-Platte aufgetragen wurden, wurden sie folgendermaßen bearbeitet:

- benötigte Zellzahl von INF γ -stimulierten Neuroblastomzellen abnehmen
 - abzentrifugieren bei 300 g, 20 °C, 10 Minuten
 - auf das Zellpellet 5 μ g / 10⁶ Zellen HLA-ABC-Antikörper geben und gut mischen
-

- Inkubation: 30 Minuten im Brutschrank
- in RPMI Medium aufnehmen (10^6 Zellen / ml) und auf eine 24-Loch-Platte in den Konzentrationen 1:1 und 1:5 wie oben beschrieben auftragen (ohne zu waschen).

3.4.4 Blockierung der CD56-Rezeptoren

Um den Einfluss von CD56 auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zu testen, wurden Versuche durchgeführt, in denen das CD56 sowohl auf Neuroblastom- als auch auf NK-Zellen blockiert wurde.

Dazu wurden die Neuroblastomzellen zunächst so behandelt, wie es in Punkt 3.4.1 beschrieben worden ist. Bevor sie jedoch auf die 24-Loch Platte aufgetragen wurden, erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern. Auch die NK-Zellen wurden entsprechend weiterbehandelt, nachdem sie, wie in 3.3.4 beschrieben, gefärbt worden waren.

Die Arbeitsschritte waren wie folgt:

- benötigte Zellzahl von Neuroblastom- und NK-Zellen abnehmen
- abzentrifugieren bei 300 g, 20 °C, 10 Minuten
- auf das Zellpellet $5 \mu\text{g} / 10^6$ Zellen CD56 - Antikörper geben und mit der Pipette gut durchmischen
- Inkubation: 30 Minuten im Brutschrank
- in RPMI Medium aufnehmen (10^6 Zellen / ml) und auf eine 24-Loch-Platte in den Konzentrationen 1:1 und 1:5 wie oben beschrieben auftragen (ohne zu waschen), dann Durchführung eines Zytotoxizitätstests.

3.5 Zytotoxizitätstests

3.5.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Zytotoxizitätstests wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers durchgeführt. Dabei werden die Zellen eingesaugt und dann in einem Durchflusskanal so hintereinander aufgereiht, dass sie einzeln in eine Messkammer gelangen, in der sie von einem

Laserstrahl getroffen werden. Dabei sorgt der sog. Hüllstrom durch seine hohe Fließgeschwindigkeit dafür, dass die Zellen im Fokus des Laserstrahls gemessen werden. Bei diesem Vorgang entsteht Streulicht, das bei 180° (FCS = forward light scatter) und bei 90° (SSC = sideward light scatter) gemessen wird. Dieses gestreute Licht ist abhängig von Größe (FCS) und Granularität (SSC) der Zellen und übermittelt somit unterschiedliche elektrische Impulse. Dadurch lassen sich die verschiedenen Zellarten aufgrund ihrer Zellmorphologie mit dem Durchflusszytometer unterscheiden.

Außerdem kann die Verwendung von fluoreszierenden Antikörpern zusätzlich bei der Abgrenzung zwischen den Zellen helfen, da es hierbei zu einer Fluoreszenzemission kommt, die wiederum gemessen werden kann. Wenn mehrere Antikörper zur Markierung verwendet werden, so müssen sie sich in ihrem Fluoreszenzspektrum unterscheiden. Dabei können z.B. FITC (Floresceinisothiocyanat)-, PE (Phycoerythrin)- und PC5 (Phycoerythrin-Cyanin 5)-Antikörper verwendet werden.

In der folgenden Graphik wird der Ablauf einer Messung mit einem Durchflusszytometer kurz skizziert:

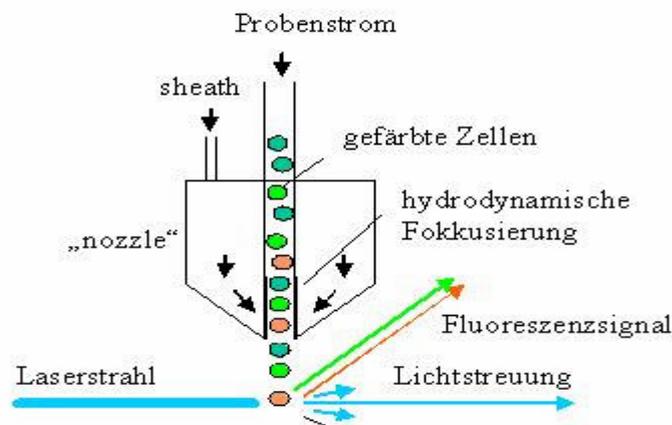


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer Messung von markierten Zellen mit dem Durchflusszytometer. Die Probe wird eingesaugt, die Zellen werden hintereinander aufgereiht (hydrodynamische Fokussierung) und jede einzelne wird von einem Laserstrahl getroffen. Dabei entsteht eine bestimmte Art von Lichtstreuung, die wiederum gemessen werden kann. (Graphik aus: <http://www.mta-labor.info/fachbereiche/molbio/methoden/facs/index.php>)

3.5.2 Zweifarbfluoreszenzzytotoxizitätsmessung

Bei den durchgeführten Versuchen wurden, wie schon erwähnt, NK-Zellen mit Neuroblastomzellen vermischt, d. h., die Messungen erfolgten mit einer heterogenen Zellsuspension. Wie bei Höppner et al., 2002 beschrieben, bietet die Durchflusszytometrie bei Zytotoxizitätstests eine gute Alternative zu den weit verbreiteten $^{51}\text{Chromium}$ release assays. Um nun die Zytotoxizität von NK- gegen die Neuroblastomzellen messen zu können, mussten die Zellen im Durchflusszytometer gut zu unterscheiden sein. Wie schon in Punkt 3.5.1 beschrieben, erlaubt das FACS-Gerät eine Unterscheidung aufgrund der Zellmorphologie. Um aber eine exakte Abgrenzung zu erreichen, wurden zusätzlich Farbstoffe eingesetzt. Dabei wurde zum einen die Färbung der NK-Zellen mit D275 verwendet, um die NK-Zellen von den Neuroblastomzellen abzugrenzen.

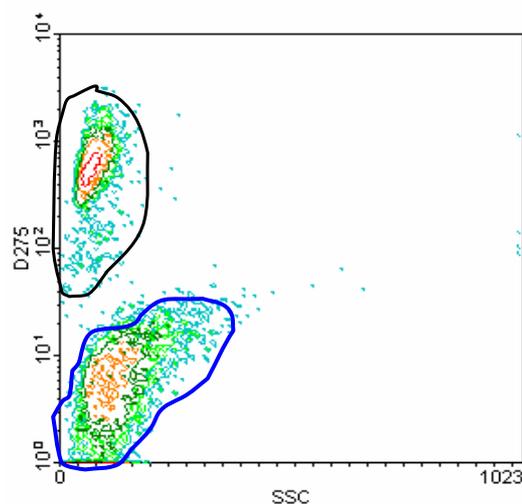


Abb. 3.2: Darstellung von NK-Zellen (schwarz umrandet) und SHSY5Y (blau umrandet). Durch die vorherige Anfärbung der NK-Zellen mit D275 ist eine Unterscheidung der Zellen bei der Messung mit dem Durchflusszytometer möglich. Die Farbunterschiede verdeutlichen eine erhöhte Zellzahl in diesem Messbereich (von blau (= wenig) über hellgrün, dunkelgrün bis rot (= viele Zellen)).

Zum anderen war es wichtig, tote von vitalen Zellen unterscheiden zu können, da eine Aussage zur Zytotoxizität gemacht werden sollte. Dies geschah mit Hilfe des DNA-Farbstoffs 7-Amino-Actinomycin (7-AAD). Dabei handelt es sich um einen Guanin-Cytosin-spezifischen DNA-Interkalator, der aufgrund seiner Molekülgröße nur die Zellmembran toter Zellen durchdringen kann (Schmidt et al., 1992). Das 7-AAD bildet mit der DNA einen stabilen Komplex. Hierbei ist es wichtig, die Messung nicht zu spät durchzuführen, da das 7-AAD nur DNA anfärben kann, wenn diese noch vorhanden ist. In toten Zellen zersetzt sich die DNA nach einiger Zeit. Wenn eine Messung demnach zu spät durchgeführt wird, kann dies zu falschen Ergebnissen mit zu niedriger Zahl von gemessenen toten Zellen führen, da einige der abgestorbenen Zellen nicht mehr in die Messung miteinbezogen werden.

Die Messungen erfolgten zunächst direkt nach Herstellung der Co-Kulturen (siehe auch 3.4.1), um einen Null-Stundenwert zu erhalten. Außerdem dienten die Messungen als Kontrolle für das richtige Effektor / Target-Mischungsverhältnis.

Messung:

- 100 μ l Probe mit 5 μ l 7-AAD in ein FACS-Messröhrchen geben und kurz vortexen
- etwa 5 Minuten einwirken lassen
- ca. 500 μ l PBS dazugeben und kurz vortexen
- Messung durchführen.

In unseren Zytotoxizitätstests wurden die Folgemessungen nach drei Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Eine Beispielmessung ist nachfolgend dargestellt:

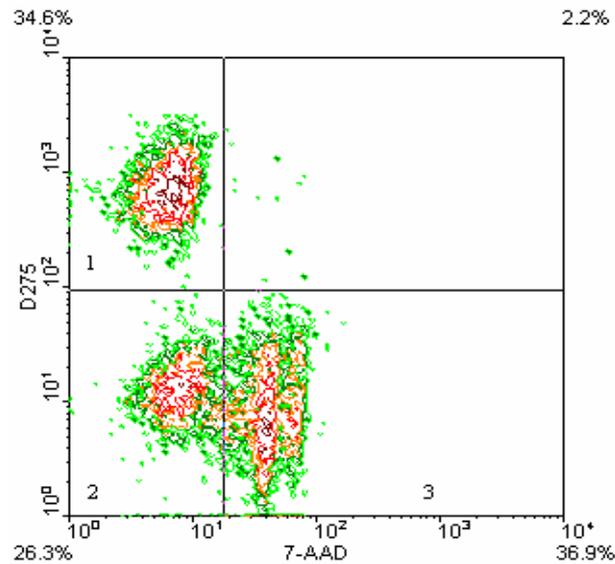


Abb. 3.3: Darstellung einer Messung mit dem Durchflusszytometer von NK-Zellen und IMR5 im Verhältnis 1:1 nach 3 Stunden Inkubationszeit. Gemessen wird die Fluoreszenz von D275 (y-Achse) und 7-AAD (x-Achse) nach vorheriger Anfärbung der NK-Zellen mit D275 und Mischung der Zellen mit 7-AAD, um eine Aussage über die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber von Neuroblastomzellen machen zu können. Feld 1: lebendige NK-Zellen. Feld 2: lebendige Neuroblastomzellen. Feld 3: tote Neuroblastomzellen.

Die Zytolyse der Neuroblastomzellen errechnete sich wie folgt:

tote Neuroblastomzellen in %_{Ansatz 3h} - tote Neuroblastomzellen in %_{Kontrolle 3h} = % Zytolyse

3.5.3 Darstellung der Messdaten

Wie schon in Punkt 3.5.1 erwähnt, werden durch die Zellen im Durchflusszytometer unterschiedliche elektrische Impulse weitergeleitet. Diese können in ein- oder zwei-parametrischen Histogrammen dargestellt werden, wobei das SSC gegen das FSC

aufgetragen wird. Um dort dargestellte Zellgruppen genauer untersuchen zu können, erfolgt die Eingrenzung in Auswertungsfenstern, sog. Gates. Die in solchen Fenstern eingeschlossenen Zellen werden nun ihrerseits in eigenen Histogrammen dargestellt, wodurch eine Untersuchung von vielen Untergruppen auf bestimmte Merkmale möglich wird. So war es auch bei unseren Versuchen möglich, eine Aussage über die Vitalität der Neuroblastomzellen zu machen, ohne dass die NK-Zellen das Ergebnis verfälschen. Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, in ein Fenster eingeschlossen und in einem separaten Count / 7-AAD-Histogramm dargestellt.

3.5.4 Statistik

Alle Daten der Zytotoxizitätstests wurden mit dem Programm SPSS ausgewertet. Es wurde der Wilcoxentest verwendet, um die Daten auf Signifikanzen zu prüfen.

3.6 Quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen

3.6.1 Bestimmung der HLA- bzw. ICAM-1-Expression

Um zu überprüfen, welchen Einfluss das INF γ auf die Neuroblastomzellen hatte, wurden die Zellen sowohl vor, als auch nach der Behandlung mit INF γ quantitativ auf HLA-Moleküle untersucht. Im späteren Verlauf wurde auch das ICAM-1 getestet, da die Ergebnisse nach INF γ -Stimulation uneinheitlich und so andere durch INF γ ausgelöste Mechanismen wahrscheinlich waren. Auch dies geschah mit Hilfe des Durchflusszytometers, wobei die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen HLA-ABC und CD54 versetzt wurden. Gemessen wurde dann die Fluoreszenz dieses Antikörpers (siehe auch 3.5.1) als Maß für die Präsentation von HLA- und ICAM-1-Rezeptoren auf der Oberfläche der Neuroblastomzellen. Dies wurde wie folgt durchgeführt:

- Abnahme von jeweils 100 μ l Probe der unstimulierten und mit INF γ -stimulierten Zellen (Konzentration: 10^6 Zellen / ml) in ein Probengefäß

- jeweils 20 μl HLA-ABC-FITC- und CD54-PE-Antikörper dazugeben und mit der Pipette gut durchmischen
- Inkubation: 15 Minuten
- dann die Proben mit PBS auffüllen und abzentrifugieren (3 Minuten, 3000 rpm), um den nicht gebundenen Antikörper auszuwaschen
- Zellpellet mit 500 μl PBS aufnehmen und in ein FACS-Messröhrchen geben
- FACS-Messung durchführen.

Dieser Versuch (nur mit HLA-ABC-FITC-Antikörpern) wurde später auch mit den Zellen durchgeführt, die zunächst mit INF γ stimuliert, dann aber mit HLA-Antikörpern versehen wurden (siehe 3.4.3). Dies sollte einen Hinweis darauf geben, ob die Blockierung der HLA-Moleküle wieder zu einem Rückgang der freien HLA-Moleküle auf den Zellen führt.

3.6.2 Bestimmung der CD56-Expression auf Effektor- und Targetzellen

Bei den Versuchen, die die Rolle von CD56 bei der Erkennung von Targetzellen durch NK-Zellen untersuchen sollten (siehe auch 3.4.4), war es von Interesse, den Effekt der CD56 - Antikörper sowohl auf Neuroblastom- als auch auf NK-Zellen zu testen. Durch die Antikörper musste die Zahl der freien CD56-Moleküle deutlich herabgesetzt werden, damit in den Zytotoxizitätstests eine Aussage über ihre Funktion möglich war. Deshalb wurde hier wie folgt überprüft, ob die Blockierung der CD56-Rezeptoren mit Antikörpern auch zu der gewünschten Abnahme der freien CD56-Moleküle führte:

- Abnahme von jeweils 100 μl Probe der unbehandelten und mit CD56-Antikörpern blockierten Neuroblastom- und NK-Zellen (Konzentration: 10^6 Zellen / ml) in ein Probengefäß
 - jeweils 10 μl CD56-PC5-Antikörper dazugeben und mit der Pipette gut durchmischen
 - Inkubation: 15 Minuten
-

- dann die Proben mit PBS auffüllen und abzentrifugieren (2 Minuten, 4000 rpm), um den nicht gebundenen Antikörper auszuwaschen
- Zellpellet mit 500 μ l PBS aufnehmen und in ein FACS-Messröhrchen geben
- FACS-Messung durchführen.

3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.7.1 Das Prinzip der PCR

Das Grundprinzip einer PCR liegt in der Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts. Somit ist es möglich, auch kleinste Mengen bestimmter DNA-Abschnitte nachzuweisen. Dazu wird die verwendete DNA zunächst bei 95°C denaturiert. Es folgt die Anlagerung der zugefügten Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Abschnitte der einzelnen DNA-Stränge (Hybridisierung). Mit Hilfe einer DNA-Polymerase erfolgt nun die Amplifikation des DNA-Abschnitts. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Amplifikation wird 25 - 40 Mal durchgeführt, wodurch man eine große Menge der nachzuweisenden DNA-Sequenz erhält. Diese kann anschließend mit Hilfe der Gelelektrophorese dargestellt werden.

3.7.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Abschnitte nach ihrer Ladung getrennt. Dies erreicht man durch ein elektrisches Feld, in dem DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung zum positiv geladenen Pol (Anode) wandern. Die DNA-Stränge laufen dabei auf einem Agarose-Gel, auf das sie zuvor aufgetragen wurden. Dieses Gel wird aus Agarose-Pulver hergestellt und gegossen. Die Ladung der DNA-Stränge ergibt sich aus ihrem Aufbau, genauer gesagt aus der Anzahl ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen. Das zusätzliche Auftragen einer DNA-Treppe erleichtert die spätere Auswertung. Um die "gewanderten" DNA-Stränge sichtbar zu machen, wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht bewertet.

3.7.3 DNA-Isolierung

Für die folgenden Versuche musste zunächst DNA aus den Zellen gewonnen werden. Dafür wurde das DNA-Quiaagen-Blood-Kit von Quiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen nach der Anleitung des Herstellers. Nachfolgend soll jedoch kurz das Vorgehen dargestellt werden.

Verwendet werden sollten nicht mehr als 5×10^6 Zellen in 200 μl PBS. Die Probe wird mit 20 μl Protease Stammlösung vermischt. 200 μl Buffer AL werden hinzugefügt und die Mischung wird für 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellen lysiert. Es folgt die Gabe von 200 μl Ethanol (96-100 %). Anschließend wird die Probe auf eine QiAmp Spinsäule gegeben und an ein Vakuum angeschlossen. Wenn keine Flüssigkeit mehr in der Säule ist, werden 750 μl Buffer AW1 hinzugefügt. Erneut wird ein Vakuum erzeugt. Danach werden 750 μl Buffer AW2 ergänzt. Wenn auch diese Flüssigkeit aufgrund des Soges durch die Säule getreten ist, wird die Spinsäule für 1 Minute bei 20000 g (14000 rpm) zentrifugiert, um die Flüssigkeit vollständig aus der Probe zu beseitigen. 200 μl Buffer AE oder PBS werden nun auf die Probe gegeben. Nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur wird die Probe erneut zentrifugiert (1 Minute bei 6000 g (8000 rpm)). Die DNA ist nun isoliert.

Um die Konzentration zu bestimmen, wird die DNA in etwa 200 μl PBS aufgenommen und die Absorption bei 260-280 nm mit dem Photometer gemessen. Die DNA wird anschließend ggf. mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

3.7.4 Mykoplasmen-PCR

Da zwischenzeitlich das Wachstum der Zellkulturen stark abnahm, wurde eine PCR durchgeführt, um eine Infektion der Zellen mit Mykoplasmen festzustellen bzw. auszuschließen. Zunächst wurde, wie oben beschrieben, DNA isoliert. Die Konzentration wurde nach Messung mit dem Photometer auf 20 ng / μl eingestellt.

Herstellung des Mastermix (auf Eis!):

Benötigt wurden u. a. in angegebenen Konzentrationen:

Primer GPO-1 (5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A) und

Primer MGSO (5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC) jeweils in der Konzentration von 1 μM

dNTPs (0,2 μM)

Taq Polymerase (1U).

Ansatz für 20 μl / tube (Mastermix):

- 10x Taq-Puffer 2 μl
- 10 mmol MgCl_2 2 μl
- je Primer 0,4 μl
- Taq-Polymerase 0,2 μl
- dNTPs 0,4 μl
- Aqua dest. 12,6 μl

18 μl Mastermix wurden in jedes tube gefüllt und 2 μl DNA hinzugefügt.

Danach wurden die tubes in den Thermocycler gestellt. Das Programm lautete wie folgt:

5 Minuten	95 °C	
45 Sekunden	95 °C	} 40x
45 Sekunden	60 °C	
30 Sekunden	72 °C	
10 Minuten	72 °C	

danach Aufbewahrung bei 4 °C.

Nach Beendigung des Programms (ca. 3 Stunden) werden nun auf ein 2,5 % Agarose-Gel in jede Geltasche 2 μl Gel-Lade-Puffer und 5 μl Amplifikat gegeben. Eine weitere Tasche wurde mit einer Positivkontrolle gefüllt und eine Tasche mit einer DNA-Treppe (123 bp) (3 μl).

Nun folgte die Elektrophorese bei 90-100 mV über etwa eine halbe Stunde. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromid geschwenkt und somit gefärbt. Die Diagnose bzw. der Ausschluss einer Mykoplasmeninfektion war nun möglich.

Somit wurden für unsere Versuche nur Mykoplasmen negative Zellen verwendet.

3.7.5 Bestimmung der HLA-C Gruppen der Zellen

Um zu testen, ob die NK-Zellen eine Allospezifität, die aufgrund der „missing-self“ Hypothese zu erwarten wäre (siehe auch 1.2.2) aufweisen, mussten zunächst die Neuroblastomzellen auf ihre HLA-C Gruppen untersucht werden. Dafür wurde die PCR-SSP (Sequenzspezifische Primer) verwendet. Bei der Durchführung hielten wir uns an die Schritte, die bei Frohn et al., 1998 aufgeführt sind. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass direkt die für NK-Zellen entscheidende, d.h. sich in den Aminosäuren unterscheidende HLA-C Sequenz amplifiziert wird. Somit wird schnell die Aussage möglich, zu welcher HLA-C Gruppe die Zelle gehört, ohne dabei eine komplette PCR mit Aufschlüsselung aller HLA-C_w Allele durchführen zu müssen. Hierfür werden folgende Primer benötigt:

Primer	Sequenz	Länge
HLA-C common (vorwärts)	CGC CGC GAG TCC RAG AGG	18-mer
Gruppe 1 (rückwärts)	GTT GTA GTA GCC GCG CAG G	19-mer
Gruppe 2 (rückwärts)	GTT GTA GTA GCC GCG CAG T	19-mer

Tab. 2: Primerpaare zum Nachweis von HLA-C Gruppe 1 und 2 (Liganden für KIR2DL2/3 bzw. KIR1DL1) mittels PCR-SSP.

Die gruppenspezifischen Primer binden an die Basen 240-258, die HLA-C spezifischen Vorwärtsprimer an Position 120-135 von Exon 2.

Für die Durchführung der PCR wurde zunächst die Zell-DNS mittels des Qiagen Blood-Kits isoliert. Dann wurde Mastermix (20 μ l) wie folgt hergestellt (auf Eis!):

- Amplitaq Gold Polymerase 0,8 U
- dNTPs jeweils 0,2 mmol/l
- Positiv Kontrollprimer 0,15 μ mol/l
- je HLA-C_w Primer 0,15 μ mol/l
- Zell-DNS (in Taq Puffer) 15 ng
- MgCl₂ 1,5 mmol/l

Danach wurden die Proben im Thermocycler folgendermaßen behandelt:

prä-PCR Erhitzung	95 °C, 10 Minuten	
dann:	95 °C, 10 Sekunden	} 10x
	65 °C, 30 Sekunden	
	72 °C, 30 Sekunden	

es folgten weitere Zyklen:

95 °C, 10 Sekunden	} 22x
58 °C, 30 Sekunden	
72 °C, 30 Sekunden	

Die PCR-Produkte wurden nun auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Die Färbung erfolgte wiederum mit Ethidiumbromid.

Auch die jeweils verwendeten NK-Zellen wurden auf ihre HLA-C-Gruppen untersucht. Nun war es möglich Zytotoxizitätstests (siehe 3.5) so auszuwerten, dass sich Aussagen über eine mögliche Allospezifität der NK-Zellen machen ließen. Dazu wurden die

Zelllinien SKNMC und Kelly jeweils mit NK-Zellen der HLA-C-Konstellation I, I bzw. II, II inkubiert und anschließend Zytotoxizitätsversuche durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Lyse der unstimulierten Neuroblastomzellen

Bei den Zytotoxizitätstests mit unstimulierten Neuroblastom- und expandierten NK-Zellen werden alle Neuroblastomzelllinien von NK-Zellen getötet. Dabei fällt auf, dass insgesamt eine unterschiedlich hohe Lyserate zu beobachten ist. In Abbildung 4.1 werden die Lyseraten dargestellt.

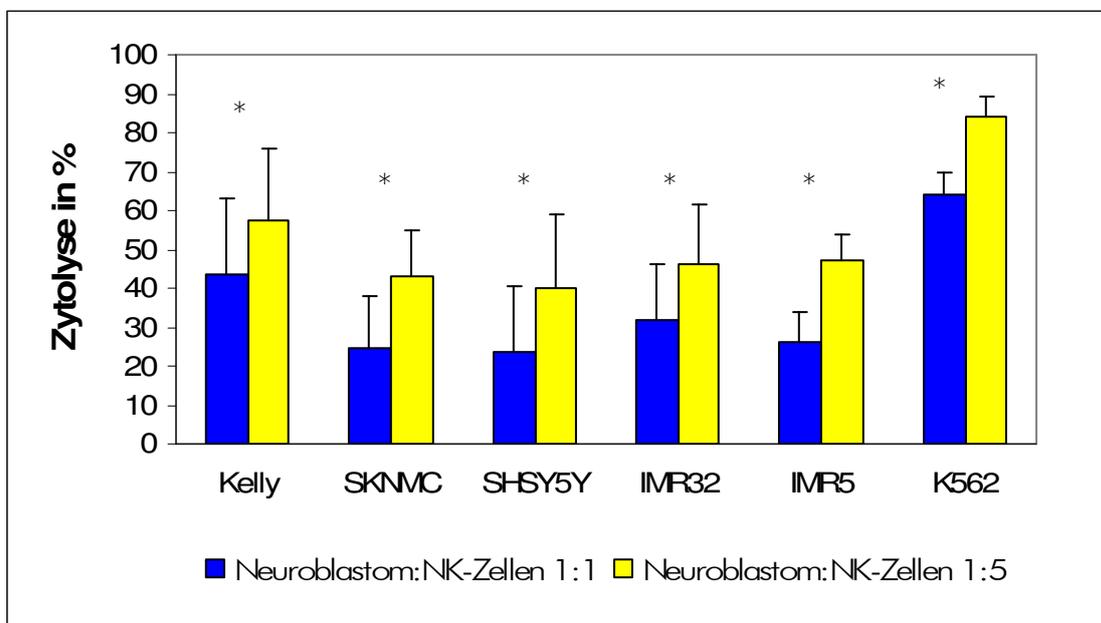


Abb. 4.1: Lyseraten der Neuroblastomzellen nach Inkubation mit expandierten NK-Zellen über 3 Stunden in den E/T-Verhältnissen 1:1 (blau) und 5:1 (gelb). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. Als Kontrolle wurde K562 gemessen. n = Anzahl der Versuche: Kelly: n = 8; SKNMC: n = 16; SHSY5Y: n = 13; IMR32: n = 10; IMR5: n = 7; K562: n = 18). Die Zytolyse ergibt sich dabei aus der Zunahme der toten Neuroblastomzellen nach Inkubation mit NK-Zellen minus der Zunahme der toten Neuroblastomzellen in Reinkultur nach 3 Stunden.
* : $p < 0,05$ (signifikant) (Wilcoxon Test)

Aus den Versuchen geht deutlich hervor, dass die NK-Zellen die Neuroblastomzellen töten. Dabei wird Kelly am stärksten von den NK-Zellen lysiert. Die Lyseraten der anderen Zelllinien liegen alle sehr nahe beieinander.

Insgesamt ist zu sehen, dass mit Zunahme der NK-Zellen auch die Lyserate der Neuroblastomzellen zunimmt.

Die verschiedenen Versuchszahlen ergaben sich aus den unterschiedlichen Verdopplungszeiten der verschiedenen Zelllinien, welche die Durchführbarkeit der Experimente limitierte.

4.2 Lyse der mit INF γ -stimulierten Neuroblastomzellen

Für diese Versuche wurden die Neuroblastomzellen, wie in 3.4.2 beschrieben, mit INF γ stimuliert und mit NK-Zellen in Kultur gebracht (3.4.1). Durch die Wahl der Versuchsbedingungen kann ausgeschlossen werden, dass das INF γ direkt auf die NK-Zellen wirkt. Nun wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt (3.5), sowohl mit unstimulierten Zellen, die hierbei als Vergleichsgruppe dienten, als auch mit den INF γ -stimulierten Zellen. Die stimulierten - und unstimulierten Neuroblastomzellen wurden also jeweils mit den gleichen NK-Zellen inkubiert, um sie direkt vergleichen zu können.

Die Ergebnisse werden in Abbildung 4.2 auf Seite 47 dargestellt.

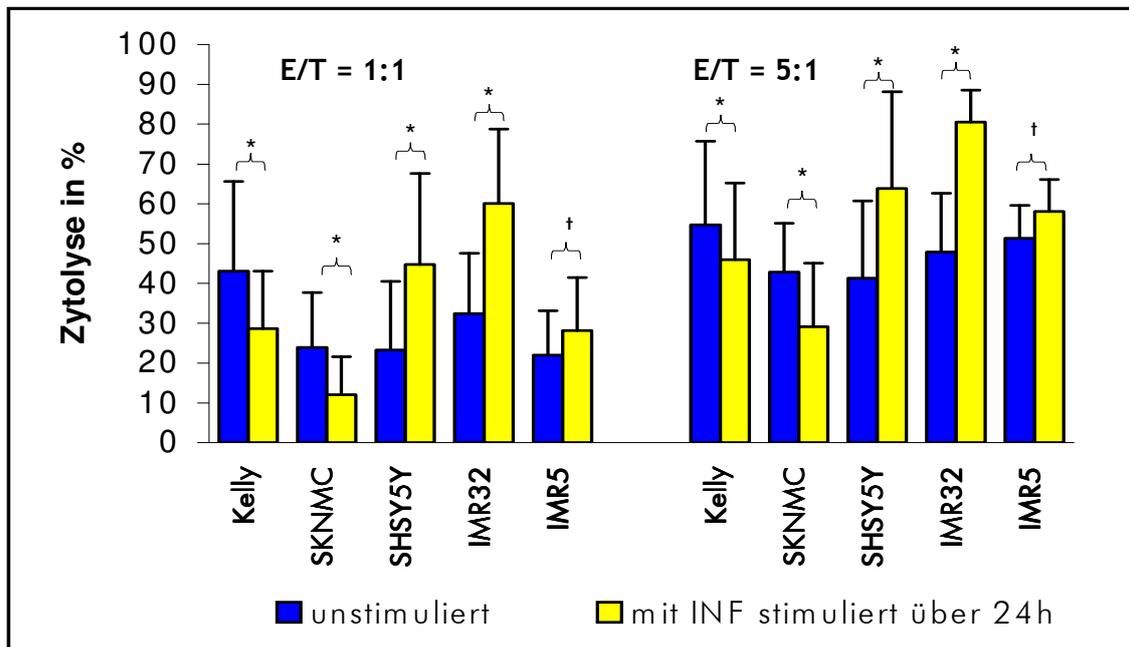


Abb. 4.2: Darstellung der Lyse von unstimulierten - (blau) und mit $\text{INF}\gamma$ -stimulierten Neuroblastomzellen (gelb) im Vergleich in den E / T-Verhältnissen 1:1 und 5:1 nach 3 Stunden Inkubationszeit. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. Anzahl der Versuche: (n = a / b); a: Versuch E / T = 1:1; b: Versuch E / T = 5:1. Kelly: n = 6 / 7; SKNMC: n = 15 / 18; SHSY5Y: n = 13 / 14; IMR32: n = 8 / 12; IMR5: n = 7 / 8. Versuche im E / T Verhältnis 1:10 werden hier nicht mit dargestellt, sie bestätigen aber die oben gezeigten Verhältnisse.
*: p < 0,05 (signifikant); †: p > 0,05 (nicht signifikant), (Wilcoxon Test).

Bei den Ergebnissen fällt auf, dass sich die Zytolyse nach der $\text{INF}\gamma$ -Stimulation unterschiedlich verhält. Bei den Zelllinien Kelly und SKNMC kommt es nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation zu einem Rückgang der Zytotoxizität der NK-Zellen, was aufgrund der "missing-self" Hypothese zu erwarten war. Doch gleichzeitig fällt auf, dass die Zytolyse insbesondere bei den Zelllinien SHSY5Y und IMR32 stark ansteigt. Die statistischen Untersuchungen mit dem Wilcoxon-Test haben gezeigt, dass die Ergebnisse alle

signifikant sind, mit Ausnahme der Werte von IMR5. Eine Aufstellung der statistischen Signifikanzniveaus gibt nachfolgende Tabelle:

	1:1	5:1
Kelly / Kelly stimuliert	$p = 0,028$	$p = 0,018$
SKNMC / SKNMC stimuliert	$p = 0,003$	$p < 0,000$
SHSY5Y / SHSY5Y stimuliert	$p = 0,001$	$p = 0,002$
IMR32 / IMR32 stimuliert	$p = 0,005$	$p = 0,001$
IMR5 / IMR5 stimuliert	$p = 0,173$	$p = 0,500$

Tab. 4.1: Versuche mit unstimulierten und mit INF γ -stimulierten Neuroblastomzellen. Test auf Signifikanz mit dem Wilcoxon-Test in den E / T-Verhältnissen 1:1 und 5:1. Bei einem Wert $p \geq 0,05$ handelt es sich um ein nicht-signifikantes -, bei einem Wert $p < 0,05$ um ein signifikantes Ergebnis.

Diese Ergebnisse führten zu weiteren Untersuchungen, um die gezeigten Unterschiede erklären zu können.

4.3 HLA- und ICAM-1-Zunahme nach INF γ -Stimulation

Um erklären zu können, warum sich die Zytotoxizität durch NK-Zellen bei den verschiedenen Neuroblastomzellen unterschiedlich verhält, wurde getestet, wie sich die INF γ -Stimulation auf die Zellen auswirkt. Dabei wurde zum einen die HLA-Präsentationszunahme, zum anderen die ICAM-1-Präsentation untersucht. Das ICAM-1 gilt als Bindungspartner für das LFA-1 der NK-Zelle, weshalb es hier mit beobachtet wurde. Dazu wurden die Zellen, wie in Punkt 3.6 beschrieben, untersucht. Der Effekt der INF γ -

Stimulation soll hier am Beispiel von SKNMC und HLA in Abbildung 4.3 verdeutlicht werden:

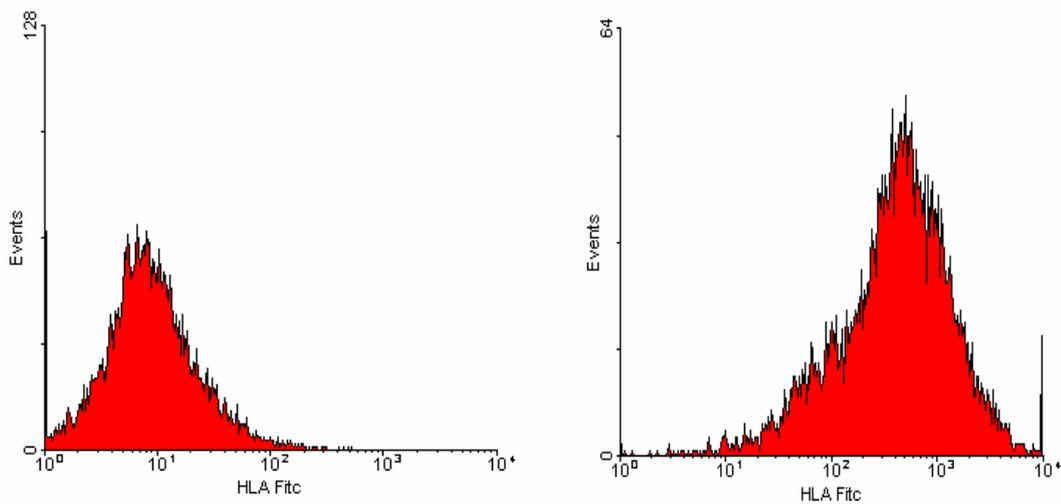


Abb. 4.3: Darstellung der Fluoreszenzintensität nach Verwendung von HLA-Fitc Antikörpern am Beispiel von SKNMC (links) und SKNMC nach INF γ - Stimulation (rechts). Eine Rechtsverschiebung in der Graphik zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität und somit eine vermehrte HLA-Expression.

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche sind in Abbildung 4.4 bzw. 4.5 dargestellt:

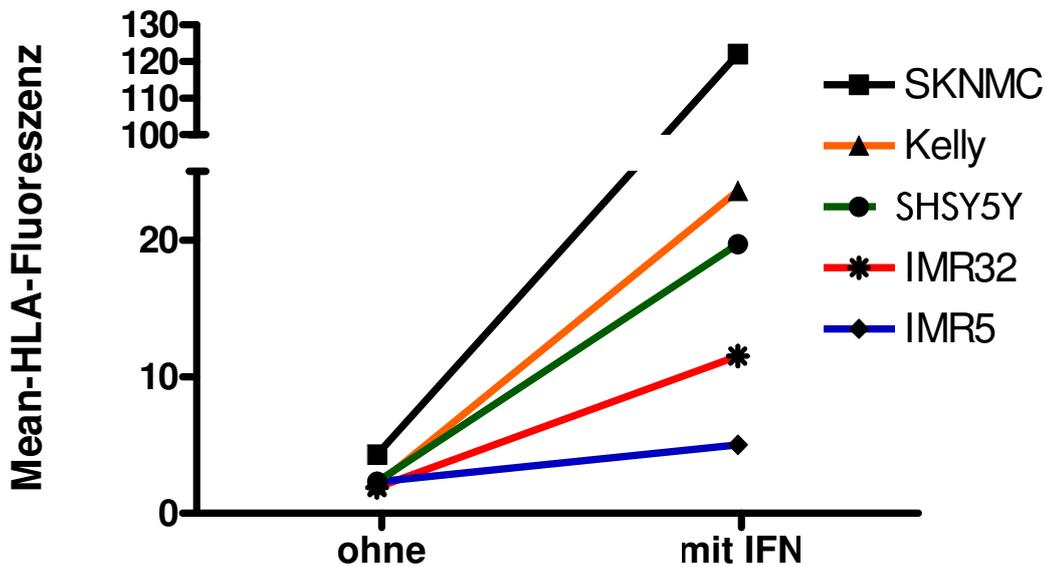


Abb. 4.4: Logarithmische Auftragung der HLA-MeanX-Werte als Maß für die HLA-Präsentation auf der Oberfläche der Neuroblastomzellen vor und nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation. Anzahl der durchgeführten Messungen = n. Kelly: n = 7; SKNMC: n = 18; SHSY5Y: n = 14; IMR32: n = 12; IMR5: n = 8.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zelllinie SKNMC mit der stärksten HLA-Zunahme auf der Oberfläche nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation reagiert. Auch unstimuliert weist sie die stärkste, wenn auch insgesamt geringe, HLA-Präsentation auf.

Die anderen Zelllinien weisen in etwa die gleichen Ausgangswerte in Bezug auf die HLA-Dichte auf. Auch nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation liegen diese Zelllinien nahe beieinander, insbesondere Kelly und SHSY5Y. IMR5 ist die Zelllinie, die am geringsten mit einer HLA-Induktion nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation reagiert.

Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass die Neuroblastomzellen unterschiedlich auf das $\text{INF}\gamma$ reagieren, obwohl sie mit den gleichen Konzentrationen stimuliert wurden. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in den Zytotoxizitätstests sein.

Auch die ICAM-1-Verteilung auf den Neuroblastomzellen vor und nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation wurde, wie in Punkt 3.6.1 beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt:

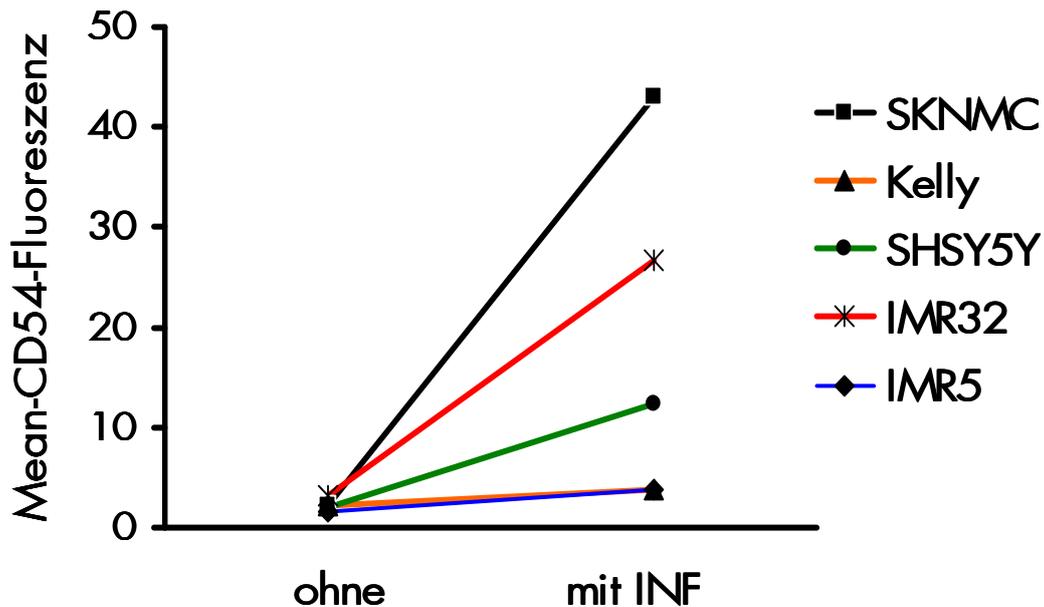


Abb. 4.5: Darstellung der CD54-MeanX-Werte (Fluoreszenzintensität) vor und nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation als Maß für die Ausprägung von ICAM-1 auf der Oberfläche der einzelnen Neuroblastomzelllinien im Vergleich. n = Anzahl der durchgeführten Messungen: n = 6, ausgenommen IMR5: n = 4.

Wie schon bei den HLA-Molekülen findet sich auch beim ICAM-1 nach Stimulation die größte Reaktion bei SKNMC, wo es zu einer starken Präsentationszunahme von ICAM-1 kommt. Auch bei IMR32 und SHSY5Y wird eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz gemessen. Im Gegensatz dazu verändert sich bei IMR5 und Kelly kaum etwas, d. h., dass hier die ICAM-1-Induktion gering ausfällt.

Insgesamt ist also sowohl eine HLA-, als auch eine ICAM-1-Zunahme auf den Zellen zu verzeichnen.

4.4 Lyse der mit $\text{INF}\gamma$ -stimulierten - und mit HLA-Ak blockierten Zellen

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen, die nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation entstanden sind (siehe 4.2), den induzierten HLA-Molekülen zuzuschreiben sind, wurde ein Gegenversuch mit HLA-ABC-Antikörpern durchgeführt (Vorgehen siehe 3.4 und 3.5). Dies geschah unter der Annahme, dass die Wirkungen, die durch die Stimulation mit $\text{INF}\gamma$ ausgelöst wurden, rückgängig gemacht werden können. Parallel wurden Messungen mit unstimulierten - und mit $\text{INF}\gamma$ -stimulierten Neuroblastomzellen durchgeführt.

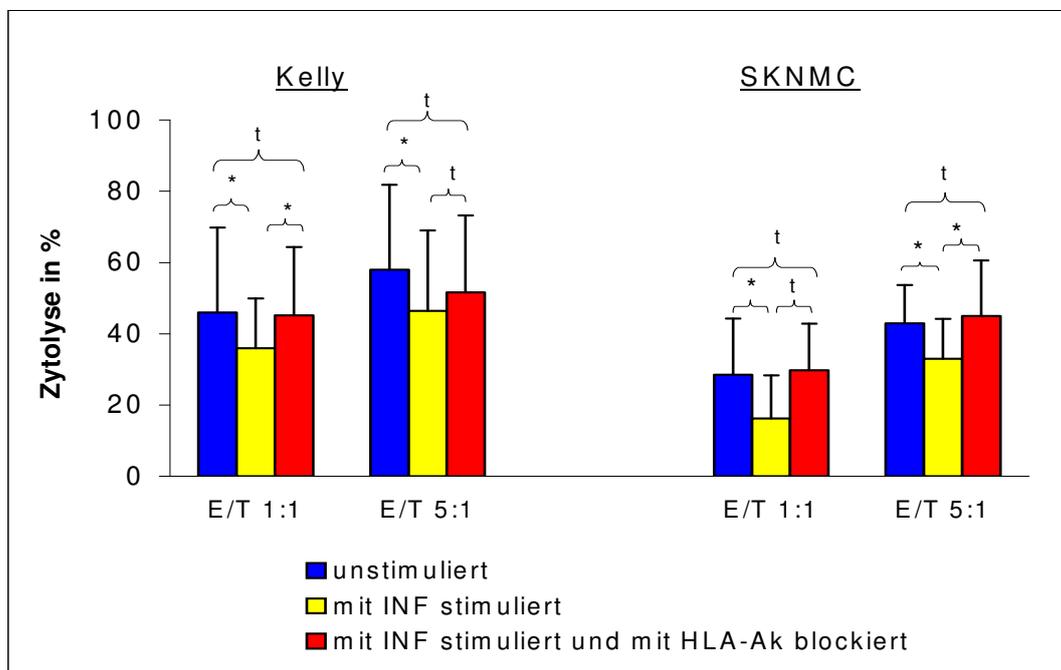


Abb. 4.6: Vergleich der Zytolyse durch NK-Zellen bei den unstimulierten (blau)-, mit $\text{INF}\gamma$ -stimulierten - (gelb) und mit $\text{INF}\gamma$ -stimulierten und mit HLA-ABC-Antikörpern blockierten (rot) Neuroblastomzelllinien Kelly und SKNMC in den Effektor / Target Verhältnissen 1:1 und 5:1 nach 3 Stunden Inkubationszeit. Mittelwerte mit Standardabweichungen. Anzahl der Versuche = n: Kelly: n = 5, SKNMC: E/T 1:1: n = 6, E/T 5:1: n = 8.
*: $p < 0,05$ (signifikant); t: $p > 0,05$ (nicht signifikant) (Wilcoxon Test).

Aus der Darstellung geht hervor, dass die durch $\text{INF}\gamma$ hervorgerufene Abnahme der Zytolyse bei SKNMC und Kelly durch die Anwendung von HLA-ABC-Antikörpern im Wesentlichen rückgängig zu machen ist. Auch wenn nicht alle Messungen signifikant sind, so zeigt sich doch bei allen Zelllinien tendenziell ein Wiederanstieg der Zytotoxizität nach Antikörperblockierung der HLA-Moleküle. Das beweist, dass die Abnahme der Zytolyse dort, wo sie beobachtet wurde, tatsächlich auf die Zunahme von HLA-Molekülen und nicht beispielsweise auf ICAM-1 zurückzuführen ist.

Bei den Zelllinien SHSY5Y und IMR32 ist es trotz HLA-Induktion nicht zu einer Abnahme der Zytotoxizität gekommen. Die Ergebnisse dieser Blockierungsversuche werden in einem gesonderten Diagramm auf Seite 54 dargestellt.

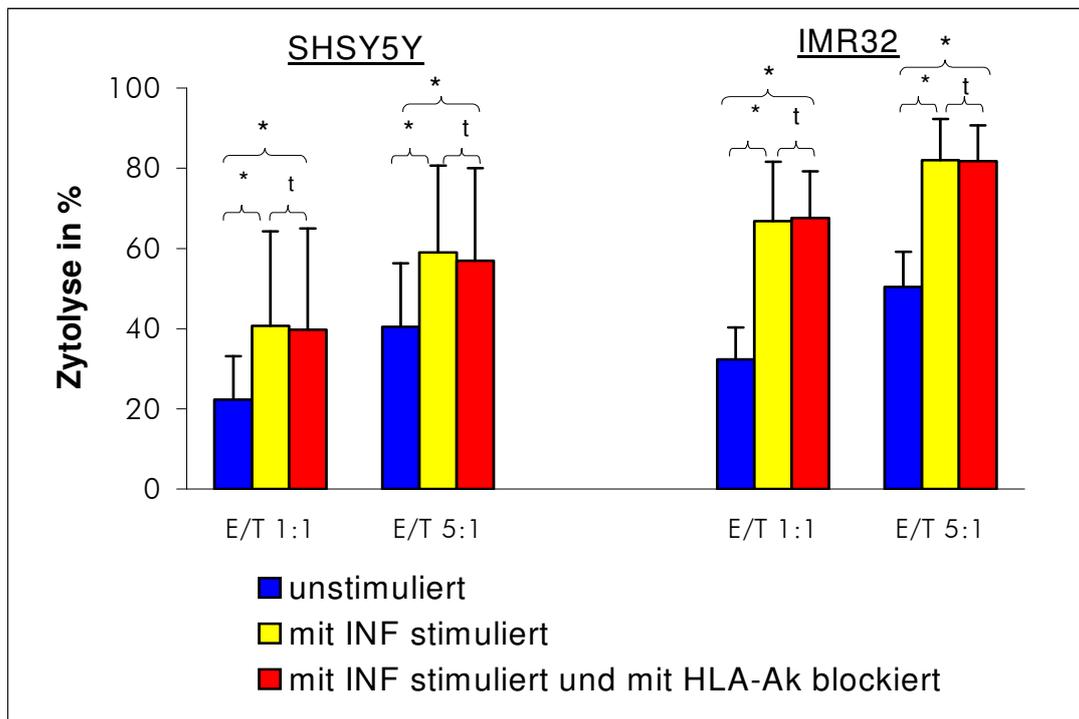


Abb. 4.7: Vergleich der Zytolyse durch NK-Zellen bei den unstimulierten- (blau), mit INF γ -stimulierten (gelb) und mit INF γ -stimulierten und mit HLA-ABC-Antikörpern blockierten (rot) Neuroblastomzelllinien SHSY5Y und IMR32 in den Effektor / Target-Verhältnissen 1:1 und 5:1 nach 3 Stunden Inkubationszeit. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. SHSY5Y: n = 6, IMR32: n = 5. *: p < 0,05 (signifikant); t: p > 0,05 (nicht signifikant) (Wilcoxon Test).

Die Graphik zeigt, dass es durch Blockierung der HLA-Moleküle zu keiner relevanten Veränderung kommt. Die Werte bleiben auf dem gleichen Niveau wie nach der INF γ -Stimulation. Die HLA-Blockierung zeigt also bei den Zelllinien SHSY5Y und IMR32 keine Wirkung auf die Zytotoxizität durch NK-Zellen. Offensichtlich existieren neben der HLA-Induktion noch andere Effekte des Interferons auf die Neuroblastomzellen, welche zu der erhöhten Sensibilität gegenüber den NK-Zellen führen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass Interferon die NK-Zell - vermittelte Zytolyse durch HLA-Induktion vermindert, falls diese Induktion ausreichend stark ist. Zusätzlich hat

Interferon noch einen Zytolyse-verstärkenden Effekt, der in Abwesenheit von einer starken HLA-Induktion manifest wird.

4.5 Zytotoxizitätstests mit HLA-C-Gruppenspezifität

Eine relevante Frage ist, ob bei den Zellen, bei denen eine Verminderung der Zytotoxizität zu beobachten war, dieser Effekt entsprechend der „missig-self“ Theorie von der HLA-C-Konstellation zwischen Spender der NK-Zellen und Neuroblastomzellen abhängig war. Die PCR ergab (siehe 3.7.5), dass SKNMC zu der HLA-C-Gruppe I, I gehört. Die Inkubation mit NK-Zellen von Spendern mit kompatibler und inkompatibler HLA-C-Konstellation zeigte die nachfolgenden Ergebnisse hinsichtlich der Zytolyse der Zielzellen:

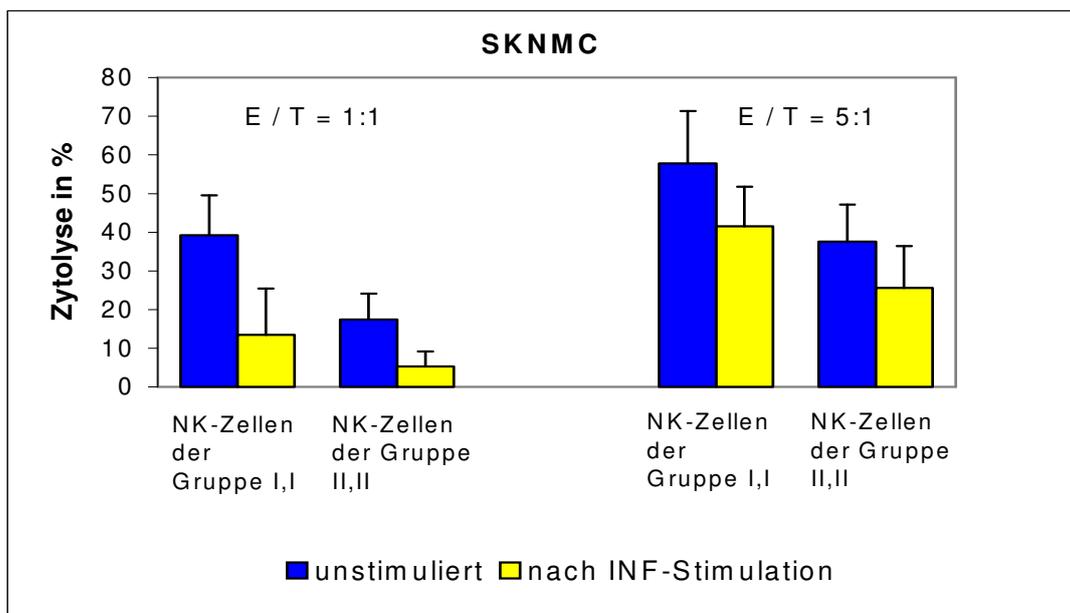


Abb. 4.8: Zytotoxizitätstests im Hinblick auf eine Allospezifität der NK-Zellen. Die Zelllinie SKNMC (Gruppe I, I) wurde unstimuliert und nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation jeweils mit NK-Zellen der gleichen HLA-C-Konstellation (Gruppe I, I) bzw. einer anderen HLA-C-Konstellation (Gruppe II, II) über 3 h inkubiert. Dargestellt sind die Lysezahlen in % in den Effektor / Target-Verhältnissen 1:1 ($n = 4$) und 5:1 ($n = 5$). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Die Zytolyse der Zelllinie SKNMC im Effektor- / Target-Verhältnis 1:1 nimmt jeweils um $\frac{1}{3}$ ab, sowohl bei den NK-Zellen der gleichen, als auch der inkompatiblen HLA-C Konstellation. Im Verhältnis 5:1 kommt es zu einer ähnlichen Reduktion der Zytolyse nach INF γ -Stimulation. Die HLA-C-Konstellation spielt also keine Rolle für die Lysehemmung durch HLA-Induktion.

Auch Kelly wird im E / T- Verhältnis 1:1 nach INF γ -Stimulation um etwa $\frac{1}{3}$ weniger lysiert. Diese Werte sind in der Graphik jedoch nicht dargestellt, da diese Versuche nur stichprobenartig durchgeführt wurden ($n=2$) und somit eine verallgemeinernde Aussage nicht möglich ist. Trotz allem sollen die Ergebnisse hier genannt werden, da sie einen Hinweis darauf geben können, ob sich Neuroblastomzellen in diesen Versuchen unterscheiden. Insgesamt wurde bei Kelly kein Unterschied in der Zytotoxizität zwischen den HLA-C-Konstellationen erwartet, da Kelly der Gruppe I, II angehört und folgerichtig von NK-Zellen der HLA-C-Gruppe I, I und II, II gleichermaßen lysiert werden müsste.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass kein Unterschied in der Lyse von Neuroblastomzellen (SKNMC und Kelly) durch NK-Zellen unterschiedlicher HLA-C-Konstellation zu beobachten ist.

4.6 Zytotoxizitätstests mit CD56-Antikörpern

Das sowohl auf NK- als auch auf Neuroblastomzellen exprimierte CD56 ist ein nahe liegender Kandidat für die Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes und damit für die Initiierung des lytischen Prozesses (siehe Einleitung). Für diese Versuche wurden sowohl Neuroblastom- als auch NK-Zellen mit CD56-Antikörpern geblockt (siehe auch 3.4.4). Am Beispiel der NK-Zellen soll in Abbildung 4.9 gezeigt werden, welchen Einfluss dabei die CD56-Antikörper hatten:

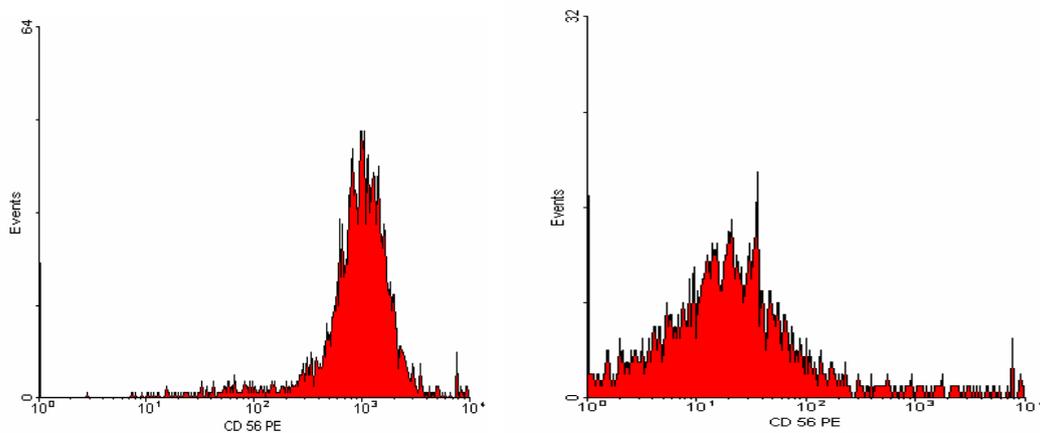


Abb. 4.9: Histogramme mit Events / CD56 PE-Ak. Dargestellt wird die Fluoreszenz von CD56-PE der NK-Zellen als Maß für die abnehmende Ausprägung von freien CD56-Molekülen auf der Oberfläche vor (links) und nach (rechts) CD56-Blockung. Je weiter links die Graphen verlaufen, desto weniger freie CD56-Moleküle sind vorhanden.

Nach CD56-Blockierung der Zellen kam es zu einem deutlichen Rückgang in der Fluoreszenz bei Darstellung der Moleküle mit CD56-PE. Es tritt nach Blockierung also ein deutlicher Rückgang freier CD56-Rezeptoren auf. Dies trifft für Neuroblastomzellen ebenso zu und war Grundvoraussetzung für die folgenden Versuche.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests vor und nach CD56-Blockierung sind in Abbildung 4.10 dargestellt:

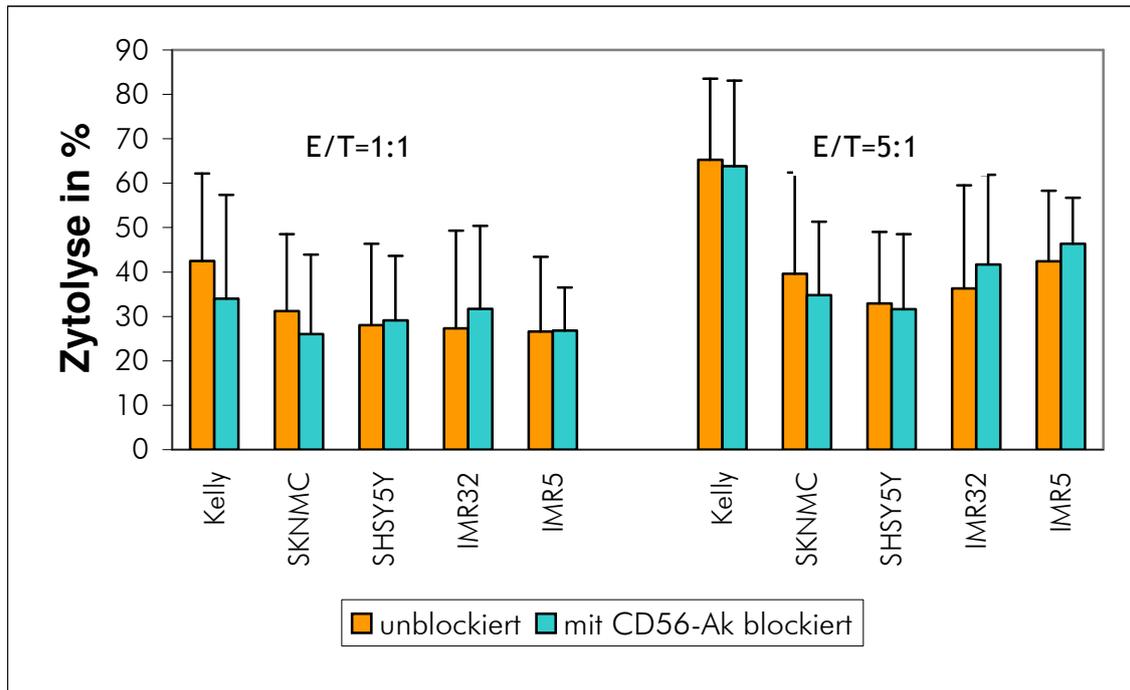


Abb. 4.10: Zytolyse der Neuroblastomzellen ohne (orange) und mit (blau) CD56-Antikörpern auf Neuroblastom- und NK-Zellen in den Effektor / Target-Verhältnissen 1:1 und 5:1 nach 3 Stunden Inkubationszeit. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. Fallzahlen = n im E / T-Verhältnis 1:1: Kelly: n = 6, SKNMC: n = 9, SHSY5Y: n = 9, IMR32: n = 8, IMR5: n = 5. Im E / T-Verhältnis 5:1: Kelly und IMR5: n = 5, SKNMC, SHSY5Y und IMR32: n = 9. Alle Unterschiede sind nicht signifikant (Wilcoxon Test).

Die Ergebnisse zeigen keine relevanten Unterschiede in der Zytolyse von Neuroblastomzellen vor und nach Blockierung der CD56-Rezeptoren. Offensichtlich spielt die Adhäsion über CD56-Moleküle keine entscheidende Rolle bei der Neuroblastomerkenung durch NK-Zellen, zumindest nicht in dem gewählten Model.

5. DISKUSSION

5.1 NK-Zellen

NK-Zellen geben trotz der vielen Erkenntnisse, die in den letzten Jahren über sie gewonnen wurden, auch heute noch Rätsel auf. Sie sind Thema diverser Forschungsgruppen, welche sich mit Aufbau, Funktion und Verhalten der NK-Zellen beschäftigen. Dabei stellen die Oberflächenmoleküle einen besonders wichtigen zu erforschenden Anteil dar, weil damit auch neues Wissen über das "Können" und "Verhalten" der NK-Zellen gewonnen werden kann. Häufig ist der Aufbau der Zellen für eine Aktivierung oder Inhibierung durch Bindung mit Rezeptoren oder Interleukinen verantwortlich (Farag et al., 2002).

Es ist bekannt, dass NK-Zellen viele verschiedene Moleküle und Rezeptoren tragen (KIRs, CD56, Lektin-ähnliche Rezeptoren, NCRs, um nur einige davon zu nennen (siehe auch 1.2.3.) (Moretta et al., 1995; Lazetic et al., 1996; Moretta et al., 2000). NK-Zellen tragen aber keinen Rezeptor der Lymphozyten (T-Zell-Rezeptor bzw. IgD), obwohl sie zu den Lymphozyten gehören. Damit haben die aus der T- und B-Zell-Immunologie bekannten Mechanismen hier keine Relevanz, stattdessen können NK-Zellen Zielzellen ohne antigene Aktivierung lysieren. Aber auch die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), bei der die NK-Zellen mit CD16 an gebundene Antikörper binden, führt zu einer Lyse von Zielzellen (Ojo und Wigzell, 1978).

Trotz der vielen Moleküle, deren Ausprägung auf NK-Zellen bereits bekannt ist, werden immer wieder neue Oberflächenmoleküle entdeckt, deren Funktionen nur Schritt für Schritt erkannt werden können. In der Gesamtheit ergibt sich dabei ein komplexes Zusammenspiel von Faktoren, die zu einer Aktivierung oder auch Inhibierung der NK-Zellen führen (Farag et al., 2002).

Im Hinblick auf die Effektormechanismen ist bekannt, dass NK-Zellen verschiedene Zytokine produzieren, mit deren Hilfe sie andere Zellen beeinflussen können (z.B. INF γ ,

IL-5, IL-13) (Handa et al., 1983; Warren et al., 1995; Hoshino et al., 1999).

Neues Wissen und Verstehen im Verhalten von NK-Zellen ist nicht nur von theoretischem Interesse. Dieses Wissen hat auch klinische Bedeutung. Die Einsetzbarkeit von NK-Zellen in der Therapie von Tumorerkrankungen ist stark abhängig vom Wissen über ihre zytotoxischen Wirkungsweisen. Ziel sollte es sein, sich dieses Wissen zu Nutzen zu machen und damit weitere Fortschritte in der Tumorthherapie und Transplantationsmedizin zu erreichen. Es ist schon lange bekannt, dass NK-Zellen Tumorzellen töten können (Hebermann et al., 1975). Inzwischen sind NK-Zellen schon in einer klinischen Studie in der adoptiven Krebstherapie von Nierenzellkarzinomen (Escudier et al., 1994) mit teilweise viel versprechenden Ergebnissen angewendet worden. Dabei scheint die Transfusion von NK-Zellen sehr gut verträglich zu sein (Hercend et al., 1990; Frohn et al., 2000). Zudem ist in der Arbeit von Ruggeri et al., 1999 ein ausgeprägter Graft versus Leukämie-Effekt von NK-Zellen nach Knochenmarkstransplantation bei Patienten mit Leukämie gezeigt worden. So kann das Wissen über die Aktivierung der NK-Zellen in der Tumorthherapie dabei helfen, ein Maximum an Aggressivität gegen Tumorzellen zu erreichen und somit vielleicht die Überlebenschancen von Patienten zu verbessern. Möglicherweise bietet sich hier auch eine Option für Kinder mit Neuroblastom (Main et al., 1985; Prigione et al., 2004).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden auf einige wenige Oberflächenmoleküle und ihre Wirkung auf NK-Zellen begrenzt.

5.2 HLA

Das HLA ist für Versuche mit NK-Zellen von Bedeutung, da es aufgrund der „missing-self“ Hypothese (Ljunggren und Kärre, 1990) eine wichtige Rolle spielt. Demnach töten NK-Zellen vermehrt die Zellen, die kein oder nur so abgeändertes HLA tragen, dass es nicht als „selbst“ erkannt werden kann. Für unsere Versuche ist es dabei wichtig zu wissen, dass beim Neuroblastom, wie auch bei vielen anderen Tumoren, nur wenig oder kein HLA auf den Zellen vorhanden ist (Raffaghello et al., 2005).

Die bisher veröffentlichten Studien zur Rolle des HLA in Bezug auf die Zytotoxizität durch

NK-Zellen ergeben zusammengenommen widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits wird die Aussage der „missing-self“ Hypothese durch mehrere Studien bestätigt (Gidlund et al., 1981; Ljunggren und Kärre, 1985; Storkus et al., 1987). Im Gegensatz dazu gibt es Studien, die, der „missing-self“ Hypothese widersprechend, keine Zytotoxizitätsabnahme durch HLA gemessen haben (Chervenak und Wolcott, 1988; Leiden et al., 1989; Handgretinger et al., 1989; Stam et al., 1989; Routes, 1992). Handgretinger et al. haben sogar eine Zunahme der Zytotoxizität nach HLA-Induktion durch $\text{INF}\gamma$ gemessen. Eine Erklärung konnte hierfür noch nicht gefunden werden.

Bei unseren Versuchen konnten wir an den fünf untersuchten Zelllinien die widersprüchlichen Ergebnisse nachvollziehen. Eine genaue Analyse der Ergebnisse gibt Hinweise auf die Ursachen für das diskrepante Verhalten:

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse nach Stimulation der Neuroblastomzellen mit $\text{INF}\gamma$, so wird klar, dass sich die NK-Zellen nicht gleich verhalten. Zu erwarten war bei allen Zelllinien eine Abnahme der Zytotoxizität („missing-self“ Hypothese (Ljunggren und Kärre, 1990)), da es bei allen Zellen zu einem Anstieg der HLA-Präsentation auf ihrer Oberfläche nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation kam (Abb. 4.4, Seite 50). Hierbei muss noch erwähnt werden, dass die NK-Zellen in den Versuchen keinen Kontakt mit $\text{INF}\gamma$ hatten, so dass stimulierende Effekte auf die NK-Zellen durch $\text{INF}\gamma$ ausgeschlossen werden können. Es gab deutliche Unterschiede zwischen den Zytotoxizitätstests mit SKNMC und Kelly (Anstieg der Zytotoxizität nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation) einerseits und SHSY5Y, IMR32 und IMR5 (Abnahme der Zytotoxizität) andererseits (siehe Abb. 4.2, Seite 47). Es stellt sich hier die Frage, worauf diese Gegensätze im Verhalten der NK-Zellen zurückzuführen sind. Die Erklärung könnte einerseits in der unterschiedlichen Reaktion der Neuroblastomzellen auf $\text{INF}\gamma$ zu finden sein. SKNMC reagierte mit einer weit größeren Zunahme der HLA-Präsentation als die anderen Zelllinien. Gleichzeitig kam es hier auch zu der stärksten Hemmung der Zytotoxizität. Die Zelllinie Kelly mit der zweitstärksten HLA-Expression zeigt noch eine geringe Verminderung der Zytolyse, während alle anderen Zelllinien eine unveränderte oder sogar vermehrte Lyse nach $\text{INF}\gamma$ -Behandlung zeigen. Daraus lässt sich folgende These postulieren:

- Die NK-Zellen werden in den Versuchen umso stärker gehemmt, je mehr HLA die Zielzelle präsentiert.

Damit ist aber die Zunahme der Zytotoxizität nach $\text{INF}\gamma$ -Stimulation bei drei Zelllinien nicht erklärbar.

Dies führt zu folgender Überlegung: es wäre denkbar, dass die $\text{INF}\gamma$ -Stimulation grundsätzlich zwei verschiedene, gegenläufige Effekte hat:

- zum einen die Hemmung von NK-Zellen durch HLA,
- zum anderen die Stimulation von NK-Zellen durch weitere auf den Zielzellen ausgelöste Mechanismen.

Je mehr HLA induziert wird, desto stärker sind hemmende Einflüsse erkennbar. Um zu beweisen, dass die inhibierende Wirkung bei den Zelllinien SKNMC und Kelly wirklich auf das HLA zurückzuführen ist, wurde der Versuch 3.4.3 durchgeführt, in welchem wir die durch $\text{INF}\gamma$ -induzierten HLA-Moleküle wiederum mit Antikörpern blockierten. Auch hier kam es zu Überraschungen, da es bei SHSY5Y und IMR32 und zunächst auch bei SKNMC zu einem weiteren Anstieg der Zytotoxizität kam (Daten nicht dargestellt). Die Vermutung lag nahe, dass dies auf die Anwesenheit des Antikörpers zurückzuführen ist, wodurch ADCC ausgelöst und ein Anstieg der Zytotoxizität vorgetäuscht sein könnte. Um dies auszuschließen, wurde der verwendete IgG_{2a} -Antikörper gegen einen Antikörper der Gruppe IgG_1 ausgetauscht, da hier die Auslösung von ADCC am geringsten ist (Dijstelbloem et al., 2001). Der Wechsel des Antikörpers führte dann auch zu einem Rückgang der Lyse bei allen Zelllinien.

Bei SKNMC und Kelly kam es nun zu einem fast vollständigen Rückgang der durch das $\text{INF}\gamma$ ausgelösten Reaktionen (Abb. 4.6, Seite 52). Somit ist bewiesen, dass hier die Veränderungen in der Zytotoxizität dem HLA zuzuschreiben sind.

Bei SHSY5Y und IMR32 kam es hingegen zu keiner Änderung der Lysezahlen (Abb. 4.7, Seite 54), was gegen einen eventuell bestehenden stimulierenden Effekt der HLA-

Moleküle spricht. Dies führte zu der Vermutung, dass andere durch INF γ ausgelöste Mechanismen für die Zytotoxizitätssteigerung verantwortlich sind. Demnach ergibt sich folgende Theorie:

- Die Aktivierung von HLA-Molekülen hatte grundsätzlich bei allen Zelllinien den gleichen hemmenden Effekt, wie a priori erwartet,
- dabei wurden durch das INF γ zusätzlich stimulierende Mechanismen ausgelöst, die bei einigen Zelllinien die hemmende Wirkung des HLA übertrafen.

Für diese These sprechen auch die anschließend folgenden Erkenntnisse bezüglich ICAM-1 und der Apoptosegene.

5.3 ICAM-1

Bei unseren Versuchen bestimmten wir zusätzlich die Veränderung der ICAM-1 Expression nach INF γ -Stimulation. ICAM-1, das vom LFA-1 der NK-Zelle gebunden werden kann, wurde schon früher mit stimulierenden Effekten von NK-Zellen in Zusammenhang gebracht (Naganuma et al., 1991). Die vermehrte Expression von ICAM-1 könnte hier demzufolge zu einer gesteigerten Zytotoxizität geführt haben. Auch andere Bindungspartner der NK-Zellen mit dem Adhäsionsmolekül sind dabei nicht ausgeschlossen.

ICAM-1 wird tatsächlich vermehrt nach INF γ -Stimulation auf den Zellen präsentiert und könnte so die Unterschiede erklären. Doch auch hier kommt es bei SKNMC zur stärksten Expression (Abb. 4.5, Seite 51). Bei dieser Zelllinie führt die INF γ -Stimulation aber zu einer deutlich verminderten Lyse durch die NK-Zellen, was gegen eine stimulierende Wechselwirkung zwischen der NK-Zelle und dem ICAM-1 spricht.

Bei SHSY5Y und IMR32 ist auch ein deutlicher Anstieg der ICAM-1 Moleküle festzustellen. Hier könnte man also annehmen, dass dies zu der verstärkten Aggressivität der NK-Zellen geführt und die HLA-Wirkung überwunden hat. Auch die Ergebnisse von Kelly würden dazu passen, da hier nur ein geringer Anstieg der ICAM-1 Moleküle

auftritt und gleichzeitig die Zytotoxizität sinkt. Aufgrund der Ergebnisse von SKNMC scheint aber auch das ICAM-1 nicht zur vollständigen Klärung der Unterschiede zwischen den Zelllinien zu führen.

5.4 Apoptosegene

In weiterführenden Versuchen am Institut wurde die Wirkung von INF γ auf verschiedene Apoptosegene in den Neuroblastomzellen untersucht (Daten nicht dargestellt). Diese von Sandra Schlick erarbeiteten Ergebnisse sind in diesem Zusammenhang sehr interessant und sollen deshalb hier kurz erwähnt werden. Die Versuche zeigten, dass bei SKNMC Apoptosegene durch die INF γ -Stimulation herunterreguliert und anti-Apoptosegene heraufreguliert wurden, wohingegen bei IMR32 das Gegenteil der Fall war (Schlick, 2004). Die vermehrten oder verminderten Apoptosegene könnten auch Einfluss auf die Zahl der getöteten Zielzellen gehabt haben, da durch die Messungen mit dem Durchflusszytometer nur gemessen werden kann, dass Zellen abgestorben sind, nicht aber, warum sie tot sind, sei es durch Wirkung der NK-Zellen oder z. B. durch Induktion von Apoptosegenen, die zum Zelltod führen.

Insgesamt sprechen unsere Versuche tatsächlich für eine Hemmung durch die vermehrte Expression der HLA-Moleküle. Dabei scheint die Inhibierung im Großen und Ganzen von der Anzahl der HLA-Moleküle abhängig zu sein. Es scheint sicher, dass die Zytotoxizität nicht nur durch das HLA gesteuert wird. Zusätzlich bewirkt das INF γ auf den Neuroblastomzellen weitere Veränderungen (z. B. ICAM-1, Apoptosegene), die Einfluss auf die NK-Zell-Steuerung haben. Dies bestätigten auch Prigione et al., 2004.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass immer mehr Oberflächenmoleküle auf NK-Zellen entdeckt worden sind. Auch diese Moleküle haben ihre Funktion in der NK-Zell-Aktivierung oder Inhibierung. Betrachtet man z. B. die bereits erwähnten NCRs (Bottino et al., 2000; Moretta et al., 2000), die nicht am HLA binden, deren genaue Bindungspartner jedoch noch nicht bekannt sind, so lassen sich folgende Aussagen machen: ihre Expression auf NK-Zellen variiert und es besteht ein direkter Zusammenhang

zwischen NCR-Dichte auf der Oberfläche von NK-Zellen und der Fähigkeit der NK-Zellen, verschiedene Tumorzellen zu töten (Moretta et al., 2001). Die NCR Dichte wurde in unseren Versuchen nicht gemessen. Dennoch muss die Beeinflussung der Messungen durch NCRs in Betracht gezogen werden. Auch dies spricht für die Vermutung, dass verschiedene Mechanismen bei den Versuchen eine Rolle gespielt haben, wobei HLA nur einer von vielen Faktoren ist. Es würde außerdem die verschiedenen Ergebnisse in der Literatur erklären. Die nachfolgende Graphik gibt einen zusammenfassenden Überblick über die bisher genannten Mechanismen.

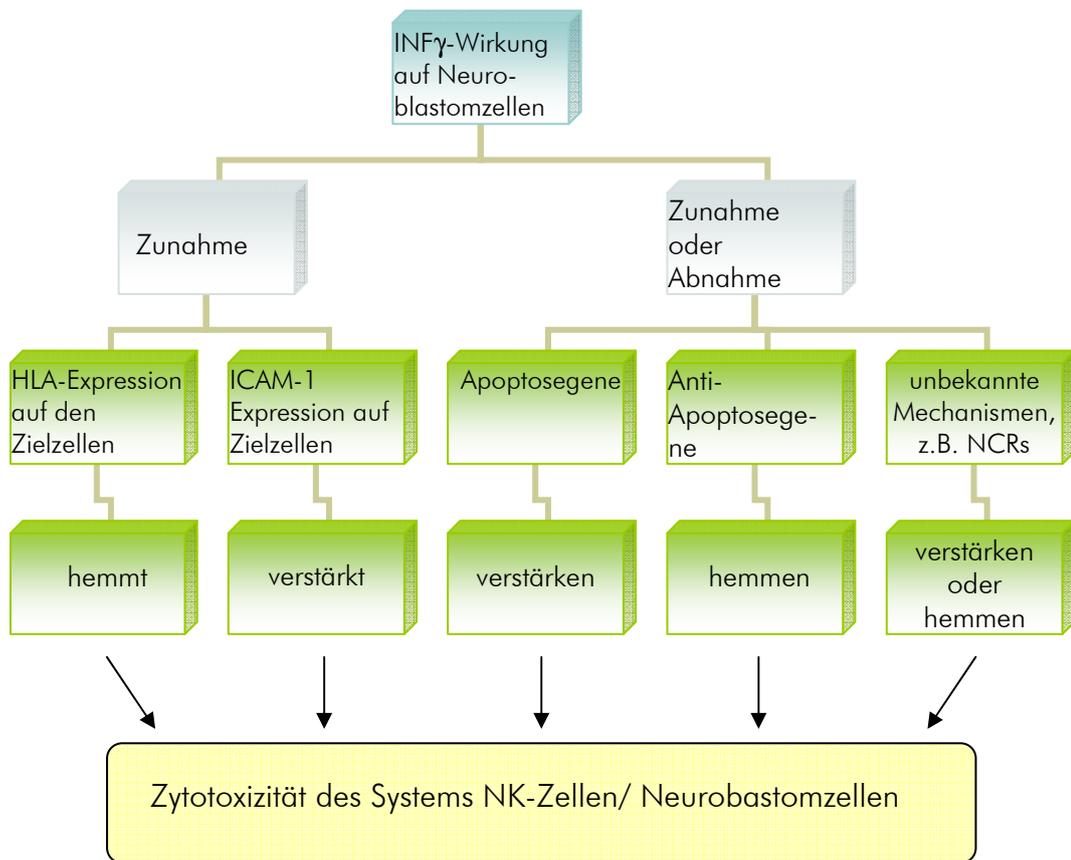


Abb. 5.1: Vereinfachte Darstellung der Wirkungen von $INF\gamma$ auf die Zielzellen und somit auf die Zytotoxizität von NK-Zellen. Der relative Beitrag der einzelnen Faktoren variiert von Zelllinie zu Zelllinie, was die unterschiedlichen Beobachtungen erklären kann.

5.5 Allospezifität von NK-Zellen

Weiterhin galt es zu untersuchen, ob die NK-Zellen eine Allospezifität aufweisen, d. h., ob sie sich anders verhalten in Bezug auf Zielzellen mit "selbst"- oder "fremd"-HLA-C Gruppe (siehe auch Tab. 1.1, Seite 11). Wenn dies der Fall wäre, würde das bedeuten, dass autologe NK-Zellen *in vivo* von HLA-präsentierenden Tumorzellen inhibiert werden. Das hätte große klinische Bedeutung. In der Studie von Ruggeri et al., 1999 wurde eine Allospezifität von NK-Zellen bei Versuchen mit Leukämiezellen nachgewiesen. Doch handelte es sich dabei um hämatopoetische Zellen und nicht um Zellen solider Tumoren.

Um einen HLA-Effekt überhaupt sichtbar zu machen, wurden IFN-behandelte SKNMC-Zellen verwendet (s.o.). Die anschließenden Untersuchungen mit dem Durchflusszytometer zeigten jedoch, dass erstaunlicherweise keine Allospezifität der NK-Zellen zu erkennen war (Abb. 4.8, Seite 55). Die Abnahme der Zytotoxizität nach HLA-Induktion war sowohl bei HLA-C-Kompatibilität als auch bei -Inkompatibilität in etwa gleich hoch. HLA an sich hemmt also die Zytotoxizität, die individuellen HLA-Ausprägungen spielen jedoch keine offensichtliche Rolle. Dies wäre aufgrund der missing-self Theorie zu erwarten gewesen. Dies ist von großem klinischen Interesse. Zum einen würde eine theoretische Allospezifität von NK-Zellen in der Tumorthherapie positive Effekte haben, da die Transfusion HLA-C inkompatibler NK-Zellen zur verstärkten Tumorlyse beim Empfänger führen würde. Die therapeutische Wirkung von NK-Zellen wäre somit größer als ohne Allospezifität. Dem gegenüber ist es jedoch für die Transplantation solider Organe von Vorteil, wenn keine Allospezifität vorliegt, da es hypothetisch seltener zu NK-Zell vermittelten Abstoßungsreaktionen nach Transplantation eines Organs kommen sollte (Young et al., 1997). Die derzeitige Praxis, bei der die HLA-C-Konstellation von Spender und Empfänger bei Transplantationen von soliden Organen nicht beachtet wird, muss demnach auch nicht geändert werden.

Unsere Ergebnisse bezüglich einer Allospezifität bei Zellen von soliden Tumoren werden von Igarashi et al., 2004 allerdings nicht bestätigt. Vielmehr ergaben hier die Versuche, dass NK-Zellen die verwendeten Zielzellen, Zellen eines Nierenzellkarzinoms und Me-

lanoms, vermehrt dann lysierten, wenn eine Inkompatibilität zwischen der HLA-C Gruppe der Zielzelle und des KIRs der NK-Zelle bestand. Wie sind diese unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären?

Die Diskrepanz, die die verschiedenen Resultate erklären könnte, liegt in der Vorbereitung der NK-Zellen. In unseren Versuchen haben wir darauf geachtet, dass die NK-Zellen von gesunden Spendern stammten, die entweder homozygot für die HLA-C Gruppe 1 oder für die HLA-C Gruppe 2 waren. Auch bei Igarashi et al. wurde dies so durchgeführt, doch folgte hier noch ein weiterer Schritt. Die NK-Zellen wurden hinsichtlich der Ausprägung von CD158b (KIR2DL2/3) und CD158a (KIR2DL1) selektiert. Dies ist ein wichtiger Unterschied. Die beiden Rezeptoren sind, wie schon erwähnt, für die Unterscheidung zwischen HLA-C Gruppe 1 und 2 verantwortlich. Es wurde immer wieder postuliert, dass NK-Zellen vorzugsweise die KIRs tragen, die zu der HLA-Gruppe des Individuums passen. Dies scheint jedoch nicht der Realität zu entsprechen. Es wurde herausgefunden, dass die KIRs der NK-Zellen eines Individuums unabhängig von der HLA-C Gruppe exprimiert werden. D. h., ein Individuum mit Zellen einer bestimmten HLA-C Gruppe kann unabhängig davon verschiedene KIRs auf den NK-Zellen tragen (Frohn et al., 1997; Young et al., 1998). Somit ist zu vermuten, dass die NK-Zellen in unseren Versuchen jeweils ein bestimmtes KIR-Repertoire besaßen, das nur teilweise oder eventuell auch gar nicht zu den KIR-Liganden der verwendeten Neuroblastomzellen passte. Somit ist es denkbar, dass die Zellen in unseren Versuchen deshalb nicht vom "selbst"-HLA stärker inhibiert wurden, weil nur einige KIRs daran binden konnten. Dies ist nur eine Vermutung. Man kann festhalten, dass unsere Versuche aufgrund der unterschiedlichen Vorgehensweisen nicht direkt mit denen von Igarashi et al. vergleichbar sind.

Es bleibt fraglich, ob in Zukunft in der Tumorthherapie die verwendeten NK-Zellen nach dem Schema von Igarashi et al. selektiert werden sollten, um sie KIR-inkompatibel Tumorpatienten verabreichen zu können. Da Igarashi auf diese Weise eine Allospezifität nachgewiesen hat, wäre es denkbar, eine größere Aggressivität von NK-Zellen gegenüber Krebszellen zu erreichen als bei der reinen Selektion von NK-Zellen, wie wir sie durchgeführt haben. Technisch wäre dieses Vorgehen unproblematisch durchführbar.

Wenn die durch Igarashi et al. nachgewiesene Allospezifität auch *in vivo* auftreten würde, dann wäre eine höhere Lyse von Tumorzellen durch die KIR-inkompatiblen NK-Zellen zu erwarten. Weitere Studien sollten hier anknüpfen. Es muss auch daran gedacht werden, dass die Transfusion KIR-inkompatibler NK-Zellen möglicherweise Unverträglichkeitsreaktionen hervorruft, die nach Transfusion von NK-Zellen gleicher HLA-C-Konstellation zwischen Spender und Empfänger nicht aufgetreten sind (Frohn et al., 2000), da die Spenderzellen das Empfänger-HLA-C der gesunden Zellen nicht als „selbst“ erkennen und dadurch womöglich nicht ausreichend gehemmt werden. Insgesamt sollten weitere Versuche, die die Selektion bestimmter KIR tragender NK-Zellen beinhaltet, bei der Tumorforschung berücksichtigt werden.

5.6 CD56

Das CD56 oder auch NCAM findet man sowohl auf Neuroblastom-, als auch auf NK-Zellen. Da es mit sich selbst, also homophil binden kann, lag die Vermutung einer Interaktion zwischen den Oberflächenrezeptoren nahe. In früheren Studien wurde sowohl die Aktivierung von NK-Zellen bestätigt (Palucka et al., 1992), als auch widerlegt (Lanier et al., 1991). Um auch die Möglichkeit der Aktivierung bzw. Inhibierung der NK-Zellen durch Bindung mit dem CD56-Rezeptor an anderen Oberflächenliganden als dem CD56 auszuschließen, wurde das neuronale Adhäsionsmolekül in unseren Versuchen nicht nur auf den Neuroblastomzellen, sondern auch auf den NK-Zellen selbst mit Antikörpern blockiert. Die Vermutung, dass das CD56 eine Rolle bei der Aktivierung oder Inhibierung von NK-Zellen eine Rolle spielt, ließ sich in unseren Versuchen jedoch nicht bestätigen (Abb. 4.10, Seite 58). Das CD56 scheint weder einen hemmenden, noch einen stimulierenden Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zu haben. Trotz allem ist nicht auszuschließen, dass das CD56 als Adhäsionsmolekül zwischen Neuroblastom- und NK-Zelle wirkt, dass dies jedoch keine Auswirkungen auf die Aktivität der NK-Zellen hat. Auch ist es denkbar, dass das CD56 als Adhäsionsmolekül, wie zu Beginn erwähnt, zwar in unseren statischen Versuchen

keine Wirkung hat, das es aber *in vivo*, also beispielsweise in der Blutstrombahn, für die Adhäsion der NK-Zelle an eine Zielzelle nötig ist.

5.7 Limitation der Versuche

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche machen Aussagen über NK-Zellen und ihr Verhalten bei Neuroblastomzellen *in vitro*. Bei allen derartigen Studien müssen grundsätzlich die folgenden Dinge beachtet werden. Bei Versuchen *in vitro* handelt es sich um Zytotoxizitätsassays im Röhrchen. Dies entspricht nicht den Bedingungen eines Tumors *in situ* und kann deshalb nur begrenzt für Aussagen über *in vivo* Verhältnisse herangezogen werden. Insgesamt ist es möglich, dass experimentelle Lyseraten von Neuroblastomzellen höher liegen als Lyseraten *in vivo*. Das liegt zum einen daran, dass in Versuchen Zelllinien verwendet werden. Diese sind möglicherweise empfindlicher als native Neuroblastomzellen *in situ*. Zum anderen wäre es denkbar, dass *in vitro* keine Adhäsionsmoleküle nötig sind (z. B. CD56), um eine Lyse durch NK-Zellen zu erreichen, da Zellen *in vitro* meist auf kleinem Raum und in Ruhe, also ohne störende Einflüsse der Umgebung (z.B. Blutfluss) inkubiert werden. In der Blutbahn könnten Adhäsionsmoleküle eine größere Bedeutung haben.

In Versuchen, in denen Patienten mit Tumorerkrankungen NK-Zellen transfundiert wurden, konnte eine Anreicherung von NK-Zellen in den Tumoren beobachtet werden (Brand et al., 2004; Meller et al., 2004). In unseren Versuchen wurden die E/T – Verhältnisse zwar klein gewählt mit 5:1 und 1:1, und sie sind deshalb den *in vivo* Bedingungen ähnlicher als Studien, in denen Versuche mit E/T Ratios von 50:1 verwendet wurden. Dennoch ist es sicher nicht möglich, dass *in vivo* ein derart hohes Verhältnis von NK-Zellen zu Neuroblastomzellen im Tumor erreicht wird wie in unseren Versuchen. Die hier und in anderen Studien durchgeführten experimentellen Versuche können deshalb nur eine begrenzte Aussagekraft für *in vivo* Verhältnisse haben.

5.8 Überblick

Es bleibt festzuhalten, dass

- NK-Zellen Neuroblastomzellen töten,
 - die Zytotoxizität dabei zum einen abhängig ist von der IFN γ -induzierbaren HLA-Präsentation auf den Zielzellen (viel HLA führt zu geringer Lyse),
 - gleichzeitig andere auf den Neuroblastomzellen durch IFN γ ausgelöste Mechanismen die Zytotoxizität der NK-Zellen beeinflussen (z.B. ICAM-1, Apoptosegene),
 - die NK-Zellen in dem untersuchten Modell keine Allospezifität aufweisen und
 - dass das CD56 keine Rolle bei der Aktivierung oder Inhibierung von NK-Zellen spielt.
-

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Neuroblastom ist ein Tumor, der hauptsächlich bei Kindern zu finden ist. Leider sind die Überlebenschancen im fortgeschrittenen Tumorstadium immer noch sehr gering. Wie bei vielen Tumoren kommt es auch beim Neuroblastom zu einer verminderten HLA-Expression der Zellen, was gegen den Einsatz von zytotoxischen T-Zellen in der Immuntherapie dieses Tumors spricht. Bei NK-Zellen hingegen ist es bekannt, dass sie Zellen vermehrt dann töten, wenn diese kein oder nur wenig HLA exprimieren ("missing-self" Hypothese). Die NK-Zellen stellen somit eine denkbare Therapieoption beim Neuroblastom dar.

In dieser Arbeit wurde untersucht, in welchem Maße NK-Zellen Neuroblastomzellen lysieren und welche Effekte dabei einzelne Oberflächenmoleküle, nämlich das HLA (insbesondere das HLA-C), ICAM-1 und CD56 haben. Dazu wurden Zytotoxizitätsbestimmungen in verschiedenen Effektor / Target - Verhältnissen mit dem Durchflusszytometer durchgeführt. Der Einfluss der HLA-Expression auf den Zielzellen wurde mit $\text{INF}\gamma$ -Stimulierung und anschließenden Antikörper-Blockierungsversuchen untersucht. Des Weiteren wurden NK-Zellen verschiedener HLA-C Gruppen (I,I und II,II) mit der Zelllinie SKNMC (Gruppe I, I) inkubiert, um eine mögliche HLA-C-Allospezifität der NK-Zellen zu untersuchen. Es folgten Blockungsversuche mit CD56-Antikörpern auf Neuroblastom- und NK-Zellen, um auch den Einfluss dieses Moleküls auf NK-Zell-Aktivität zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Neuroblastomzellen prinzipiell von NK-Zellen lysiert werden. Der Effekt der HLA-Induktion mit $\text{INF}\gamma$ war bei den einzelnen Neuroblastomzelllinien unterschiedlich. Bei Kelly und SKNMC kam es zu der erwarteten Zytotoxizitätsminderung der NK-Zellen, bei IMR32 und IMR5 hingegen zu einer -Zunahme. Dies ist zum Teil durch die unterschiedliche HLA- und ICAM-1-Expressionszunahme der Zellen zu erklären: die Zelllinien, bei denen eine starke HLA-Induktion zu beobachten war, wurden am wenigsten von den NK-Zellen lysiert. Das HLA scheint insgesamt im

Sinne der „missing-self“ Hypothese einen hemmenden Einfluss auf NK-Zellen zu haben. Insgesamt müssen aber auch andere, durch das INF γ - ausgelöste Mechanismen, bei der Aktivierung und Inhibierung von NK-Zellen eine Rolle gespielt haben.

Der HLA-C-Hintergrund des Zellspenders spielt keine Rolle für die Aktivierung von NK-Zellen, obwohl das nach der missing-self-Hypothese zu erwarten gewesen wäre. Eine Allospezifität bei den NK-Zellen ist in unserem Modell nicht zu erkennen. Dies widerspricht nicht anderen Ergebnissen, es sei denn, die NK-Zellen werden im Labor nach ihren KIR-Rezeptoren selektiert.

Das Blockieren von CD56-Rezeptoren ergab keine Änderung der Zytotoxizität von NK-Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass NK-Zellen für eine Immuntherapie beim Neuroblastom sehr interessant sind. Um eine möglichst starke zytotoxische Wirkung zu erzielen, könnten NK-Zellen im Labor vor der Anwendung nach ihren KIRs selektiert werden, was technisch durchführbar ist. Es sollten dann NK-Zellen mit den KIR Rezeptoren transfundiert werden, die zu den HLA-C-Molekülen des Empfängers inkompatibel sind, da auf diese Weise die größte Zytotoxizität zu erwarten ist – hypothetisch um den Preis einer verstärkten Transplantat gegen Wirt-Reaktion.

7. LITERATURVERZEICHNIS

7.1 Zeitschriften und andere Literaturstellen

1. **Ambros** PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, Ladenstein R, Fink FM, Horcher E, Printz G: Regression and progression in neuroblastoma. Does genetics predict tumour behaviour? *Eur J Cancer* 31: 510-515 (1995)
 2. **Berthold** F, Himmelmann U, Pohl U: Natural interleukin-2 and lymphokine activated killer cells in the treatment of neuroblastoma in vitro and in vivo. *Adv Neuroblastoma Res* 3: 417 (1991)
 3. **Biassoni** R, Falco M, Cambiaggi A, Costa P, Verdiani S, Pende D, Conte R, Di Donato C, Parham P, Moretta L: Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of Serine-77 and Lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J Exp Med* 182: 605-609 (1995)
 4. **Biassoni** R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L: The human leucocyte antigen (HLA)-C specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 183: 645-650 (1996)
 5. **Bossi** G and Griffiths GM: Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of FAS ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 5: 90-96 (1999)
-

6. **Bottino** C, Biassoni R, Millo R, Moretta L, Moretta A: The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Human Immunol* 61: 1-6 (2000)
 7. **Brand** JM, Meller B, Von Hof K, Luhm J, Bahre M, Kirchner H, Frohn C: Kinetics and organ distribution of allogeneic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells Dev* 13: 307-314 (2004)
 8. **Brooks** AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borrego F, Coligan JE: NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory NK cell receptor. *J Exp Med* 185: 795-800 (1997)
 9. **Carretero** M, Cantoni C, Bellon T, Bottino C, Biassoni R, Rodriguez A, Perez-Villar JJ, Moretta L, Moretta A: The CD94 and NKG2-AC type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 27: 563-573 (1997)
 10. **Chervenak** R, Wolcott RM: Target cell expression of MHC antigens is not (always) a turn-off signal to natural killer cells. *J Immunol* 140: 3712-3716 (1998)
 11. **Colonna** M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominge, JL: HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 12000-12004 (1993)
 12. **Dijstelbloem** HM, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM : Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol* 22: 510-516 (2001)
 13. **Escudier** B, Farace F, Angevin E, Charpentier F, Nitenberg G, Triebel F, Hercend T : Immunotherapy with interleukin-2 (IL2) and lymphokine- activated natural killer
-

- cells: improvement of clinical responses in metastatic renal cell carcinoma patients previously treated with IL2. *Eur J Cancer* 30A: 1078-1083 (1994)
14. **Edelman** GM: Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu Rev Cell Biol* 2: 81 (1986)
15. **Farag** SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA: Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100: 1935-1947 (2002)
16. **Favrot** MC, Floret D, Negrier S, Cochat P, Bouffet E, Zhou DC, Franks C R, Bijman T, Brunat-Mentigny M, Philip I: Systemic Interleukin-2 therapy in children with progressive neuroblastoma after high dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 4: 499 (1989)
17. **Frohn** C, Schlenke P, Kirchner H: The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology* 92: 567-570 (1997)
18. **Frohn** C, Schlenke P, Ebel B, Dannenberg C, Bein G, Kirchner H: DNA typing for natural killer cell inhibiting HLA-Cw groups NK1 and NK2 by PCR-SSP. *J Immunol Methods* 218: 155-160 (1998)
19. **Frohn** C, Doehn C, Durek C, Böhle A, Schlenke P, Jocham D, Kirchner H: Feasibility of the adoptive transfusion of allogenic HLA-matched NK-cells in patients with renal cell carcinoma. *J Immunotherapy* 23: 499-504 (2000)
20. **Frohn** C: NK-Lymphozyten für die Krebstherapie: Von der Biologie zur klinischen Anwendung. *Med. Habil. Schr. Lübeck* (2003)
-

-
21. **Gidlund** M, Orn A, Pattengale PK, Jansson M, Wigzell H, Nilsson K: Natural killer cells kill tumor cells at a given stage of differentiation. *Nature* 292: 848 (1981)
22. **Gumperz** JE and Parham P: The enigma of the natural killer cell. *Nature* 378: 245 (1995)
23. **Handa** K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y, Kumagai K: Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol* 130: 988-992 (1983)
24. **Handgretinger** R, Kimmig A, Lang P, Daurer B, Kuci S, Bruchelt G, Treuner J, Niethammer D: Interferon-gamma upregulates the susceptibility of human neuroblastoma cells to interleukin-2-activated natural killer cells. *Nat Immun Cell Regul* 8: 189-196 (1989)
25. **Herberman** RB, Nunn ME, Lavrin DH: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16: 216-229 (1975)
26. **Hercend** T, Farace F, Baume D, Charpentier F, Droz JP, Triebel F, Escudier B: Immunotherapy with lymphokine-activated natural killer cells and recombinant interleukin-2: a feasibility trial in metastatic renal cell carcinoma. *J Biol Response Mod* 9: 546-555 (1990)
27. **Hoshino** T, Winkler-Pickett RT, Mason A T, Ortaldo JR, Young HA: IL-13 production by NK-cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of INF-gamma. *J Immunol* 162: 51-59 (1999)
-

-
28. **Höppner** M, Luhm J, Schlenke P, Koritke P, Frohn C: A flow-cytometry based cytotoxicity assay using stained effector cells in combination with native target cells. *J Immunol Methods* 267: 157-163 (2002)
29. **Igarashi** T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy Jr JP, Takahashi Y, Suffredini DA, Linehan WM, Caligiuri A, Childs RW: Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood* 104: 170-177 (2004)
30. **Kärre** K: An uninspected petition for pardon. *Curr Biol* 2: 613-616 (1992)
31. **Kroesen** BJ, Mesander G, ter Haar JG, The TH, de Leij L: Direct visualisation and quantification of cellular cytotoxicity using two colour fluorescence. *J Immunol Methods* 25: 47-54 (1992)
32. **Lanier** LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH: Molecular and functional analysis of human natural killer cell associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 146: 4421-4426 (1991)
33. **Lanier** LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH: Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169: 2233 (1989)
34. **Lazetic** S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH: Human NK cell class I receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157: 4741-4745 (1996)
-

-
35. **Leiden** JM, Karpinski BA, Gottschalk L, Kornbluth J: Susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity is independent of the level of target cell class I HLA expression. *J Immunol* 142: 2140-2147 (1989)
36. **Litwin** V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL: NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 180: 537-543 (1994)
37. **Ljunggren** H-G, Kärre K: Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma cells. *J Exp Med* 162: 1745 (1985)
38. **Ljunggren** H-G, Kärre K: In search of the "missing self". MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11: 237-244 (1990)
39. **Luhm** J, Brand J-M, Koritke P, Höppner M, Kirchner H, Frohn C: Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application. *J Hematotherapy & Stem Cell Research* 11: 651-657 (2002)
40. **Main** EK, Lampson LA, Hart MK, Kornbluth J, Wilson DB: Human Neuroblastoma cell lines are susceptible to lysis by natural killer cells but not by cytotoxic T-lymphocytes. *J Immunol* 185: 242-246 (1985)
41. **Marlin** SD and Springer TA: Purified intercellular-adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte-function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51: 813-819 (1985)
42. **Matthay** KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP: Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous
-

- bone marrow transplantation and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 341: 1165-1173 (1999)
43. **Mehrotra** PT, Donnelly RP, Wong S, Kanegane H, Geremew A, Mostowski HS, Furuke K, Siegel JP, Bloom ET: Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. J Immunol 160: 2637-2644 (1998)
44. **Meller** B, Frohn C, Brand FM, Lauer I, Schelper LF von Hof K, Kirchner H, Richter E, Baehre M: Monitoring of a new approach of immunotherapy with allogenic (111)In-labelled NK cells in patients with renal cell carcinoma. Eur J Nucl Med Mol Imaging 31: 403-7 (2004)
45. **Moretta** A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R, Barbaresi M, Ciccone E, Moretta L: P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. J Exp Med 178: 597-604 (1993)
46. **Moretta** A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L: Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. J Exp Med 182: 875-884 (1995)
47. **Moretta** A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L: Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-mediated cytotoxicity. Immunol Today 21: 228-296 (2000)
48. **Moretta** A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol 19: 197-223 (2001)
-

-
49. **Naganuma** H, Kiessling R, Patarroyo M, Hansson M, Handgretinger R, Grönberg A: Increased susceptibility of INF-gamma-treated neuroblastoma cells to lysis by lymphokine-activated killer cells: participation of ICAM-1 induction on target cells. *Int J Cancer* 47: 527- 532 (1991)
50. **Nitta** T, Yagita H, Sato K, Okumura K: Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 170: 1757-1761 (1989)
51. **Ojo** E and Wigzell H: Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumor target cells. *Scand J Immunol* 7: 297-306 (1978)
52. **Ortaldo** J R and Hiserodt JC: Mechanisms of target cell killing by natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 2: 39-42 (1989)
53. **Palucka** AK, Porwit A, Reizenstein P: A supportive role of neural cell adhesion molecule (NCAM) in adhesion between leukaemic blasts and cytotoxic lymphocytes. *Scand. J Immunol* 35: 399-406 (1992)
54. **Pende** D, Parolini S, Pessiono A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Acame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190: 1505-1516 (1999)
55. **Podack** ER: Perforin, killer cells and gene transfer immunotherapy for cancer. *Curr. Top. Microbiol Immunol* 198: 121-130 (1995)
-

-
56. **Prigione** I, Corrias MV, Airoidi I, Raffaghello L, Morandi F, Bocca P, Cocco C, Ferrone S, Pistoia V: Immunogenicity of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 1028: 69-80 (2004)
57. **Raffaghello** L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Morandi F, Bocca P, Gambini C, Ferrone S, Pistoia V: Mechanisms of immune evasion of human neuroblastoma. *Cancer Lett* 228: 155-161 (2005)
58. **Routes** JM: IFN increases class I MHC antigen expression on adenovirus-infected human cells without inducing resistance to natural killer cell killing. *J Immunol* 149:2372-2377 (1992)
59. **Ruggeri** L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A: Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94: 333-339 (1999)
60. **Schilling** FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J, Zorn U, Michaelis J: Neuroblastoma screening at one year of age. *N Eng J Med* 346: 1047-1053 (2002)
61. **Schlick** S: Untersuchung des Einflusses von Interferon-gamma auf die NK-Zell-vermittelten Killing-Mechanismen von Neuroblastom-Zellen. Bachelorarbeit Molekulare Biotechnologie, Lübeck (2004)
62. **Schmidt** RE, Bartley G, Levine H, Schlossman SF, Ritz J: Functional characterization of LFA-1 antigens in the interaction of human NK clones and target cells. *J Immunol* 135: 1020-1025 (1985)
-

-
63. **Shimizu** Y, DeMars R: Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression. *Eur J Immunol* 19: 447-451 (1989)
64. **Sivori** S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A: p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule which mediates cell activation. *J Exp Med* 186: 1129-1136 (1997)
65. **Spix** C, Aareleid T, Stiller C, Magnani C, Kaatsch P, Michaelis J: Survival of children with neuroblastoma. Time trends and regional differences in Europe, 1978-1992. *Eur J Cancer* 37: 722-729 (2001)
66. **Stam** NJ, Kast WM, Voordouw AC, Pastoors LB, van der Hoeven FA, Melief CJ, Ploegh HL: Lack of correlation between levels of MHC class I antigen and susceptibility to lysis of small cellular lung carcinoma (SCLC) by natural killer cells. *J Immunol* 141: 17-20 (1989)
67. **Storkus** WJ, Howell DN, Salter RD, Dawson JR, Cresswell P: NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol* 138: 1657-1659 (1987)
68. **Storkus** WJ, Alexander J, Payne JA, Dawson JR, Cresswell P: Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2361-2364 (1989)
69. **Taga** K, Yamauchi A, Kabashima K, Bloom ET, Muller J, Tosato G: Target-induced death by apoptosis in human lymphokine-activated natural killer cells. *Blood* 15: 2411-2418 (1996)
-

-
70. **Tate** ED, Allison TJ, Pranzatelli MR, Verhulst SJ: Neuroepidemiologic trends in 105 US cases of pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *J Pediatr Oncol Nurs* 22: 8-19 (2005)
71. **Timonen** T, Ortaldo JR, Herberman RB: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 153: 569-582 (1981)
72. **Toren** A, Nagler A, Rozenfeld-Granot G, Levanon M, Davidson J, Bielorai B, Kaplinsky C, Meitar D, Mandel M, Ackerstein A, Ballin A, Attias D, Biniaminov M, Rosenthal E, Brock-Simoni F, Rechavi G, Kaufmann Y: Amplification of immunological functions by subcutaneous injection of intermediate-high dose interleukin-2 for 2 years after autologous stem cell transplantation in children with stage IV neuroblastoma. *Transplantation* 70, No. 7: 1100-1104 (2000)
73. **Vilches** C, Rajalingam R, Uhrberg M, Gardiner CM, Young NT, Parham P: KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. *J Immunol* 164: 5797-5804 (2000)
74. **Vitale** M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro R, Augugliaro R, Moretta L, Moretta L: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated Natural Killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187: 2065-2072 (1998)
75. **Warren** HS, Kinnear BF, Phillips JH, Lanier LL: Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10 and IL-12. *J Immunol* 154: 5144-5152 (1995)
-

76. **Winter** CC and Long EO: A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* 158: 4026-402 (1997)
77. **Young** NT, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI: (1997) Killer cell inhibitory receptor interactions with HLA class I molecules: implications for alloreactivity and transplantation. *Hum Immunol* 52: 1-11 (1997)
78. **Young** NT, Rust NA, Dallman MJ, Cerundolo V, Morris PJ, Welsh KI: Independent contributions of HLA epitopes and killer inhibitory receptor expression to the functional alloreactive specificity of natural killer cells. *Hum Immunol* 59: 700-712 (1998)

7.2 Elektronische Datenbanken

1. **Deutsches Kinderkrebsregister**: World Wide Web URL:
<http://www.kinderkrebsregister.de>
 - Auswertungen im Detail: Neuroblastome, Deutschland 1999-2003
 - Jahresbericht 1998: Überlebenszeitanalysen
 2. **DSMZ** (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH):
World Wide Web URL :
<http://www.dsmz.de>
-

8. ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
7-AAD	7-Ammino-Actinomycin (DNA-Farbstoff)
ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)
Ak	Antikörper
Aqua dest.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation; internationale Nomenklatur, die Lymphozyten-Oberflächenmoleküle, welche einen Aufschluss über die Differenzierungslinie geben, katalogisiert
CD56	klassischer humaner NK-Zell-Marker (Synonym: N-CAM, homonymes Adhäsionsmolekül)
CD3	T-Zell-Marker, mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiertes Molekül
CD16	Fc- γ -Rezeptor RIII (auf manchen NK-Zellen exprimiert)
CD 158	CD-Nomenklatur für KIR2DL1-3
D275	Membranfluoreszenzfarbstoff, Synonyme: DIOC18; 3'3 Dioctadecylcarbocyanin-Perchlorat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E / T	Effektor / Target

FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
FSC	forward light scatter
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Floresceinisothiocyanat
G	Guanin
g	Erd- / Gravitationsbeschleunigung
h	Stunde (hour)
HAM's	Kulturmedium
HLA	Humanes Leukocytenantigen (human leukocyte antigen)
ICAMs	intracellular adhesion molecules
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Kulturmedium (Iscoe´s Modified Dulbecco´s Medium)
KIR	Killer cell immunglobuline receptor, früher: Killer cell inhibitory receptor (die zweite Übersetzung ist in den letzten Jahren weniger gebräuchlich)
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle (lymphokine activated killer cell)
LFA-1	leucocyte function-associated antigen 1
LGL	große granuläre Lymphozyten (large granular lymphocytes)
MACS	magnetische Zelltrennung (magnetic cell separation)
n	Anzahl der Versuche
NCAM	Adhäsionsmolekül (neural cellular adhesion molecule)
NCR	natural cytotoxicity receptor
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (non-essential amino acids)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Periphere Blut monozytäre Zellen (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PC5	R-Phycoerythrin-Cyanin 5

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PCR-SSP	Polymerase-Kettenreaktion mit Sequenz-spezifischen Primern
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Kulturmedium (Roswell Park Memorial Institute Medium)
SSC	sideward light scatter
T	Thymin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-DNA-Polymerase
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxyaminomethan
U	Unit

8.2 Danksagung

Zunächst einmal möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Kirchner danken, der es mir ermöglicht hat, die Arbeit am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin durchzuführen.

Ganz großer Dank geht an PD Dr. med. Christoph Frohn, der immer bereitwillig gelesen hat, was ich ihm dargeboten habe, und mir jederzeit mit guten Vorschlägen zur Seite stand. Danken möchte ich ihm auch für die Ideen, die ganz am Anfang zu dieser Arbeit geführt haben.

Ganz herzlich möchte ich auch Petra Koritke danken, die mir mit ihren weit reichenden Kenntnissen im Labor immer wieder bei der Durchführung der Versuche geholfen und mir mit Rat und Tat bei Seite gestanden hat, wenn das eine oder andere Problem gelöst werden musste. Es war eine Freude, mit ihr im Labor zusammenzuarbeiten.

Auch Prof. Dr. med. Bucsky gilt mein besonderer Dank, da er mir am Anfang zu dieser Doktorarbeit verholfen und die Grundlagen für die Neuroblastomversuche, inklusive der Beschaffung der Zellen, gelegt hat.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre, die ich während meiner Zeit bei Ihnen genießen durfte.

Und natürlich geht auch ein Dank an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Kathrin Fredecke
Geburtsdatum: 19. April 1979
Geburtsort: Helmstedt

Schulische Ausbildung:

1985-1987 Grundsule Büddenstedt
1987-1989 Grundsule Offleben
1989-1991 Orientierungsstufe Esbeck
1991-1998 Gymnasium Anna-Sophianeum Schöningen
1998 Abitur

Hochschul-Ausbildung:

Herbst 1998 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
September 2000 Physikum
August 2001 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
März 2004 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
10. Mai 2005 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
17. Juni 2005 Erteilung der Approbation

01/2002-07/2003 Experimenteller Teil der Dissertationsarbeit am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin

Berufliche Tätigkeit

seit 09/2005 Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe am Krankenhaus Neustadt am Rübenberge
