

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Verhalten von verschiedenen
Lymphozytenpopulationen und
Lymphozytenrezeptoren bei hämatologischen
Neoplasien und soliden Tumoren.**

Untersuchungen in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Elisabeth Perniß
aus Suhl

Würzburg, Dezember 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. V. Kunzmann

Koreferent: Professor Dr. med. H. Einsele

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

17. 10. 2011

Die Promoventin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Historie	1
1.2. Das menschliche Immunsystem	1
1.3. T-Zellen	2
1.4. NK-Zellen	3
1.5. Subpopulationen der NK-Zellen	4
1.6. Zusammenspiel der Immunzellen	4
1.7. Antigene von Tumorzellen	5
1.8. Antigenerkennung der Lymphozyten	5
1.9. Aktivierung und Proliferation der $\gamma\delta$-T-Zellen durch Zytokine	8
1.10. Zytokin- und Chemokinproduktion der T-Lymphozyten	8
1.11. Antitumor Effekt	8
1.12. Migration der Lymphozyten	9
1.13. Inhibierende und Aktivierende Rezeptoren	11
1.13.1. Inhibierende Rezeptoren	11
1.13.2. Aktivierende Rezeptoren	12
1.14. T-Zell Immunität und ihre Rolle in Tumoren	12
1.15. Effektorzell Apoptose	13
1.16. Problematik der Tumorerkennung	14
1.17. NKT-Zellen und Tumormmunität	15
2. Ziele der Untersuchungen	17
3. Material und Methoden	19
3.1. Verwendete Zellen und Antikörper	19
3.3.1. Spenderzellen aus Vollblut 1 Kontrollgruppe und zweier Patientengruppen	19
3.1.2. Monoklonale Antikörper für die FACS-Analyse	22
3.2. Waschpuffer und Lösungen	22
3.3. Methode	23
3.3.2. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	23
3.3.3. ELISA	24
3.4. Geräte	26
4. Ergebnisse	27
4.1. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen	27
4.1.1. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen mit signifikanten Ergebnissen	28
4.1.2. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen ohne signifikante Ergebnisse	37

4.2. Löslicher NKG2D Ligand im Serum	50
4.2.1. Korrelation zwischen dem löslichen NKG2D Ligand und den aktivierten Oberflächenrezeptoren	52
5. Diskussion	67
5.1. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen bei hämatologischen und soliden Tumoren im Vergleich zu gesunden Personen	67
5.2. Korrelation zwischen löslichen NKG2D Liganden und der Expression von aktivierenden Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen und Lymphozyten	74
6. Zusammenfassung	77
7. Abkürzungsverzeichnis	78
8. Literaturverzeichnis	80

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Historie

Paul Ehrlich et al. fand bereits vor mehr als 100 Jahren in tierexperimentellen Untersuchungen heraus, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Abwehr von malignen Tumoren spielt. Schon damals entdeckte man, dass ein Defekt innerhalb des Immunsystems die Tumorabwehr verschlechtert. 1953 wurden durch Foley et al. im Tierexperiment erstmals tumorspezifische Antigene nachgewiesen. In den 70'igern des 20. Jahrhunderts fand man dann auch bei menschlichen Tumoren tumorspezifische Antigene und spezifische Antikörper, z.B. HLA-Antigene beim Malignen Melanom (Morton et al.), Kolonkarzinom (Gold et al) und Neuroblastom (Hellström et al). 1976 entdeckte Krüger et al. eine Verminderung der Anzahl der T-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit malignen Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen im Vergleich zu gesunden Personen. Weiterhin wurden im Serum von Tumorpatienten Faktoren nachgewiesen, die die Funktion der Lymphozyten blockierten (Hellström et al. 1970, Bransal et al., Sprengel et al).

1.2. Das menschliche Immunsystem

Man unterteilt das menschliche Immunsystem in zwei Kategorien, das Spezifische (erworbene oder adaptive) und das Unspezifische (angeborene). Beide Systeme arbeiten sowohl mit humoralen als auch mit zellulären Komponenten. Die unspezifische Immunität ist die „first line of defence“. Sie wirkt direkt abwehrend ohne einen Antigen-Antikörper-Komplex aufzubauen. Dadurch ist das unspezifische Immunsystem zwar schnell, es steht aber damit einer mangelnden Spezifität gegenüber.

Das unspezifische Immunsystem besteht aus humoralen Faktoren, wie dem Komplement-System, den Akute Phase Proteinen, Interferon- α und Zytokinen (Interleukin 1 und 6, TNF- α) und aus unspezifischen Abwehrzellen, wie Makrophagen, Monozyten, Mastzellen und Granulozyten, natürlichen Killer-Lymphozyten. Das spezifische Immunsystem ist die sog. „second line of defence“. Es besteht aus einer

zellulären Ebene (T- und B-Lymphozyten), die antigenspezifisch arbeitet und ihre Wirkung über humorale Mediatoren (Immunglobuline (IgE, IgG, IgM, IgA), Interferon γ und spezifische Zytokine (Interleukin 2, 4, 5) entfalten. Diese Art der Immunantwort benötigt ein sog. Processing, welches die nicht löslichen intakten Antigene in lösliche Peptide zerlegt und als HLA (Human-Leukozyten-Antigen)-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) angeboten bekommt. Zu den APZ gehören B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Um zu vermeiden, dass sich das Immunsystem gegen den eigenen Organismus richtet, besitzen diese Zellen die Eigenschaft, körperfremd gegen körpereigen zu unterscheiden. Gelingt dies nicht, kommt es zu Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Rheuma oder Multiple Sklerose.

Für die Abwehr von malignen Tumoren ist vor allem die zelluläre Immunantwort verantwortlich, insbesondere T-Lymphozyten, NK-Zellen und NKT-Zellen.

1.3. T-Zellen

Die T-Lymphozyten leiten sich von den lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks ab und entwickeln sich im Thymus weiter. 75% der mononukleären Zellen im Blut sind T-Lymphozyten. Sie exprimieren den sog. T-Zell-Rezeptor, TCR, dieser besteht aus 2 Aminosäureketten, den Oberflächenmarker CD3 und einem Kalziumkanalprotein. Die größte Gruppe der T-Lymphozyten im peripheren Blut bilden $\alpha\beta$ Heterodimere TCR (90%) aus, welche strukturell die Expression der Oberflächenmarker CD4 (2/3 der Zellen) oder CD8 (1/3 der Zellen) tragen. Weniger als 5% der zirkulierenden T-Lymphozyten bilden den $\gamma\delta$ -TCR aus. Dieser $\gamma\delta$ Rezeptor wurde 1986 von Brenner bei der Sequenzierung des $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptors entdeckt (19). Gammadelta T-Zellen repräsentieren eine der größten Zellgruppe im Mukosa assoziierten lymphoiden Gewebe (MALT) und haben viele Gemeinsamkeiten von T-Lymphozyten und den natürlichen Killerzellen. Sie sind in ihrer Entwicklung, die ein bis 10 Jahre dauern kann, abhängig von Umwelteinflüssen und mikrobiellen Infektionen (3). Wiederum wurden 6 Untergruppen der $\gamma\delta$ -Zellen gefunden, die unterschiedliche variable Regionen der Delta-Kette aufweisen. 97% der normalen $\gamma\delta$ -Zellen im normalen humanen Gewebe

und im peripheren Blut gehören zu V δ 1 (20-30%) oder V δ 2 (60%) Untergruppe. Die V δ 2 liegen meist mit einer variablen V γ 9-Kette assoziiert vor und sind CD45 RO positiv, was einer Gedächtniszelle (memory cell) entspricht. Wobei V δ 1 meist eine variable V γ -Ketten besitzt und CD45RA positiv sind, welches ein Marker für eine native Zelle ohne Antigenkontakt darstellt.

Der Anteil der V δ 1 Population im peripheren Blut nimmt mit dem Alter ab. Im Nabelschnurblut werden bis zu 50% an V δ 1 Zellen nachgewiesen, wobei es im Erwachsenen Alter nur noch 20-30% sind. Sie werden durch V γ 9 δ 2-Zellen ersetzt. Die Zahl der $\gamma\delta$ -Zellen kann im peripheren Blut des Erwachsenen zwischen 0,5-10% schwanken. Sie ist abhängig von Infektionen, wobei die Zahl bei Krankheit ansteigt und post-infektiös wieder auf den Ausgangswert abfällt.

V δ 2 TCR exprimierende Zellen befinden sich im peripheren Blut (50-90%), im Thymus (1-20%) und in Lymphknoten, Tonsillen und Haut (10-30%). V δ 1 TCR exprimierende Zellen sind in Epithelgewebe und der Milz (30-60%) sowie im Thymus (50-70%).

1.4. NK-Zellen

Die natürlichen Killerzellen bilden eine separate Gruppe der Lymphozyten, die in der Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen und maligne entartete Zellen spielen. Im Unterschied zu den T-Zellen sind sie auf der einen Seite nicht antigenspezifisch und können ohne vorherige Antigenexposition sofort eine Zielzelle zerstören. Auf der anderen Seite charakterisiert sie zudem eine Menge an antigenspezifischen Rezeptoren, solche wie Ig oder T-Zell-Rezeptoren (TCR). Die Rolle der Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen wurde schon 1975 in vitro erkannt (122). In der heutigen Zeit wird immer mehr gegenwärtig, dass NK-Zellen durch Tumorzellen aktiviert werden, die dann eine Antitumor-Reaktion auslösen. Man weiß ebenfalls, dass eine niedrige Anzahl an NK-Zellen im peripheren Blut bei Menschen zu einem erhöhten Risiko an Karzinomen führt (Imai et al. 2000).

1.5. Subpopulationen der NK-Zellen

Es gibt verschiedene Rezeptoren auf NK-Zellen, zwei davon sind CD56 und CD16. Diese Marker steigern das Potential der Zytokinproduktion und erhöhen die Zytotoxizität der Zellen. Einige Studien haben gezeigt, dass CD56+ NK-Zellen sowie CD16+ NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunantwort bei Karzinom spielen, vor allem CD56+/CD16+ NK-Zellen (111, 112). Dieser Mechanismus wird heute schon in der Immuntherapie via ADCC (Antikörper vermittelte Zytotoxizität) z.B. bei Rituximab (α -CD20) und Trastuzumab (α -Her2/Neu) eingesetzt (114).

1.6. Zusammenspiel der Immunzellen

Die verschiedenen Immunzellen kommunizieren untereinander über Zell-Zell-Kontakte sowie über Botenstoffe durch Zytokine.

Die Stimulation des Zell-Zell-Kontakts läuft über den TCR ab, der noch zusätzlich ein kostimulierendes Signal benötigt. Dies wird über Oberflächenproteine, sog. Liganden vermittelt. Die Produktion der Zytokine ist abhängig von der jeweiligen T-Zelle. CD4 positive Zellen produzieren vermehrt Interleukin 4, 5, 9, 10, 13, welche Mastzelle, B-Lymphozyten und Eosinophile aktivieren. Die CD8 positiven Zellen produzieren hingegen Interferon- γ , Interleukin 2 und TNF- α , welche Makrophagen aktiviert.

Die Antigenpräsentation der $\gamma\delta$ -T-Zellen kann im Gegensatz zu der $\alpha\beta$ -T-Zelle HLA unabhängig verlaufen (22). Das bedeutet, $\gamma\delta$ -Zellen sind damit „nicht HLA-restringiert“ und haben so die Möglichkeit gegen verschiedene Antigene zu wirken. Damit spielen sie eine wichtige Rolle bei der „first line of defence“ und sind unentbehrlich bei Abwehrreaktionen gegen Pathogene, z.B. im Respirations- und Gastrointestinaltrakt (23, 24). Für diese Hypothese spricht, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit Leishmaniose und Malaria (10, 11, 13, 14), Darm- und Lungen-Tuberkulose, Salmonellose, Brucellose und Tularämie (11, 15, 16, 17, 18) sowie bei viralen Infektionen (4, 5, 6, 7, 8, 9) gefunden wurden oder in Hautgranulomen bei Lepra Erkrankung und bei gramnegativen Bakterien. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen haben also nicht nur die

Aufgabe gegen intrazelluläre Pathogene wie Bakterien, Viren und Protozoen zu kämpfen sondern auch gegen Tumorzellen.

1.7. Antigene von Tumorzellen

Antigene, die nur auf Tumorzellen und nicht auf normalen Zellen auftreten, sind die Voraussetzung dafür, dass Tumorzellen als nicht normale Zellen erkannt werden und es zu einer Antitumorimmunantwort kommen kann. Bis jetzt gibt es zwei Gruppen der Antigene, tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene. Tumorspezifische Antigene (TSA) gehören zu der Gruppe der HLA-Klasse-1-Moleküle. Es sind immunogene Peptide, die aus onkogenen Viren stammen oder Glycoproteine, die von Tumorzellen stammen, die Sialylsäure an das Oligosaccharidende der Glycoproteine anhängen (27). Tumorassoziierte Antigene (TAA) werden nicht nur von Tumorzellen exprimiert, sondern auch von normalen Zellen. Sie unterscheiden sich nur in der Anzahl und der zeitlichen Abfolge. TAA werden während der embryonalen Periode auf normalen Zellen exprimiert, wobei sie postnatal wieder verschwinden. Bei einigen Tumoren tauchen diese wieder auf, z.B. das Alpha-Fetoprotein (AFP) oder das karzinoembryonale Antigen (CEA).

1.8. Antigenerkennung der Lymphozyten

Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen auf unterschiedliche Antigene reagieren. Dazu gehören Selbstantigene, mikrobielle und nicht mikrobielle Antigene, Proteine und Nichtproteine sowie Virus-Glycoproteine (29). Ein ähnliches Muster der Proteinerkennung wurde auch im Menschen entdeckt. Der V δ 2 L (Ligand) erkennt durch den T-Zell-Rezeptor ein bislang unbekanntes Antigen, welches durch HSV infizierte Zellen exprimiert wird. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Vg9Vd2-Lymphozyten Proteine erkennen, die zur Hitze Schock Protein Familie (HSPs) gehören, die durch „Stress“ veränderte Zellen exprimiert werden (32,41).

$\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen im speziellen bestimmte Tumorantigene, die $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht erkennen können. Darum spielen sie in der Tumorüberwachung eine große Rolle.

Klinisch wird solches Wissen schon heute in der Therapie der Rezidiv-Leukämie eingesetzt. Hierbei werden Patienten Spender-T-Lymphozyten zur Rezidivbehandlung transfundiert, die gezielt die Leukämiezellen als fremd erkennen und diese lysieren, ohne dass eine erneute Strahlen- oder Chemotherapie notwendig ist (42).

Es gibt vier große Gruppen von Nicht-Peptid-Antigenen, die $\gamma\delta$ -T-Zellen anregen können, genauer gesagt Pyrophosphomonoester (Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-pyrophosphat (HDMAPP), Isopentenyl Pyrophosphat (IPP)), Alkylamine und Aminobisphosphonate (30, 31).

Phosphoantigene IPP und DMAPP wirken direkt auf $V\gamma 9V\delta 2$ -Zellen über den „Mevalonat Signalweg“, der in Säugetierzellen und Mikroorganismen vorkommt. Normalerweise ist die Konzentration in nicht transformierten / gesunden Zellen dafür zu niedrig. Manche Tumoren produzieren so hohe Konzentrationen, dass IPP als Tumorantigen für $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen dient (57,58). Bereits heute kann man mit Hilfe von Medikamenten die Synthese von IPP manipulieren. So werden Aminobisphosphonate (Pamidronat, Zoledronat) in der Immuntherapie bei Osteoporose und Knochenmetastasen eingesetzt. Diese hemmen Enzyme des IPP-Prozessings in Osteoklasten und induzieren damit den Zelltod, mit dem Nebeneffekt, die $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen zu aktivieren (39, 57, 58). HDAMP wirkt über einen „non-mevalonate Signalweg“ spezifisch für Prokaryonten und Eukaryonten. Dieser Weg fordert keine Antigen-Präsentation bzw. MHC-Moleküle (32-36). Gegenstand der Forschung ist weiterhin, wie genau Phosphatantigene durch den $\gamma\delta$ -TCR erkannt werden.

Alkylamine, wie Isobutylamin (IBA) und Secbutylamin (SBA), benutzen ähnlich wie IPP den „Mevalonat Signalweg“ zur Aktivierung der $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen (58, 60).

Die letzte Gruppe, die durch den TCR erkannt werden, sind Antigene, welche eine mitochondriale F1-ATPase-verwandte Struktur oder Apolipoprotein A-1 aufweisen (59). Um Antigene auf anderen Zellen erkennen zu können, benötigen die NK-, NKT-Zellen und T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche sog. NKR's (Natural Killer Cell Receptors), wie z.B. NKG2D, der die Zytotoxizität und die Funktion dieser Zellen beeinflussen kann. Der NKG2D Ligand ist durchaus gut erforscht und auf vielen epithelialen Tumoren auszumachen, im Gegensatz zu anderen bis jetzt unbekanntem Tumor-Rezeptor-Liganden. Neben dem Ligand NKG2D sind weitere MHC-1-Klasse-

Moleküle, wie MICA/B, CD1c und UL-16-bindungs-Protein 1-3 (ULBP's) bekannt, die durch Hitze Schock, oxidativem Stress oder genetische Veränderungen ausgebildet werden. Solche MICA/B, CD1c und ULBP exprimierende Zellen werden von V δ 1 der $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt und getötet (53, 54). NKG2D positive V δ 1 $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen möglicherweise MICA/B exprimierende Tumorzellen über die Stimulation des TCR und/oder NKG2D, was zu einer zellulären Abwehr und Tumorzelllyse führt. Diese NKG2D-Liganden der Tumorzelle können von der Oberfläche abgegeben werden und im Serum die Aktivität der NK und CD8 T-Zelle durch die Herunterregulation des NKG2D Rezeptoren hemmen. Weiterhin wirkt die ständige Interaktion von NKG2D und MICA inhibierend auf die NKG2D Expression der zytotoxischen Zellen. Daten bestätigen, dass MICA im Serum bei Tumorpatienten sowohl alleine als auch in Anwesenheit von TGF- β 1, die Immunreaktion hemmen, indem sie die Expression des NKG2D Rezeptors auf NK-Zellen herunterregulieren ohne andere Rezeptoren (CD 94/NKG2A, CD44, CD16, 2B4 oder CD56) zu beeinflussen (28, 55).

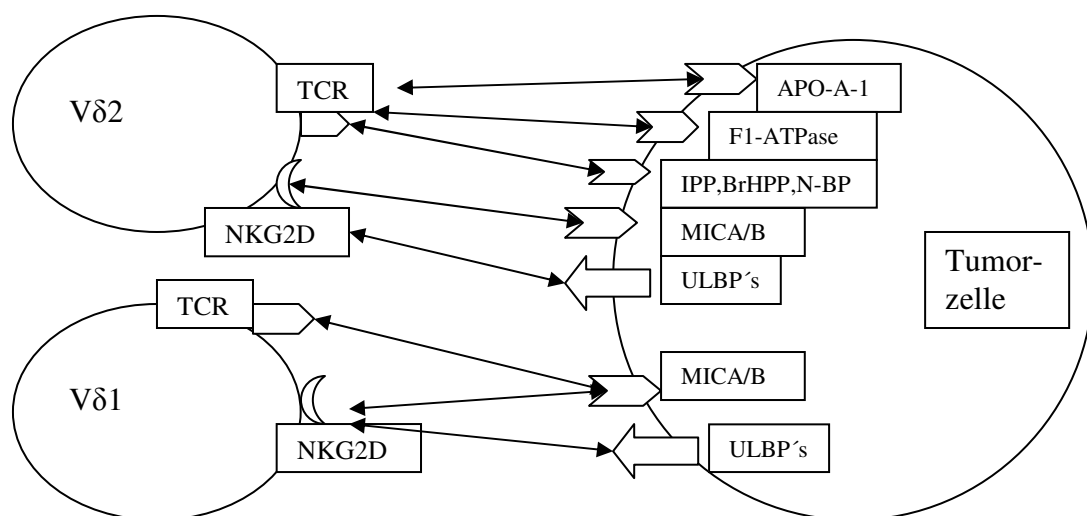


Bild 1. Erkennung Tumorzell-Liganden von $\gamma\delta$ T-Zellen.

Die dominante Population der V δ 2V γ 9 T-Zellen sowie V δ 1 erkennen über den TCR Nicht-Peptid Phosphoantigene, z.B. Isopentenyl Pyrophosphat (IPP), Bromohydrin pyrophosphat (BrHPP), Aminobisphosphonate (N-BP), F1-ATPase oder das Apoprotein A-1. MICA/B und ULBP's werden ebenfalls auf der Tumorzelloberfläche exprimiert und dienen als Liganden für die NK-Zell-Rezeptor NKG2D, welcher auf V δ 1 und V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen zu finden ist.

1.9. Aktivierung und Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Zytokine

Anstelle der zellvermittelten Signale (CD27/CD70, CD80/CD28, CD86/CD80, CD48/2B4, CD40/CD40L, CD2/LFA3, LFA/ICAM, NKG2D/NKG2D L) können auch verschiedene Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-18, IL-2, IL-15, IL-12) die Proliferation und Aktivität der $\gamma\delta$ -T-Zelle beeinflussen (45). IL-2 und IL-15 z.B. wurden als ein Wachstumsfaktor für T-Zellen beschrieben (46, 47). IL-12 induziert bei $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen eine Expression an Molekülen, wie CD56 (oder CD25), die einen Marker für Zytotoxizität darstellen (48). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zytokinproduktion der Makrophagen, z.B. IL-1 β , IL-6 und GM-CSF, keine Aktivierung oder Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen aufweist (48).

1.10. Zytokin- und Chemokinproduktion der T-Lymphozyten

Gammadelta T-Zellen können sowohl Botenstoffe sezernieren als auch infizierte Zellen lysieren (45). Nach Phosphoantigen-Kontakt können verschiedene Zytokine gebildet werden, darunter INF- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und TNF- α . Die Freisetzung der jeweiligen Zytokine hat zur Folge, welche T-Zell-Immunantwort (Th1 oder Th2) in Kraft tritt. Man weiß heute, dass die V δ 2-Effektor-Gedächtniszelle (T_{EM}) in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden kann, zum einen die T-Helferzelle (T_{EMh}), welche verschiedene Chemokinrezeptoren exprimiert und zum anderen die zytotoxische NK-ähnliche CD16-positive T_{EMRA}-Zelle, die NK-Rezeptoren besitzt. Weiterhin gibt es eine Gruppe von CD16-negativen T_{EMh}-Zellen, die über Phosphoantigen-Stimulation Zytokine sezernieren, wobei die T_{EMRA}-Zelle dieses nur CD16 vermittelt kann (49).

1.11. Antitumor Effekt

Das Immunsystem besitzt zwei Wege der Anti-Tumor-Abwehr, das schließt biochemische Prozesse während des direkten Kontakts mit zytotoxischen Lymphozyten und freigesetzte lösliche Faktoren mit ein. Der erste Mechanismus läuft über lytische

Enzyme ab, die direkt gegen die Membran der Tumorzielzelle gerichtet sind. Der zweite beinhaltet Proteine, wie Fas Liganden (FasL) oder Cytokine, die die Apoptose der Zielzelle einleiten können. Der häufigste Weg zur Tumorelimination ist die Interaktion von Killerzelle und Zielzelle über den Fas/FasL, der eine Tumorzelllyse erreicht (83-85). Anti-Tumor Zytokine, wie TNF- α interagieren mit ihren Co-Rezeptoren via einen Apoptose Mechanismus, der ebenso die Interaktion des Fas/FasL mit vereinfacht (86,87). $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen sezernieren unter anderem IFN- γ , welches bei Kontakt mit infizierten oder transformierten Zellen gebildet wird (88).

1.12. Migration der Lymphozyten

Die Zellmigration ist wichtig für die Reifungsphase im Thymus und die Migration im entzündlichen Gewebe der T-Lymphozyten, $\gamma\delta$ -T-Zellen eingeschlossen. Sie ist abhängig von Adhäsionsmolekülen (76, 77) und der Interaktion von Chemokinen mit ihren dazu gehörigen Rezeptoren (78, 79). Funktionelle Studien haben gezeigt, dass zirkulierende $\gamma\delta$ -T-Zell-Migration von der Ausbildung von RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta und IP-10 abhängig ist (79, 80). $V\gamma 9V\delta 2$ Zellen exprimieren eine hohe Anzahl an CCR5 (Rezeptor für RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta) und CXCR3 (Rezeptor für IP-10/CXCL10/CXCL11 und Zytokine/SLC/CCL21), die sie phänotypisch als Th1 Zellen charakterisieren.

Daneben exprimieren $V\delta 1$ T Zellen des peripheren Blut CXCR1 Rezeptor für CXCL5/CXCL6/CXCL8 (IL-8).

Die Adhäsionsmoleküle (PECAM-1/CD31) interagieren mit endothelialen Rezeptoren und/oder Komponenten aus der sub-endothelialer Matrix (77). In beiden Fällen müssen die Zellen ihre Form verändern, um die endotheliale Zell-Junktion zu durchdringen. Man weiß, dass $V\delta 1$ PECAM-1 exprimiert, wohin gegen $V\delta 2$ NKRP1a besitzt, der zur Transmigration dient (81). Beide Moleküle dienen zur Lokalisation der Tumorzelle von zirkulierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen, zumal IL-12, ausgeschüttet von zerstörtem Gewebe, die Expression von NKRP1a erhöht und damit die Rezirkulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen beeinflusst (82). Das erklärt, warum beide Subgruppen unterschiedliche

Adhäsionsmoleküle und Wege der Transmigration benutzen, da sie an selektiven Geweben lokalisiert sind, siehe 1.4.

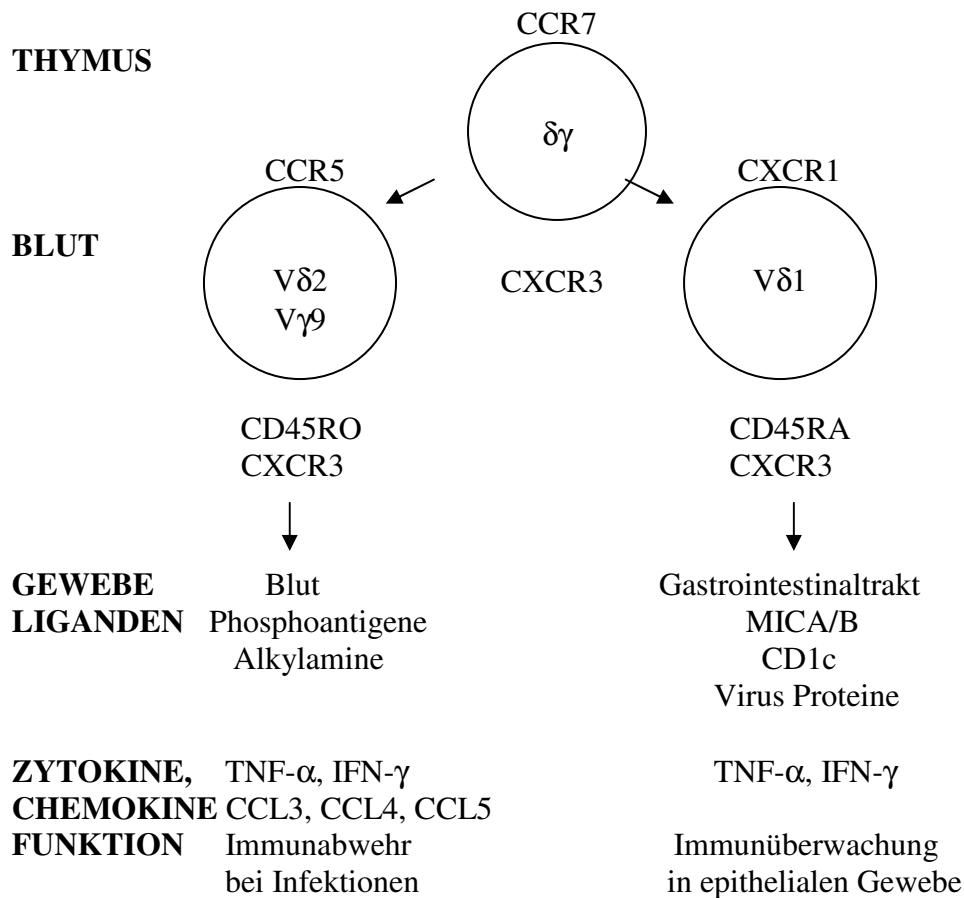


Bild 2. Die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren auf menschlichen $\gamma\delta$ -T-Zell-Untergruppen.

Im Thymus exprimiert die geringe Anzahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen ein Repertoire an Rezeptoren, unter anderem CCR7. Im peripheren Blut von Erwachsenen befindet sich bei der Vielzahl (95%) der zirkulierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Co-Expression von V δ 2 mit V γ 9. Diese Zellen besitzen an ihren Oberflächen CCR5 und sind CD45RO+, sog. Memory cells. V γ 9V δ 2-T-Zellen antworten nach bakteriellem Kontakt mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IFN- γ) und Chemokinen (CCL3, CCL4, CCL5) und spielen bei der Immunabwehr bei Infektionen eine wichtige Rolle. Im Gegensatz dazu, nehmen die V δ 1 exprimierenden Zellen einen geringen Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen ein und sind hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt zu finden, aber auch im peripheren Blut. Im peripheren Blut treten sie gehäuft mit CXCR1 und geringer Expression von CCR5 auf. Die V δ 1-Zellen erkennen MICA/B und CD1c auf „gestressten Zellen“ und einige Virus-Proteine ohne Antigenrepräsentation durch APC. Diese Zellart von epithelialen $\gamma\delta$ -T-Zellen spielt wahrscheinlich bei der Kontrolle der epithelialen Integrität eine Rolle. (93)

1.13. Inhibierende und Aktivierende Rezeptoren

Eine Klasse weiterer membranständiger Rezeptoren, die zur Tumorelimination führen, sind auf der Oberfläche der Immunzellen auszumachen. Dabei handelt es sich um die NKR (Natural Killer Cell Receptors), die zuerst nur für NK-Zellen beschrieben wurden. Diese Rezeptoren üben verschiedene Funktionen der Aktivierung (killer activating receptors, KAR) und Hemmung (killer inhibitory receptors, KIR) aus.

1.13.1. Inhibierende Rezeptoren

Vor allem KIRs (p58.2, p58.1, p70, NKG2A/CD94), die mit klassischen (HLA-A, B, and C) sowie auch mit nicht klassischen-MHC-Moleküle interagieren, verleihen den T-Lymphozyten die Fähigkeit, Zellen anzugreifen, die keine MHC-Klasse-1-Moleküle besitzen oder nur wenige (Virus infizierte Zellen oder Lymphom Zelllinie Daudi) (43,44). Die Aktivierung der Rezeptoren mit spezifischen monoklonalen Antikörper führt zu einer Freisetzung von zytolytischen Faktoren (Perforine, Granzym B, TIA1) (72) und zur Ausschüttung von Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α (123). Es gibt zwei Klassen der KIR Familie: eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Rezeptorfamilie (ISIR) und eine C-Typ-Lecitin-Inhibierende (CLIR). KIR blockiert die ersten Schritte der Aktivierungskaskade, indem sie die Kinase durch Tyrosinphosphat hemmt. Dadurch kann die zytolytische Aktivität der V γ 9V δ 2-T-Lymphozyten gegenüber Tumorzellen beginnen. Die Expression von KIR p58.2 auf V γ 9V δ 2-T-Lymphozyten z.B. ist spezifisch gegen die Gruppe zwei HLA-C gerichtet und wird im peripheren Blut von Leukämie-Patienten (AML) gefunden. Hier wurde gezeigt, dass autologe Leukämiezellen, welche wenig HLA exprimieren, angegriffen und lysiert werden (95). Zusammengefasst kann man sagen, dass durch die Aktivierung der KIRs auf $\gamma\delta$ -Zellen die Immunantwort gegen die Tumorzellen erleichtert wird.

1.13.2. Aktivierende Rezeptoren

Das Freisetzen von Zytokinen und zytolytischen Stoffe kann erreicht werden durch die Interaktion der T-Zelle via Rezeptor mit dem exprimierenden Liganden der Tumorzelle. Neben CD3/TCR Komplex und CD2 Rezeptor, welche in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten zu finden sind, erlangen die $\gamma\delta$ -T-Zellen ein CD69 Antigen durch die IL-2 Aktivierung (73). CD69 bewirkt ebenso eine zytolytische Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen. V δ 1 und V δ 2 Zellen besitzen einen spezifischen Oberflächenmarker Nkp44. Dieser gehört zu der Gruppe der „natural cytotoxicity receptors“ (NCRs), wie Nkp46 und Nkp33, wobei diese konstante Oberflächenmarker auf ruhenden und aktivierten Zellen darstellen und Nkp44 nur bei aktivierten Zellen zu finden ist (74). Man nimmt an, dass Nkp44 durch Virusinfektion oder Tumortransformation und bei Metastasierung auf den Immunzellen exprimiert wird. Nkp44 spielt bei der Zytolyse-Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Leukämie und soliden Tumorzellreihen eine Rolle (74). Durch die Stimulation von TNF- α und Phosphatantigene können $\gamma\delta$ -T-Zellen weiterhin CD16 auf ihrer Oberfläche exprimieren, z.B. CD16 positive V δ 2-Zellen bei HIV-1 Infektion (75).

1.14. T-Zell Immunität und ihre Rolle in Tumoren

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass V γ 9V δ 2-T-Zellen gegen mikrobielle Pathogene (Mykobakterien) und hämato-onkologische Tumorzellen zytotoxisch wirken (10, 32, 39, 41) und es dabei zu eine Erhöhung der Zellen im peripheren Blut kommt, wie es z.B. bei Burkitt-Lymphomzellen (39,40) wie Daudi oder Plasmozytom-Zelllinien RPMI 8226 (37,43), beim Kolorektalen Karzinom (61), pulmonalen Adenokarzinom (62), bei Ösophagus-Tumoren und Pankreas-Tumoren, beim Neuroblastom (63), Urothel-CA (64), Mamma-Carcinom (65, 66), Glioblastom (67) und Osteosarkom (68) berichtet wird. V δ 2 T-Zellen wurden zudem in einer hohen Anzahl bei klinisch gesunden Patienten nach erfolgter Knochenmarks-Transplantation bei akuter Leukämie gefunden (69). Möglich das sie deshalb eine wichtige Rolle bei der Graft versus Leukämie spielen. V δ 1 T-Zellen sind hauptsächlich im epithelialen Gewebe, wo sie die

„first line of defence“ gegen Infektionen und Malignome des Gastrointestinaltraktes und Respirationstraktes bilden (11, 22, 24, 41, 70).

Einen therapeutischen Nutzen zieht man daraus, indem man Aminobisphosphonate und synthetisch hergestellte Phosphoantigene (Bromohydrin; Pyrophosphate; Phosphostim®) gebraucht, um die Aktivität und Zytotoxizität der V δ 2 Zellen auf eine Anzahl von bestimmten epithelialen Tumoren zu erhöhen. In Anwesenheit von IL-2 kann die Zahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen darüber hinaus gesteigert werden (56). Bei verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Nieren-CA, Multiples Myelom) werden in der Therapie zwei Strategien verfolgt: einmal der adoptive Zelltransfer von in vitro expandierten $\gamma\delta$ -T-Zellen und einmal das in vivo applizieren von $\gamma\delta$ -stimulierenden-Phosphoantigenen oder Aminobisphosphonate mit einer geringen Menge von IL-2.

1.15. Effektorzell Apoptose

Programmierter Zelltod (programmed cell death, PCD), auch genannt Apoptose, ist ein Mechanismus, der das Immunsystem reguliert. Ein Netzwerk aus Kaskaden eliminiert und inaktiviert Lymphozyten während einer Immunreaktion und kontrolliert so das Immunsystem. Es ist denkbar, dass die Immunantwort über solche Prozesse z.B. beim Anti-Tumor-Effekt stark herunterreguliert wird. Tatsächlich wurde über die Interaktion der Daudi Lymphom Zellen mit $\gamma\delta$ -T-Zellen berichtet, dass diese vermehrt Apoptose eingehen können (89). Dieses Phänomen nennt man „activation induced cell death“ (AICD), der nicht nur nach Zellkontakt mit den Zielzellen eintritt, sondern auch durch lösliche Moleküle im Serum induziert werden kann. Lymphozyten exprimieren den „death receptor“ Fas und begehen in Anwesenheit von FasL den Zelltod (90). Dieser Fas Ligand wird in Vesikeln der Effektorzelle nach Aktivierung sezerniert (91). Es scheint, als ob der Aktivierungsrezeptor zur gleichen Zeit den Tod der Effektorzelle hervorbringt. Man hat außerdem gezeigt, dass HLA-1-Moleküle der Tumorzelle mit CD8 auf NK- und $\alpha\beta$ -T-Zellen zusammen wirken und Apoptose dieser Effektorzellen induzieren können. Bei Gammadelta T-Zellen läuft dieser Mechanismus über den CD3/TCR Komplex (nach Poggi et al., nicht veröffentlicht). Weiterhin werden durch

HLA-1-Molekülen von Tumorzellen KIRs auf $\gamma\delta$ -T-Zellen aktiviert, die zum PCD via Fas/FasL führen (92).

1.16. Problematik der Tumorerkennung

Tumorzellen haben einen Abwehrmechanismus, der ähnlich wie infektiöse Agenzien gegen die Beseitigung durch das Immunsystem des Wirts wirkt.

Erwähnenswert ist, dass Tumorantigene nur selten oder gar nicht auf der Oberfläche erscheinen (20) und damit eine starke Immunantwort unterdrücken können. Diese Tumorantigene unterliegen häufiger Mutationen und genetischen Veränderungen oder sie werden bei Tumorprogression herunterreguliert. Auch die Suche nach kostimulierenden Molekülen (Anergie) hält sich in Grenzen, was zu einer Verschlechterung der MHC und T-Zell vermittelten tumorspezifischen Immunantwort führt, z.B. werden verschiedene Glycolysierungsmuster, vor allem Salylsäure, an der Oberfläche von Tumorzellen angelagert, die dazuführen, dass eine Tumorzelle gegenüber der Immunantwort unsichtbar wird, sogenanntes „Tumor Escape“. Dieses Phänomen erkennt man auch bei Infektionen (21). Eine weitere wichtige Rolle spielen die Antikörper, die gegen die Tumorzellen gebildet werden. Meistens haben sie eine tumorwachsende Wirkung und keine hemmende. Dieses wird als „immunologisches Enhancement“ bezeichnet. Man nimmt an, dass sich die Antikörper an die Tumorantigene binden und diese somit vor den T-Lymphozyten maskieren und schützen. Unterschiedliche Tumoren können Zytokine (TGF- α 1, IL-10) mit immunsuppressiver Wirkung oder anderen Faktoren, wie lösliche MHC-1-Klasse-Moleküle MICA/B freisetzen, welche die Aktivität und Funktion über Oberflächenantigene des NKG2D TCR der $\gamma\delta$ -T-Zellen herunterregulieren (28). Interessant ist auch, wann der Tumor diese löslichen Stoffe z.B. MICA/B, TGF- β 1 produziert. Nämlich nicht zu Beginn der Tumorentstehung, wenn das Immunsystem noch hochaktiv gegen den Tumor wirkt, sondern erst bei Erreichen einer gewissen Größe bzw. bei Metastasierung der Tumorzellen, wenn das Immunsystem bereits geschwächt ist. Dann sind diese Tumoren fähig, die Immunreaktion aktiv zu unterdrücken (21). Außerdem spielt die Verweildauer und die Anzahl der Tumorzellen

und deren Antigenpräsentation im Lymphknoten eine wichtige Rolle, die meistens nicht ausreichend ist, um eine Immunantwort hervorzurufen (20). Auch die Größe der Tumormasse machen es den Killerzellen oft schwer in sie einzudringen oder überhaupt an sie heran zukommen, wie in immunologisch privilegierten Regionen, z.B. dem Gehirn. Zuletzt ist denkbar, dass eine chronische Stimulation über ein Antigen des Tumors, die $\gamma\delta$ -TIL's (Tumor infiltrated Lymphocytes) abschwächen.

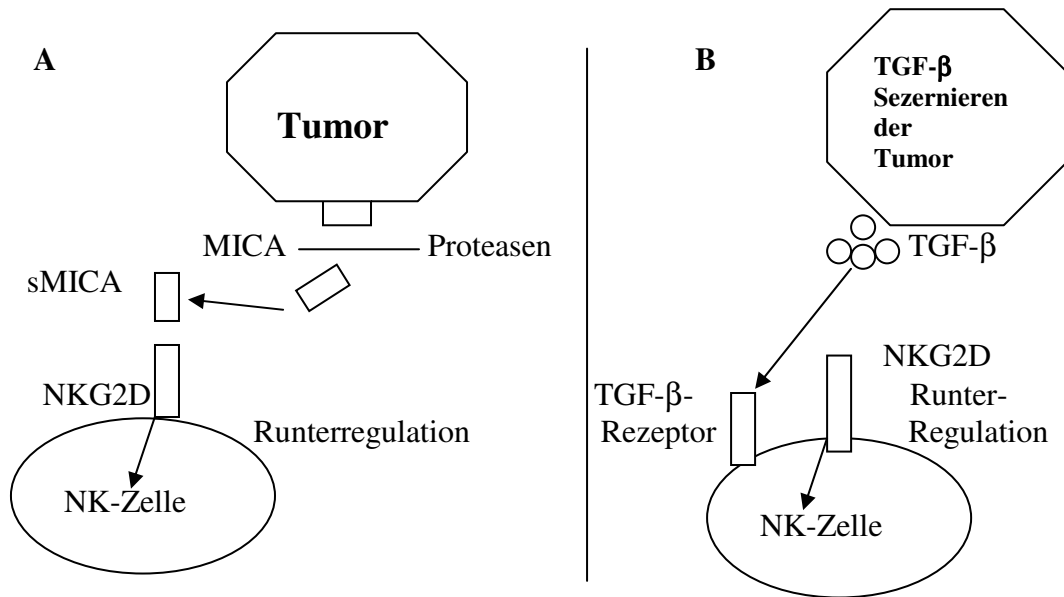


Bild 3. Tumorzellen entkommen der Immunantwort der NK-Zelle auf verschiedene Art und Weise. In A dargestellt der lösliche NKG2D-Ligand MICA, der durch Proteasen von der Oberfläche der Tumorzelle abgespalten und ins Serum sezerniert wird, um so eine Verbindung mit NKG2D einzugehen, was die Endozytolyse der Zielzelle beeinflusst. B zeigt die Sezernierung von TGF- β der Tumorzelle, welches die Expression von NKG2D auf NK-Zellen reduziert. (113)

1.17. NKT-Zellen und Tumormunität

NKT-Zellen sind Antigen-spezifische T-Zellen, die eine Vermittlerrolle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort spielen. Man findet nur einen geringen Anteil an NKT-Zellen im menschlichen peripheren Blut bezogen auf alle zirkulierenden T-Lymphozyten, nämlich etwa 0,02- 0,2%. NKT-Zellen sind einerseits T-Zellen, die auf ihrer Oberfläche TCR und CD3 exprimieren, andererseits haben sie die Eigenschaft wie eine NK-Zelle zu agieren und andere Zellen direkt zu lysieren. Zuerst wurde die CD3 entdeckt, dann bemerkte man spezielle TCR α -Ketten V α 14/24 α 18 und β -Ketten V β 8.

Diese Zellen bezeichnet man als NKT Typ I oder klassische NKT-Zelle (118). Die andere große Untergruppe der NKT-Zellen ist der Typ II; dieser wurde Mitte der 90'iger entdeckt. Sie tragen diverse T-Zell-Rezeptoren und nutzen verschiedene Varianten der $V\alpha 14\alpha 18$ -Ketten, allerdings weiß man nur wenig über ihre Funktion (117). NKT-Zellen besitzen Rezeptoren wie NK1.1 und CD1. Dies befähigt die Zelle dazu ein CD1 d-präsentierendes α Galaktosylceramid oder nach neueren Angaben ein iGb3 = Isoglobotrihexosylceramid zu erkennen. Antigenpräsentierende Zellen besitzen z.B. CD1d und präsentieren der unreifen NKT-Zelle iGb3, die dadurch aktiviert wird. Mutmaßlich wird dieser Mechanismus durch kostimulatorische Signale noch erhöht, z.B. durch IL-12. Bei Infektionen oder maligne entarteten Zelle werden so große Th1 Zytokinmengen durch die NKT-Zelle früher freigesetzt, z.B. $IFN-\gamma$, als bei gewöhnlichen T-Zellen. Jenes bewirkt eine Immunprotektion einerseits in der angeborenen Immunität durch die Stimulation von Makrophagen und NK-Zellen und andererseits in der erworbenen Immunität durch die Aktivierung von CD8+ T-Zellen und CD4+/Th1-Zellen. Zusätzlich besitzen NKT-Zellen direkte Zytotoxizität.

Weitere Studien ergaben, dass NKT-Zellen auch eine supprimierende Wirkung auf die Tumormunität besitzen. Basierend auf der Produktion von Th2-Zytokinen z.B. IL-4, IL-10 und IL-13. IL-13 erhöht die Sekretion von TGF- β in CD11b+ Gr1+ Myeloid Zellen durch den IL-4R-STAT6 Pathway und supprimiert so indirekt CD8+ Zellen (115, 116). Diese Hypothese der Suppression der NKT-Zellen bei Karzinompatienten wurde in verschiedenen Studien bestätigt, z.B. beim metastasierten Leber- und Nierenzellkarzinom (119).

Diese Ergebnisse beweisen, dass NKT-Zellen in der Immunantwort bei Karzinompatienten eine paradoxe Rolle spielen, indem sie, unabhängig vom Typ I oder Typ II, Th1- und Th2-Zytokine bilden. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass der Typ II der NKT-Zellen den Typ I schwächen kann; der genauere Mechanismus ist noch nicht bekannt.

2. Ziele der Untersuchungen

Welchen Einfluss das Immunsystem auf die Tumorelimination und die Tumorentstehung ausübt, ist Ziel vieler Studien und Untersuchungen.

In unserer Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk darauf gelegt, inwiefern NK-Zellen, NKT-Zellen und T-Lymphozyten in ihrem Erscheinen und damit schlussfolgernd in ihrer Funktion durch hämatologische Tumoren oder solide Tumoren beeinflusst werden.

Der erste Teil der Untersuchung beschäftigte sich mit dem Nachweis von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut von a) 14 hämatologischen Patienten und b) 15 Patienten mit soliden Tumoren im Vergleich zu c) einer Kontrollgruppe mit 20 Personen.

Zur Ermittlung dieser Daten (Tabelle 1) wurde Vollblut mittels einer repräsentativen Durchflußzytometrie-Analyse untersucht.

Tabelle 1. zeigt die verschiedene Lymphozytenpopulationen und Lymphozytenrezeptoren welche in dieser Arbeit untersucht wurden.

Lymphozyten Subpopulation	
alpha/beta T-Lymphozyten	
gamma/delta T-Lymphozyten	
CD16+ Lymphozyten	V δ 1- $\gamma\delta$ -T-Zelle V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zelle
NK-Zellen (gesamt)	
CD56-CD16+ NK-Zellen	
CD56+CD16+ NK-Zellen	
CD56+CD16- NK-Zellen	
Oberflächenrezeptoren	
KAR:	
NKG2D+	NK-Zellen $\alpha\beta$ -Lymphozyten, $\gamma\delta$ -Lymphozyten

NKp46+	NK-Zellen
NKp30+	NK-Zellen
NKp44+	NK-Zellen
KIR:	
P58.1+	NK-Zellen $\alpha\beta$ -Lymphozyten, $\delta\gamma$ -Lymphozyten
P58.2+	NK-Zellen $\alpha\beta$ -Lymphozyten, $\delta\gamma$ -Lymphozyten
NKG2A+	NK-Zellen $\alpha\beta$ -Lymphozyten, $\delta\gamma$ -Lymphozyten
P70+	NK-Zellen $\alpha\beta$ -Lymphozyten, $\delta\gamma$ -Lymphozyten
Chemokinrezeptor:	
CXCR1+; CXCR1+high; CXCR1+low	NK-Zellen
Anteil NKT-Zellen	

Teil zwei dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Nachweis von löslichen NKG2D Liganden MICA in Seren von den oben genannten Patientengruppen, wobei eine Korrelation zu den Oberflächenrezeptoren NKG2D, CXCR1, NKp30, NKp46 und NKp44 untersucht wurde. Dieser Aspekt deutet darauf hin, dass die NK-Zell-Funktion durch die Herunterregulation von aktivierenden Rezeptoren, via Sekretion durch den löslichen NKG2D Liganden MICA bei Tumorpatienten, beeinflusst wird. Als Nachweisverfahren wurde das zuverlässige ELISA-Verfahren angewandt.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Zellen und Antikörper

3.3.1. Spenderzellen aus Vollblut 1 Kontrollgruppe und zweier Patientengruppen

Das Vollblut der Kontrollgruppe und der Patientengruppen wurden nach Abgabe einer Einverständniserklärung gewonnen.

Insgesamt wurden die Blutproben (EDTA-Röhrchen, je 5ml) von 20 klinisch gesunden (10 weibliche und 10 männliche) Kontrollpersonen und 29 Tumorpatienten untersucht.

Die Anzahl der Patienten pro Gruppe, die Geschlechterverteilung, das Alter, die Erkrankungen, die Stadieneinteilung und die bisherigen Therapien (hierbei handelt es sich teilweise um operative, strahlentherapeutische oder zytostatische Behandlungsmöglichkeiten) sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen. Bei der Stadieneinteilung der Tumoren dienten die Richtlinien der UICC zur TNM-Klassifikation.

Die erste Gruppe bildete die Kontrollgruppe mit 20 Blutspendern (siehe Tab. 2).

Die zweite Gruppe stellte 14 Patienten mit hämatologischen Neoplasien dar (siehe Tab. 3). Gruppe drei bildeten 15 Patienten mit soliden Tumoren (siehe Tab. 4). Histologisch handelte es sich in der Mehrzahl der Fälle um Non Hodgkin Lymphom- und Morbus Hodgkin-Patienten bei den hämatologischen Neoplasien und bei den soliden Tumoren um Kolorektale Karzinome und Magen-Karzinome.

In Tabelle 2 wird die Kontrollgruppe demonstriert. Es nahmen 20 gesunde Personen, 10 männliche und 10 weibliche, an der Arbeit teil. Das Durchschnittsalter lag bei 47 Jahren.

	Anzahl	Geschlecht		Alter (Jahre)
		M	W	
Kontrollgruppe	n 20	10	10	46,5 (24 – 62 Jahre)

Tabelle 2: Kontrollgruppe

In der Tabelle 3 wird die zweite Gruppe „hämatologische Neoplasien“ dargestellt. Hierbei handelte es sich um 14 Patienten, 8 männliche und 6 weibliche Personen. Das Durchschnittsalter betrug 59 Jahre.

Alter in Jahren	Geschlecht	Diagnose	Stadium	Therapie (-/+)
61	M	Follikuläres NHL, Grad II	IVB	-
80	M	Follikuläres NHL, Grad I	II A	+
40	W	Burkitt-Lymphom	IVA	-
63	W	Diffuses großzelliges B-NHL	IIIB	-
58	W	Diffuses großzelliges B-NHL rechter Oberarm	IA	-
80	W	Diffuses großzelliges B-NHL	IA	-
62	M	Diffuses großzelliges B-NHL rechte Schulter	IIIA	+
84	M	Diffuses großzelliges B-NHL	IIA	-
80	M	Morbus Hodgkin Mischformtyp	IVB	-
61	W	Diffus Großzelliges B-NHL	IVB	-
36	M	Follikuläres B-NHL, Grad II	IVA	-
46	W	Diffuses großzelliges B-NHL	IA	-
73	M	Multiples Myelom (IgA-Lambda) Bence-Jones-Proteinurie	II A	-
72	M	B-NHL des Hodens	IV A	-

Tabelle 3: Patienten mit hämatologischen Neoplasien

In Tabelle 4 wird die dritte Gruppe „solide Tumoren“ aufgezeigt. Die Anzahl der Teilnehmer betrug 15, davon 11 männliche und 4 weibliche. Das Durchschnittsalter betrug 63 Jahre.

Alter in Jahren	Geschlecht	Diagnose	Stadium	Therapie (-/+)
64	M	Adenokarzinom des Magens (intestinaler Typ) mit pulmonaler und hepatischer Metastasierung	G 2-3,TxM1	+
47	M	Adenokarzinom des Sigmas	pT4,pN0,M0,G2,Ib	+
68	M	Adenokarzinom des Sigmas	pT4,pN1,M0,G2	+
65	W	Adenokarzinom des descendosigmoidalen Übergangs	pT3,N2,M1,G3,R0	+
69	W	Pankreas-Karzinom mit Lebermetastasen	cT3,N1,M1,G2-3	-
78	M	CUP-Syndrom mit Knochenmarksaplasie, Lebermetastasen	IV	+
60	M	Siegelringzell-Ca der Kardia mit Peritoneal-Carzinose	pT2,N1,M1,G3,R0	+
44	M	Klatskin-Tu mit Peritonealkarzinose	Bismuth Typ III, pT3,N2,M1	+
64	M	Kardia-Ca Typ III mit Lebermetastasen	pT2,N1,M1,G2	+
49	M	Undifferenziertes Siegelring-Ca des Magens mit Peritonealkarzinose	pT3,N2,M1,G3	+
71	M	Adenokarzinom des Rektum mit diffuser Leberfilialisierung	pT3,pN2,M1,pL1,pV1, G2,R2	+
64	M	Duktales Adeno-Ca des Pankreaskopfes mit diffuser Leber- und Lungenmetastasierung	pT3,N0,M1,G2,R0	+
84	W	Adeno-Ca des Pankreaskopfes mit lokalen LK-Filiae	TxN1M1 (IV)	-
59	M	Adenokarzinom li Colonflexur mit Leber-, Lungenmetastasen, li temporale Schädelkalotten-Metastase	pT4,pN3,M1	+))
64	W	Adeno-Ca des Kolon ascendens	pT4,N2,M0,G2,R0	+

Tabelle 4: Patienten mit soliden Tumoren

3.1.2. Monoklonale Antikörper für die FACS-Analyse

Es wurden folgende Antikörper zur durchflußzytometrischen Analyse verwendet:

Tabelle 5

Name des AK	Firma	Konjugation	Clone
CD 3	BD Biosciences (Heidelberg)	PerCP	SK7
CD 56	BD Biosciences (Heidelberg)	APC	B159
CD $\gamma\delta$	Beckman Coulter (Krefeld)	FITC	Immu 510
CD 56	BD Biosciences (Heidelberg)	FITC	NCAM16.2
CD Vd1	ENDOGEN=BIOZOL	FITC	TS8.2
CD Vd2	Beckman Coulter (Krefeld)	FITC	Immu 389
NKG2A	Beckman Coulter (Krefeld)	PE 50t	Z199
P58.2	Beckman Coulter (Krefeld)	PE / PHYCO	GL 183
p70	Beckman Coulter (Krefeld)	PE 50t	Z 27
NKp30	Beckman Coulter (Krefeld)	PE 50t	Z 25
NKp44	Beckman Coulter (Krefeld)	PE 50t	Z 231
NKp46	Beckman Coulter (Krefeld)	PE 100t	BAB 281
CD 16	Beckman Coulter (Krefeld)	PE 100t CE	3G8
IL8RA/CXCR1	BD Biosciences (Heidelberg)	R-PE	5A12
NKG2D	Beckman Coulter (Krefeld)	PE	ON 72
P58.1	Beckman Coulter (Krefeld)	PE	EB6B

3.2. Waschpuffer und Lösungen

FACS-Puffer

1x PBS (Phosphate Buffered Saline) mit 0,1% Na-Azid (Natrium-Azid reinst 20%)
und 1 % FCS.

Lyse Lösung zum Entfernen der roten Blutkörperchen

1x Aqua Delta Select (Delta Select GmbH) mit 10% FACS™ Lysing solution (BD Biosciences, Heidelberg)

Human MICA ELISA Kit (Immatics Biotechnologies GmbH)

Zwei 96-Microwell-Platten beschichtet mit Anti-MICA (mAb AMO1)

Biotin-Konjugat Antikörper Anti-MICA (mAb BAMO3) in 7,5% BSA-PBS

HRP- Konjugat Antikörper Anti-Mouse IgG2a Ab in 3,5% BSA-PBS

Substrat Lösungen

TMB Peroxidase Substrat

Peroxidase Sol. B

Stop-Lösung: 1M phosphoric acid

Waschpuffer für den ELISA

0,05% Tween-20/PBS

3.3.Methode

3.3.2. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) – Analyse stellt eine Methode dar, die Zellkulturen auswerten kann, indem sie mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten, mononuklearen Antikörpern angefärbt wurden (Tabelle 6).

Hierzu wurden 100 µl Vollblut pro Patient in je ein passendes FACS-Röhrchen pipettiert. Zu diesen Zellen gab man 5 µl konjugierten Antikörper, vortexte und inkubiert für 10 min bei +4 bis +8°C lichtgeschützt. Anschließend entfernte man die roten Blutkörperchen, indem man zu den Proben 2 ml Lyse-Lösung dazu gab, vortexte und inkubiert wiederum für 10 min lichtgeschützt bei Zimmertemperatur. Dann wurden die Proben zweimal hintereinander mit je 2 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (8 min bei 1360 U/min, 20°C) und die Überstände dekantiert.

Die Messungen erfolgten am 4-Kanal-FACScan (Becton Dickonson) bei Standardeinstellung und dem Programm CellQuest 1.0 als Messungs- und Analysesoftware. Es wurden pro Messung 20.000 Zellen analysiert. Der absolute und relative Anteil der unterschiedlichen Zellen und deren Parameter wurden bestimmt.

Tabelle 6 Färbungen (dreifach und vierfach)

	PERCP	APC	FITC	PE
1.	CD 3	CD 56	PAN Gamma/Delta TCR	NKG2D
2.	CD 3	CD 56		CXCR1
3.	CD 3		CD 56	CD 16
4.	CD 3	CD 56		NKp46
5.	CD 3	CD 56		NKp30
6.	CD 3	CD 56		NKp44
7.	CD 3	CD 56	PAN Gamma/Delta TCR	p58.1
8.	CD 3	CD 56	PAN Gamma/Delta TCR	P58.2
9.	CD 3	CD 56	PAN Gamma/Delta TCR	NKG2A
10.	CD 3	CD 56	PAN Gamma/Delta TCR	KIR p70
11.	CD 3		V δ 1 TCR	CD 16
12.	CD 3		V δ 2 TCR	CD 16

3.3.3. ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, was auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Man verwendet zwei Antikörper, die an zwei unterschiedlichen Stellen des Antigens binden. Der erste Antikörper (coating-Antikörper) befindet sich fest auf einer vorgefertigten speziellen ELISA-Platte. Der zweite Antikörper ist biotinyliert. An das Biotin bindet ein weiterer Antikörper, Streptavidin, was an einem Enzym (z.B. alkalische Phosphatase oder Glucoseoxidase) gekoppelt ist. Dieses Enzym spaltet nun nach Zugabe eines Farbstoffes (p-Nitrophenylphosphat) den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entsteht p-Nitrophenol, welches schwach gelb erscheint und im ELISA-Reader ausgewertet werden kann.

Die vorgefertigten ELISA-Platten (Human MICA ELISA Detektionkit, Immatics Biotechnologies GmbH, Tübingen) sind bereits mit dem ersten Antikörper beschichtet und wurden nun mit den Serumproben (1 vol. Serum mit 2 vol. 7,5% PBS) der Tumorgruppen und der Kontrollgruppe je 100 μ l in Doppelansätzen in je ein well

aufgefüllt und bei 37 °C 2h inkubiert. Zur semiquantitativen Auswertung wurden lyophilisierte Standards mit Aqua dest. in 8 Stufen (1:10) verdünnt und ebenfalls in Doppelansätzen pipettiert. Anschließend wurden die Platten 4x mit 0,05%TWEEN-20/PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl pro well des biotinylierten Antikörpers Anti-MICA (mAb BAMO3) in 7,5% PBS folgte die Inkubation der Platten bei 37 °C für 2h. Es schloß sich ein 4-maliges Waschen mit 0,05%TWEEN-20/PBS an und danach wurden 100µl /well Anti-mouse IgG2a Ab (1:10000 in 3,75% BSA-PBS) in die Platten gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 1h bei 37°C mit erneutem 6-maligem Waschen mit 0,05%TWEEN-20/PBS. Im letzten Schritt wurden in ein well je 100 µl TMB Peroxidase Substrat-Lösung und Peroxidase Sol.B gegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 M phosphoric acid Stop-Reagenz beendet und die Platten im ELISA-Reader bei 450 nm bzw. 450 nm/550 nm gemessen.

3.3.3. Angewandte statistische Verfahren

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe eines standardisierten Dokumentationsbogens in das Programm Excel und in SPSS überführt. Mit Unterstützung des Institutes für angewandte Mathematik und Statistik erfolgte eine biometrisch Auswertung (Lehrstuhl für Mathematische Statistik: Prof. Dr. M. Falk). Die Anteile der verschiedenen Zelltypen und Subpopulationen der Kontrollgruppe, der Tumorgruppe mit Soliden Tumoren und Systemischen Tumoren wurden in Box Plots dargestellt. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum berechnet. Signifikanzen zwischen Variablen wurden unter Anwendung des parameterfreien Kruskal-Wallis-Tests berechnet. Für die Variablen mit signifikanten Unterschieden schließt sich als parameterfreier Test der Mann-Whitney-U-Test an. Für die Tests galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant.

3.4. Geräte

Durchflusszytometer: 4-Kanal-FACScan (Becton Dickonson),
CellQuest 1.0 als Messungs- und Analysesoftware

Zentrifugen: Rotanta/AP mit Rotor 5094A (Hettlich, Tuttlingen)

Sterilbank: Biogard 1360-112 (Sanford, Maine, USA)

Vortex: Vortex Genie 2™ (Bender & Hobein, Zürich)

Elisa-Reader: Titertek Multiskan PLUS MK II, Typ 314
Ascent Software™ (Labsystems, Finnland)

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen

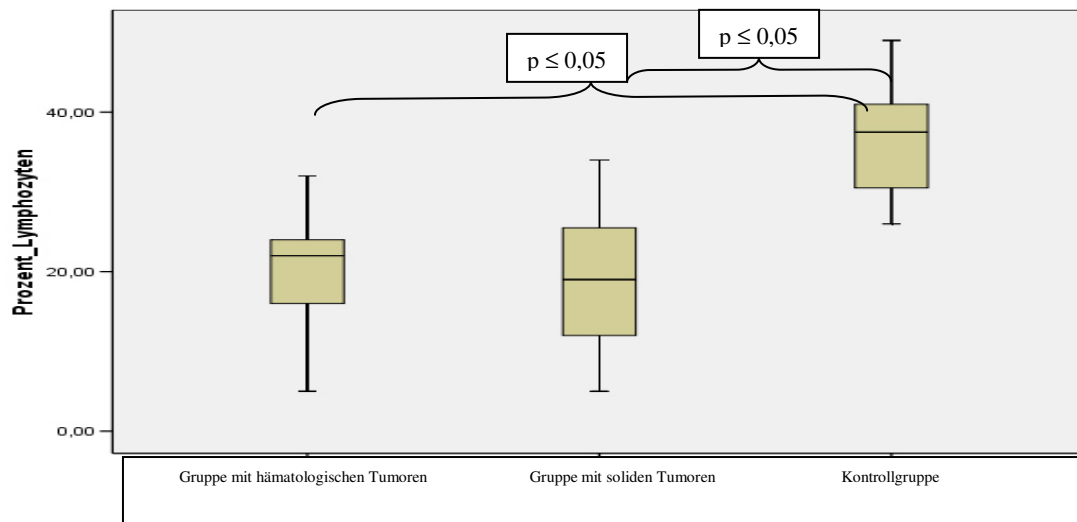
Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine Fall-Kontroll-Studie, welche sich im ersten Teil mit dem Nachweis der verschiedenen Zellpopulationen im peripheren Blut unterschiedlicher Personengruppen beschäftigt. Folgende Patientenkollektive wurden miteinander verglichen, solide Tumoren n=15, hämatologische Neoplasien n=14 und eine gesunde Kontrollgruppe n=20.

4.1.1. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen mit signifikanten Ergebnissen

Lymphozyten

Der Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 36%, der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war auf 21% vermindert und unterschied sich damit signifikant um 15% Punkte im Vgl. zu der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren lag bei 20%, auch er differierte von der Kontrollgruppe signifikant um 16% Punkte. Die Patientengruppen untereinander unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Abb. 1:



	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	36,25	6,01	26,00	49,00
hämatologische Neoplasien	20,62	7,96	5,00	32,00
Solide Tumoren	19,73	10,13	5,00	34,00

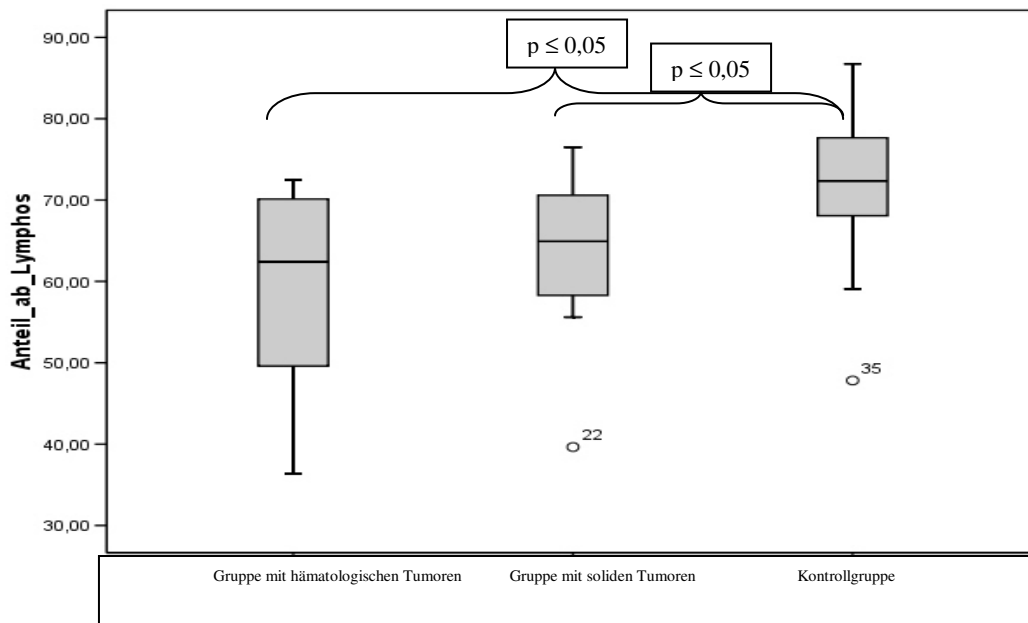
Abbildung 1: Prozentualer Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender.

Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

Der Anteil der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 72%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war mit 59% leicht erniedrigt. Dieser Unterschied von 13% Punkten war signifikant im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren betrug 65%. Diese Differenz zeigte gleichfalls eine Signifikanz um 7% Punkte. Die Patientengruppen untereinander unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Abb. 2:



	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	72,20	9,40	47,82	86,74
hämatologische Neoplasien	59,01	12,52	36,37	72,51
Solide Tumoren	65,17	10,56	39,64	76,48

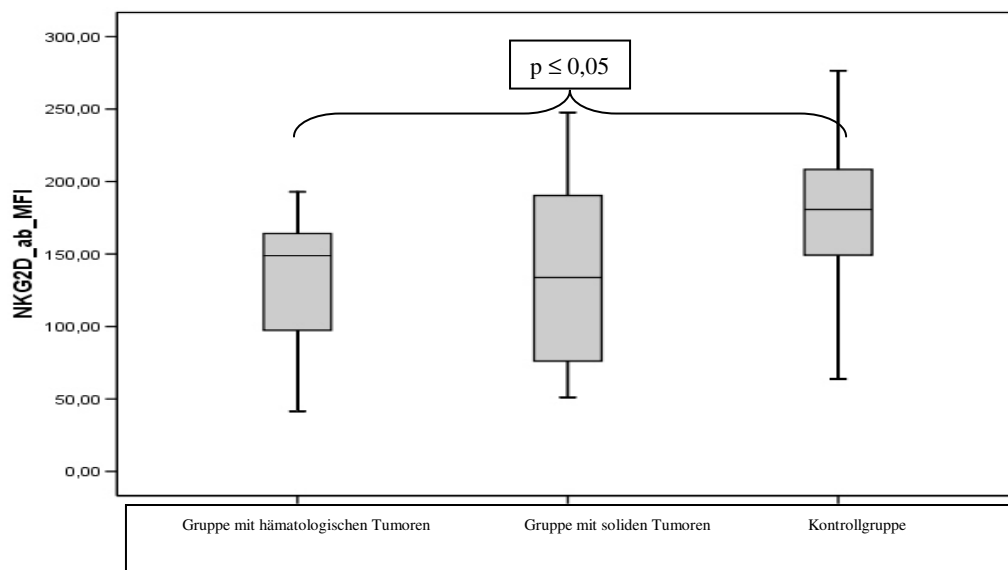
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der $\alpha\beta$ -Lymphozyten im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender.

*Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.*

NKG2D auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit NKG2D Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 178. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien betrug 134 und unterschied sich damit signifikant um 44 Punkte im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren wies einen MFI von 138, er unterschied sich von der Kontrollgruppe nicht signifikant um 40 Punkte. Die Patientengruppen untereinander erreichten kein Signifikanzniveau.

Abb. 3:



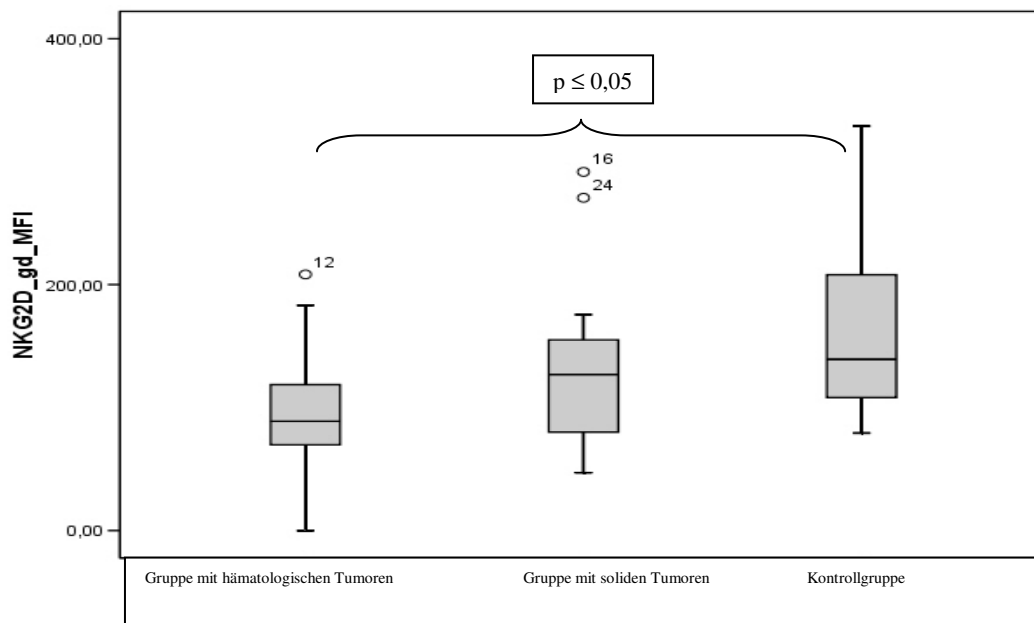
	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	177,91	47,55	63,79	276,50
hämatologische Neoplasien	133,64	45,53	41,56	192,88
Solide Tumoren	138,43	69,48	51,08	247,65

Abbildung 3: Prozentualer Anteil der $\alpha\beta$ -Lymphozyten mit NKG2D Expression im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender. Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

NKG2D auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit NKG2D Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 164. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war deutlich um 69 Punkte erniedrigt. Dieser Unterschied zeigte ein Signifikanzniveau. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren entgegen lag bei einem MFI von 132. Hier wurde keine Signifikanz ermittelt. Die Patientengruppen unterschieden sich untereinander ohne Signifikanz.

Abb. 4:



	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	163,63	75,66	79,21	328,91
hämatologischen Neoplasien	94,57	60,06	0,00	208,29
Solide Tumoren	132,19	72,75	47,07	291,69

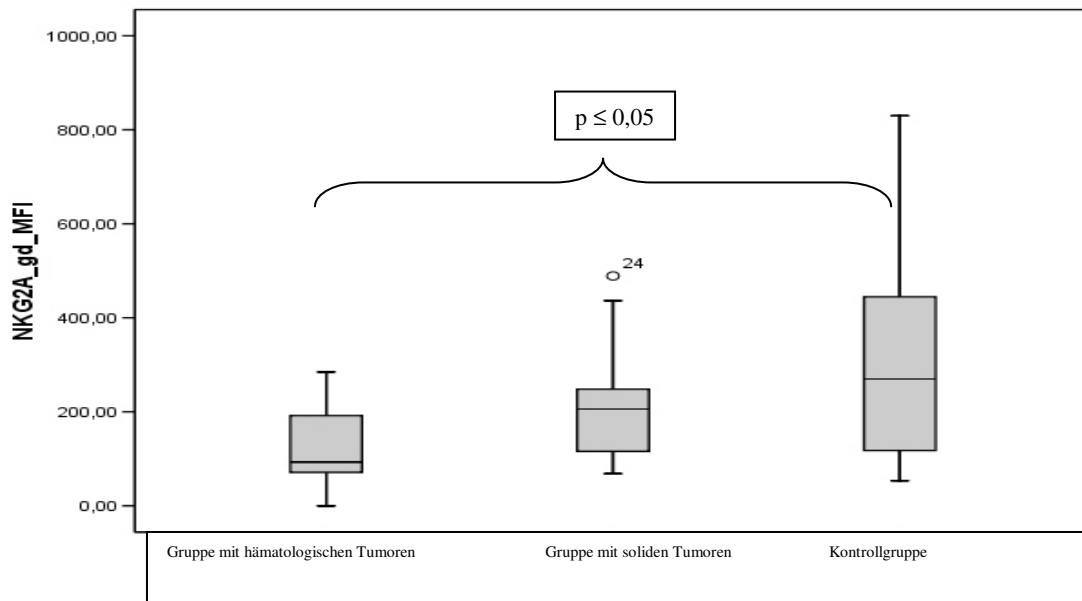
Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Gamma-Delta Lymphozyten mit NKG2D Expression im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender.

Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

NKG2A auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit NKG2A Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe machte im Durchschnitt 299 aus. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien erzielte einen MFI von 118 und unterschied sich damit signifikant um 181 Punkte. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren betrug 215, er unterschied sich nicht signifikant um 84 Punkte. Im Mittel unterscheiden sich die Patientengruppen untereinander nicht signifikant.

Abb.5:



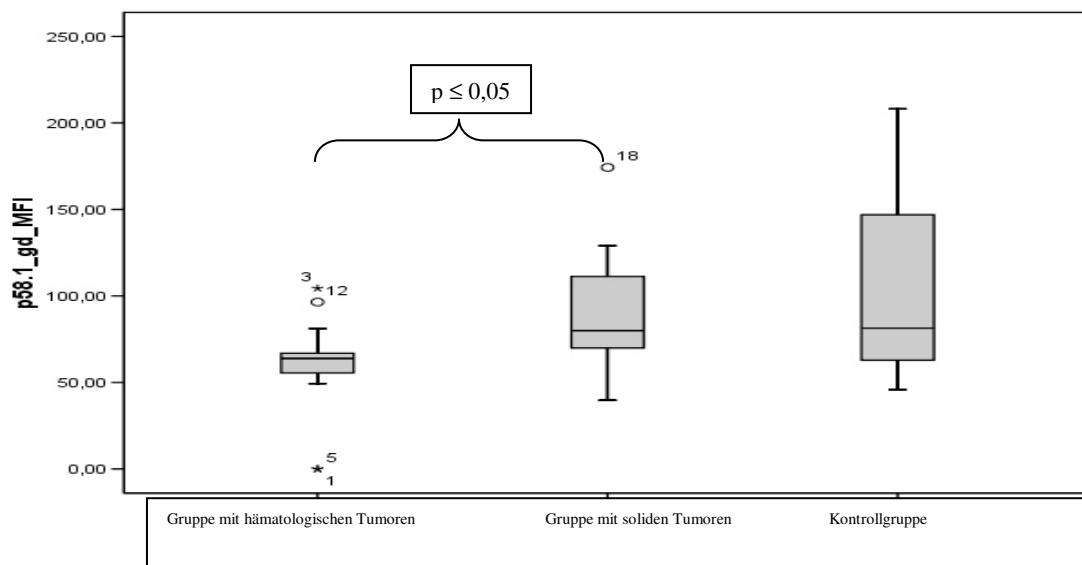
	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	299,34	202,79	53,47	829,72
hämatologische Neoplasien	118,10	85,37	0,00	284,80
Solide Tumoren	215,35	128,24	68,21	489,01

Abbildung 5: Prozentualer Anteil der $\gamma\delta$ Lymphozyten mit NKG2A Expression im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender. Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

p58.1 auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit p58.1 Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 105. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies mit einem MFI von 59 einen deutlich niedrigeren Wert auf. Dieser Unterschied von 46 Punkten zeigte jedoch kein Signifikanzniveau. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren war um 14 Punkte erniedrigter und zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenso keine Signifikanz. Die Patientengruppen untereinander unterschieden sich dagegen signifikant um 32 Punkte.

Abb.6:



	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	104,48	53,15	45,83	208,14
hämatologischen Neoplasien	59,12	30,59	0,00	104,38
Solide Tumoren	91,12	35,47	39,69	174,27

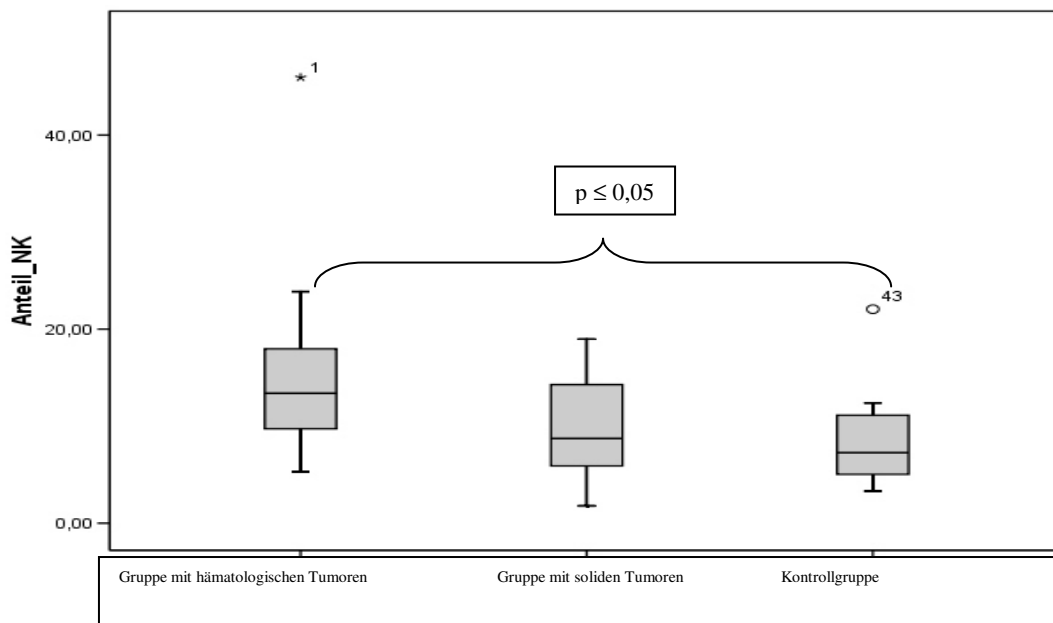
Abbildung 6: Prozentualer Anteil der Gamma-Delta Lymphozyten mit p.58.1 Expression im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender.

Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

NK-Zellen

Der Anteil der NK-Zellen im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 8%, der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien betrug 16% und unterschied sich damit um 8% Punkte signifikant im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren belief sich auf 10% und unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe um 2% Punkte. Die Tumorgruppen untereinander differierten um 6% Punkte, dieser Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz.

Abb. 7:



	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	8,32	4,40	3,30	22,06
hämatologische Neoplasien	15,92	10,63	5,29	45,95
Solide Tumoren	9,87	5,13	1,78	18,97

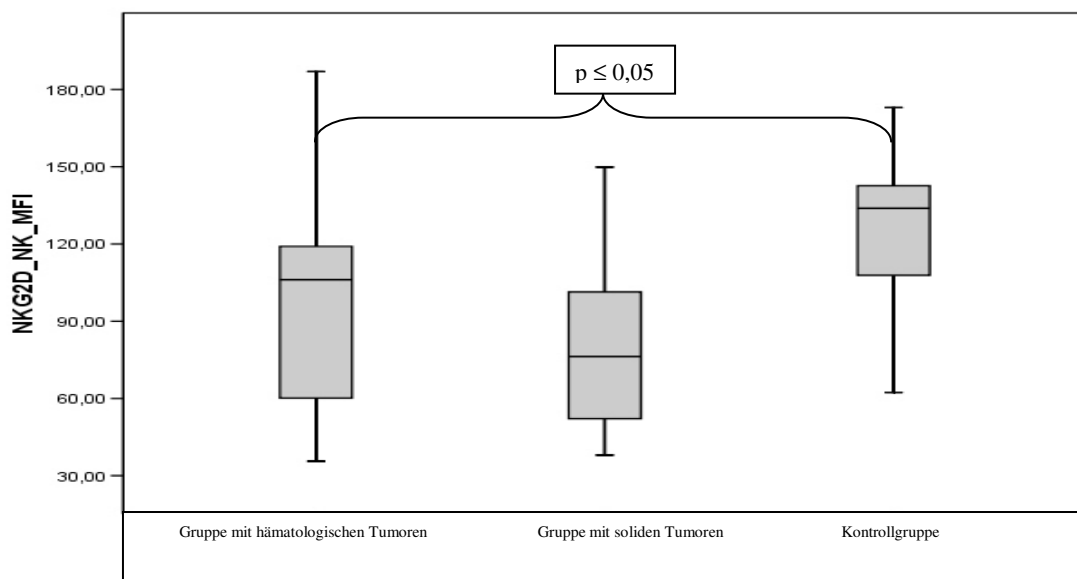
Abbildung 7: Prozentualer Anteil der NK-Zellen im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender.

Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

NKG2D auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit NKG2D Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 124. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien belief sich auf einen MFI von 100 und unterschied sich damit signifikant um 24 Punkte im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren lag bei einem MFI von 86 und differierte mit 38 Punkten nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die Tumorkategorien unterschieden sich ohne Signifikanz von einander um 14 Punkte.

Abb.8:



	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	124,24	29,61	62,39	172,95
hämatologische Neoplasien	99,87	44,24	35,60	186,94
Solide Tumoren	86,20	43,11	37,99	188,12

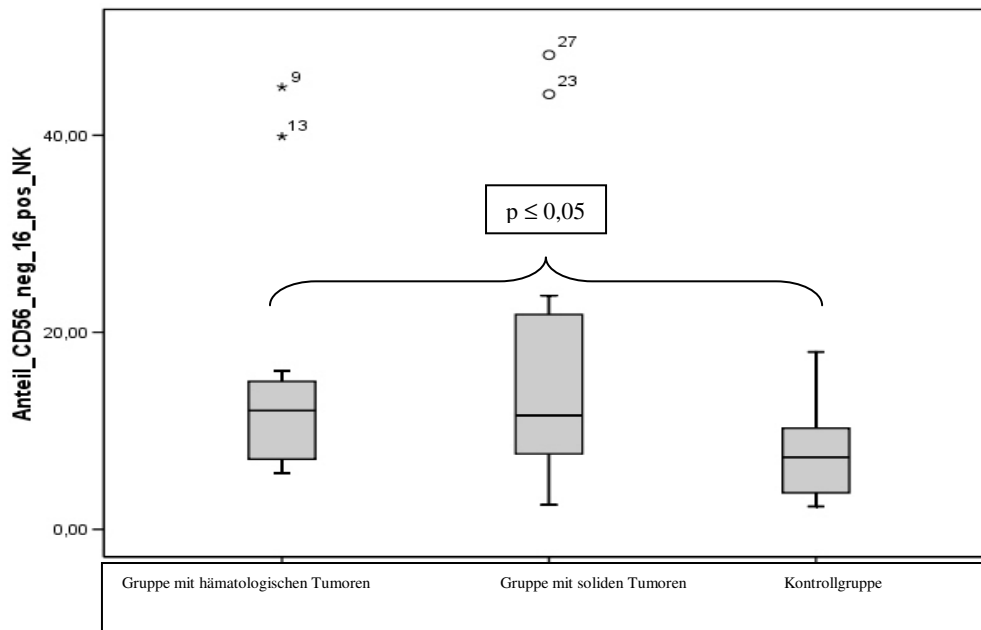
Abbildung 8: Prozentualer Anteil der NK-Zellen mit NKG2D Rezeptor-Expression im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender.

Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

CD56-16+ NK-Zellen Subpopulation

Der Anteil der NK-Zellen mit CD56-16+ Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 7%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war um 8% höher. Der Unterschied von 8% Punkten erwies sich hier als signifikant. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren belief sich auf 16% und unterschied sich von der Kontrollgruppe nicht signifikant. Die Tumorgruppen untereinander differierten ohne Signifikanz um 1% Punkt.

Abb.9:



	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	7,39	4,02	2,32	18,01
hämatologische Neoplasien	15,40	12,54	5,73	44,89
Solide Tumoren	16,17	13,83	2,50	48,15

Abbildung 9: Prozentualer Anteil der Natürlichen Killer Zellen mit CD56-16+ Expression im peripheren Blut der Patienten mit hämatologischen Neoplasien, soliden Tumoren und der Normalspender.

Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'te und 90'igste Perzentile als Whisker. *Extreme Werte.

4.1.2. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen ohne signifikante Ergebnisse

p58.1 auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit p58.1 Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 154. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war um 50 Punkte erniedrigt. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren sogar um 78 Punkte erniedrigt. Die Gruppen erreichten untereinander kein Signifikanzniveau.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	153,58	179,86	0,00	835,36
hämatologische Neoplasien	103,66	54,89	0,00	197,87
Solide Tumoren	76,14	103,42	0,00	414,18

p58.2 auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit p58.2 Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe erfasste im Durchschnitt 136. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien erreichte einen höheren MFI von 157. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren ergab einen MFI von 145. Die Gruppen variierten gegenseitig um 9 bis 21 Punkte, ohne dass diese Unterschiede ein Signifikanzniveau erreichten.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	135,73	55,04	64,45	284,32
hämatologische Neoplasien	157,36	62,72	81,94	321,49
Solide Tumoren	145,34	83,08	41,85	366,16

NKG2A auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit NKG2A Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe ergab im Durchschnitt 208. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien erreichte einen MFI von 253. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren betrug einen MFI von 229. Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant um 21 bis 45 Punkte untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	207,58	92,04	86,67	416,90
hämatologische Neoplasien	252,92	114,36	92,69	441,81
Solide Tumoren	228,59	163,16	0,00	547,60

p70 auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit p70 Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 288. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien dagegen 246. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren erreichte 168. Im Mittel unterschieden sich die Gruppen um 42 bis 120 Punkte nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	287,77	187,09	0,00	641,93
hämatologische Neoplasien	246,35	205,92	0,00	604,30
Solide Tumoren	167,73	225,53	0,00	892,86

$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut der Kontrollgruppe ergab im Durchschnitt 3%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies mit 2% einen nahezu identischen Wert auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren dagegen zeigte einen identischen Wert von 3% im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Die Gruppen unterschieden sich um 0 bis 1 Punkte ohne Signifikanz untereinander.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	3,21	3,74	0,86	17,39
hämatologische Neoplasien	1,94	1,51	0,07	5,53
Solide Tumoren	2,95	2,67	0,45	9,88

p58.2 auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit p58.2 Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe ergab im Durchschnitt 90. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies einen MFI von 68 auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren erreichte 105. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	90,33	58,35	0,00	220,67
hämatologische Neoplasien	68,14	38,05	0,00	122,98
Solide Tumoren	105,03	40,71	47,32	175,63

p70 auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der MFI der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit p70 Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 156. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies mit einem MFI von 77 einen niedrigeren Wert auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren unterschied sich nicht wesentlich mit einem MFI von 143. Die drei Gruppen untereinander erreichten kein Signifikanzniveau.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	156,12	138,35	0,00	553,00
hämatologische Neoplasien	76,85	45,49	0,00	138,24
Solide Tumoren	143,39	122,20	51,63	517,06

V δ 1/ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der Anteil der V δ 1/ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut der Kontrollgruppe erreichte im Durchschnitt 0,6%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien erzielte einen ähnlichen Wert mit einem MFI von 0,4%. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren ergab einen identischen MFI von 0,6%. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	0,61	0,62	0,09	2,18
hämatologische Neoplasien	0,42	0,29	0,04	1,02
Solide Tumoren	0,58	0,63	0,07	2,46

CD16+ auf V δ 1/ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der Anteil der V δ 1/ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit CD16+ Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 0,19%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien belief sich auf 0,15%. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren erreichte 0,1%. Im Mittel erlangten die drei Gruppen kein Signifikanzniveau.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	0,19	0,24	0,01	0,82
hämatologische Neoplasien	0,14	0,14	0,00	0,54
Solide Tumoren	0,09	0,07	0,00	0,24

V δ 2/ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Der Anteil der V δ 2/ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 2,3%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies 1,5% auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren erzielte 2,5%. Die drei Gruppen unterschieden sich nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	2,27	3,66	0,09	16,67
hämatologische Neoplasien	1,47	1,41	0,11	4,93
Solide Tumoren	2,48	2,29	0,08	9,14

CD16+ auf V δ 2/ γ δ -T-Lymphozyten

Der Anteil der V δ 2/ γ δ -T-Lymphozyten mit CD16+ Expression im peripheren Blut der Kontrollgruppe belief sich im Durchschnitt auf 1%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies 0,4%, auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren betrug 0,7%. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	1,10	3,03	0,04	13,56
hämatologische Neoplasien	0,37	0,30	0,05	0,86
Solide Tumoren	0,69	0,77	0,06	2,61

Ratio der V δ 2/ γ δ -T-Lymphozyten zu V δ 1/ γ δ -T-Lymphozyten

Der Anteil der V δ 2/ γ δ -T-Lymphozyten zu V δ 1/ γ δ -T-Lymphozyten im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 13%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien lag 8% Punkte unter dem der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren lag nur 3% Punkte unter dem der Kontrollgruppe. Die drei Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	12,46	29,24	0,25	125,00
hämatologische Neoplasien	5,44	6,10	0,20	18,00
Solide Tumoren	10,11	14,20	0,14	46,67

NKp46 auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit NKp46 Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe erreichte im Durchschnitt 110. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies den gleichen MFI-Wert von 110 auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren lag bei einem MFI von 104. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant von einander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	110,49	36,66	61,04	184,04
hämatologische Neoplasien	109,93	35,75	57,44	168,41
Solide Tumoren	104,30	66,07	0,00	253,65

NKp30 auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit NKp30 Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 51. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war um 8 Punkte niedriger. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren sogar um 10 Punkte niedriger, als der der Kontrollgruppe. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	50,54	8,37	35,72	61,46
hämatologische Neoplasien	42,96	10,66	31,10	70,77
Solide Tumoren	40,79	16,97	0,00	78,25

NKp44 auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit NKp44 Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 30. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies mit einem MFI von 31 einen nahezu identischen Wert auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren war leicht erhöht mit einem MFI von 35. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	30,41	9,77	0,00	46,06
hämatologische Neoplasien	31,42	12,12	0,00	44,75
Solide Tumoren	34,64	34,80	0,00	147,22

p58.1 auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit p58.1 Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 161. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies einen niedrigeren MFI von 138 auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren zeigte sich ebenfalls niedriger mit einem MFI von 121. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	160,79	61,20	76,25	281,33
hämatologische Neoplasien	137,73	48,36	39,94	199,74
Solide Tumoren	121,28	78,59	21,87	302,01

p58.2 auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit p58.2 Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 227. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies einen leicht erhöhten MFI von 233 auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren war ebenfalls leicht erhöht mit einem MFI von 245. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	227,10	75,16	135,66	401,69
hämatologische Neoplasien	232,82	58,14	136,49	355,34
Solide Tumoren	244,80	112,57	76,34	487,75

NKG2A auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit NKG2A Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 263. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war um 27 Punkte leicht höher. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren jedoch war um 43 Punkte niedriger im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	263,07	103,69	163,70	542,12
hämatologische Neoplasien	289,87	138,13	137,50	576,92
Solide Tumoren	219,78	118,24	91,07	564,38

p70 auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit p70 Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 51. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies mit einem MFI von 43 einen etwas niedrigeren Wert auf. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren lag mit einem MFI von 41 ebenfalls niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	491,46	254,36	105,73	1040,98
hämatologische Neoplasien	329,62	324,19	0,00	965,60
Solide Tumoren	372,34	267,52	0,00	901,47

CD56+16- NK-Zellen Subpopulation

Der Anteil der NK-Zellen mit CD56+16- Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe war im Durchschnitt 2%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien wies mit einem Anteil von 1,8% einen nahezu identischen Wert auf, sowie der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren dieser betrug 1,7%. Die Gruppen unterschieden sich ohne Signifikanz um etwa 0,1 bis 0,3 % Punkte voneinander.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	2,29	1,42	0,24	5,25
hämatologische Neoplasien	1,79	1,24	0,19	4,08
Solide Tumoren	1,74	1,01	0,20	4,46

CD56+16+ NK-Zellen Subpopulation

Der Anteil der NK-Zellen mit CD56+16+ Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe belief sich im Durchschnitt auf 28%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war mit 37% etwas höher. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren unterschied sich mit 28% nicht von der Tumorgruppe. Die Gruppen variierten gegenseitig um 0 bis 9% Punkte, ohne dass dieser Unterschied ein Signifikanzniveau erreichte.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	27,96	13,57	3,83	50,24
hämatologische Neoplasien	37,23	18,93	16,35	77,63
Solide Tumoren	28,25	15,90	2,14	59,11

CXCR1 auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit CXCR1 Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 509. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien zeigte einen deutlich höheren MFI von 820. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren lag ebenfalls etwas höher bei einem MFI von 604. Im Mittel unterschieden sich die drei Gruppen nicht signifikant untereinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	509,23	297,15	134,78	1250,54
hämatologische Neoplasien	820,12	546,16	134,60	1768,01
Solide Tumoren	603,55	657,22	67,95	2093,47

CXCR1+low auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit CXCR1+low Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe erreichte im Durchschnitt 201. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien belief sich auf einen niedrigeren MFI von 179. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren war ebenfalls erniedrigt mit einem MFI von 156. Die Gruppen unterschieden sich ohne Signifikanz voneinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	200,94	43,41	132,27	310,97
hämatologische Neoplasien	178,62	36,11	110,73	228,81
Solide Tumoren	155,96	72,47	64,35	302,18

CXCR1+high auf NK-Zellen

Der MFI der NK-Zellen mit CXCR1+high Oberflächenrezeptor im peripheren Blut der Kontrollgruppe belief sich im Durchschnitt auf 2669. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien war um 310 niedriger. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren betrug einen MFI von 2174. Die Gruppen unterschieden sich ohne Signifikanz voneinander.

	Mittelwert	STABW	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	2668,64	565,97	1468,90	4068,91
hämatologische Neoplasien	2358,61	556,29	1321,58	2995,51
Solide Tumoren	2174,43	1296,67	0,00	5852,77

NKT-Zellen

Der Anteil der NKT-Zellen im peripheren Blut der Kontrollgruppe lag im Durchschnitt bei 4%. Der Mittelwert der Patienten mit hämatologischen Neoplasien lag nicht signifikant erhöht bei 5%. Der Mittelwert der Patienten mit soliden Tumoren betrug einen erhöhten Wert mit 12%. Die Gruppen unterschieden sich ohne Signifikanz untereinander um etwa 1 bis 8% Punkte.

	Mittelwert in %	STABW in %	Minimum in %	Maximum in %
Kontrollgruppe	3,55	2,65	0,69	9,11
hämatologische Neoplasien	4,78	4,55	0,36	18,17
Solide Tumoren	12,20	12,22	0,37	34,02

4.2. Löslicher NKG2D Ligand im Serum

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich damit, den löslichen NKG2D Liganden MICA mittels ELISA-Verfahren zu quantifizieren. MICA wird von Tumorzellen sezerniert, unter anderem bei fortgeschrittenen Tumoren, jedoch nicht im Anfangsstadium eines Tumorleidens. Fortgeschrittene Neoplasien, die MICA produzieren, können das Immunsystem herunterregulieren und haben damit eine größere Chance dem Immunsystem zu entkommen.

Der Nachweis von MICA im Serum von Krebspatienten gelang mittels ELISA Verfahren bei insgesamt 21% der Patienten mit soliden und hämatologischen Neoplasien, siehe Tabelle 4.2.1. und Abb. 10. Bei der Kontrollgruppe wurde, wie zu erwarten, kein MICA im Serum gefunden. Abbildung 10 zeigt einen signifikant hohen Unterschied zwischen den erhöhten Level an MICA Werten bei den 6 Patienten mit hämatologischen und soliden Tumoren im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe.

Tabelle 4.2.1. Nachweis von MICA im Serum bei 6 (3 weibl., 3 männl.) Patienten bei n=29 mit fortgeschrittenen Tumorstadien.

Patient	Ge- schlecht	Neoplasien	Stadium	Therapie	MICA in pg/ml
1	w	Diff. großzelliges B-NHL	IA	-	150
2	w	Großzelliges B-NHL	IVB	-	610
3	m	CUP-Syndrom mit Knochenmarksaplasie Lebermetastasen	IV	+	670
4	m	Adenokarzinom des Magens (intestinaler Typ) pulmonale und hepatische Metastasierung	G 2-3, TxM1	+	120
5	w	Adeno-Ca des descendo- sigmoidalen Übergangs	pT3,N2, M0,G3,R0	+	150
6	m	Kardia-Ca Typ III mit Lebermetastasen	pT2,N1, M1,G2	+	120

Abb.10:

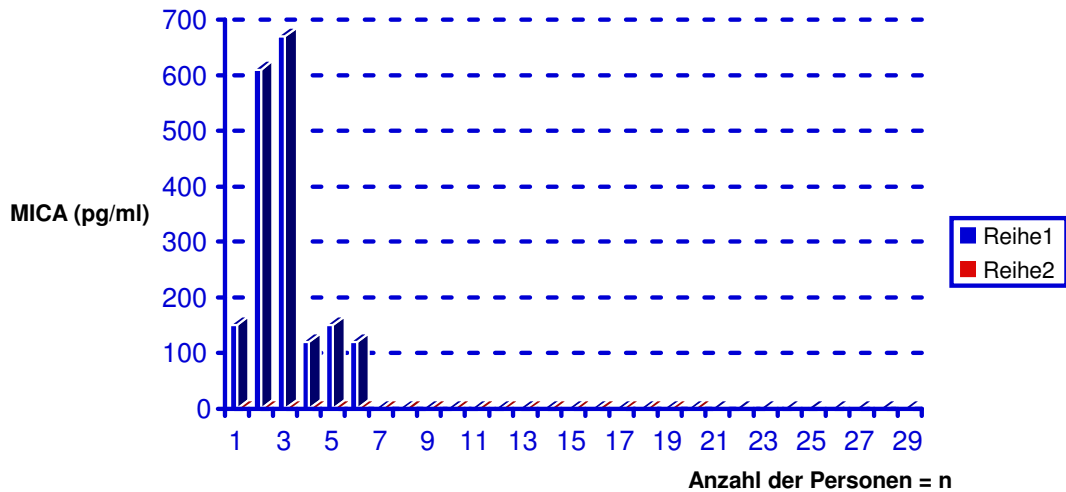


Abbildung 10: Darstellung der im Serum nachweisbaren MICA in pg/ml bei 4 von 15 Patienten mit soliden Tumorerkrankungen und bei 2 von 14 Patienten mit hämatologischen Neoplasien (siehe Tabelle 4.2.1.). In der Kontrollgruppe ließ sich wie zu erwarten kein MICA nachweisen. Die Reihe 1 (blau) gibt beide Patientengruppen an. Reihe 2 (rot) entspricht der Kontrollgruppe.

	Mittelwert MICA	STABW MICA	Minimum MICA	Maximum MICA
Kontrollgruppe	0	0	0	0
hämatologische Neoplasien	54,29	164,86	0	610
Solide Tumoren	70,67	174,29	0	670

Abb. 10.1. Der Mittelwert von MIC im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien betrug 54. Der Mittelwert von MICA der soliden Tumoren dagegen ergab 71. Die gesunde Kontrollgruppe wies im Serum kein MICA nach.

4.2.1. Korrelation zwischen dem löslichen NKG2D Ligand und den aktivierten Oberflächenrezeptoren

Bei einigen Patienten mit soliden und hämatologischen Neoplasien ergaben sich hohe Werte von dem löslichen NKG2D Liganden MICA im Serum. Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen löslichen MICA im Serum mit der Expression von NKG2D auf NK-Zellen, auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten bestand, bzw. ob sich ein Zusammenhang zwischen der Expression mit NKp46, NKp44, NKp33 und CXCR1 auf NK-Zellen fand. Hierbei wurden zuerst die gesamt MICA positiven Patienten gegenüber der Kontrollgruppe und dann jeweils die einzelnen MICA positiven Patientengruppen gegenüber der Kontrollgruppe verglichen. Man konnte jedoch in beiden Fällen keine Signifikanz nachweisen.

In den nachstehenden Diagrammen Abb. 11 bis Abb. 24 werden die MICA positiven Patienten mit soliden und hämatologischen Neoplasien mit der Expression der aktivierten Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen, auf $\alpha\beta$ -Lymphozyten und auf $\gamma\delta$ -Lymphozyten korreliert.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKG2D auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit soliden Tumoren

Ein Patient mit einem sehr hohen Anteil an MICA im Serum von 670 pg/ml zeigte eine deutlich niedrigere NKG2D Expression von 65,1 MFI, als Patienten mit keinem oder nur geringem Anteil an MICA. Diese ließen wiederum eine höhere NKG2D Expression erkennen.

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKG2D auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren.

Abb.11:

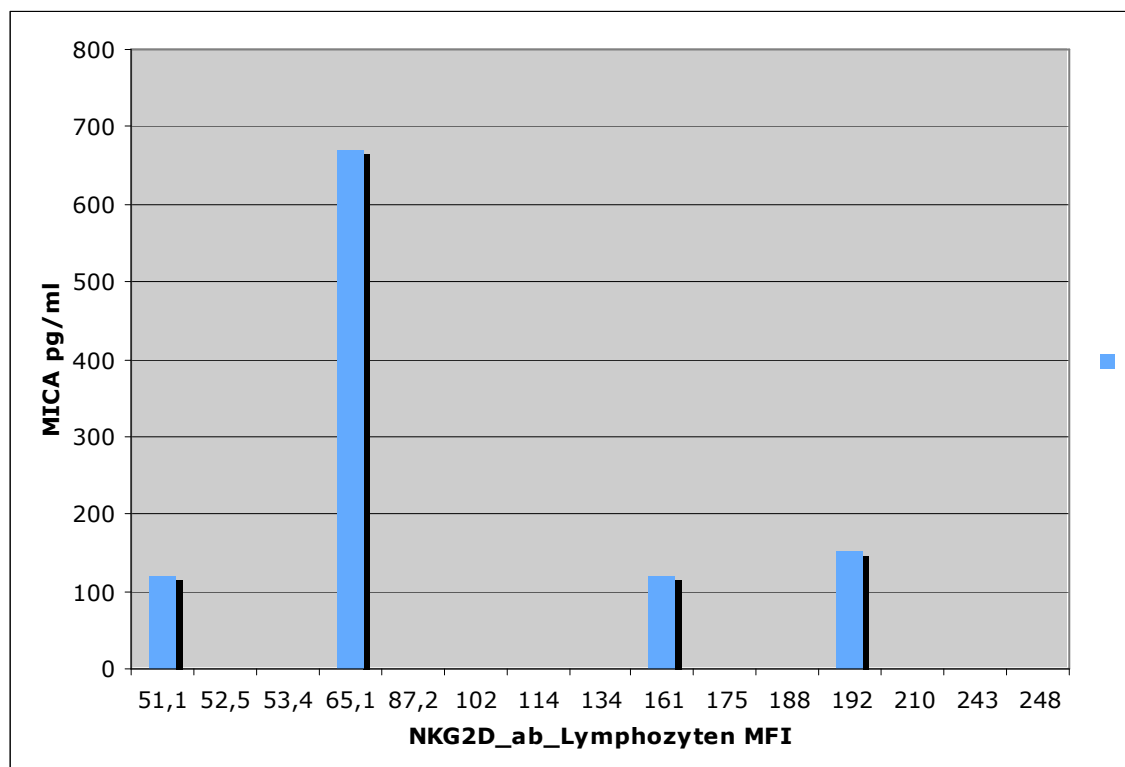


Abbildung 11: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit soliden Tumoren (4 von 15) und Anzahl der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit NKG2D Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKG2D auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKG2D auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien.

Auch hier zeigte sich ein hoher Anteil an MICA im Serum etwa 610 pg/ml mit einer deutlich niedrigeren NKG2D Expression von 97,4 MFI. Hier wäre gegebenenfalls eine Korrelation zu vermuten.

Abb.12:

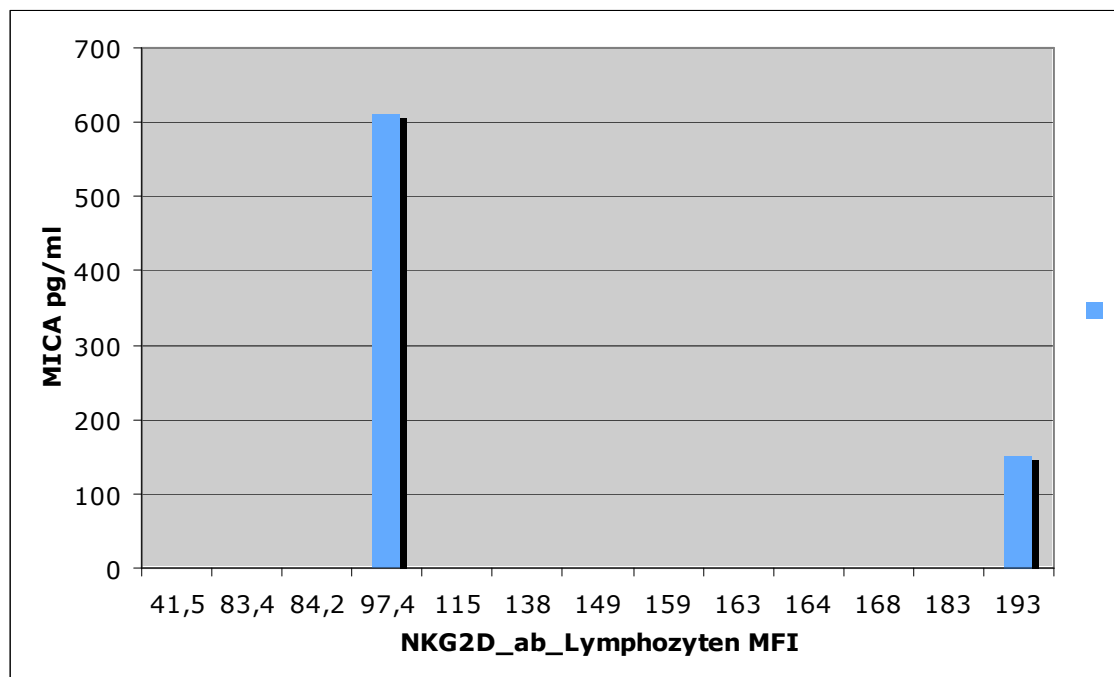


Abbildung 12: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (2 von 14) und Anzahl der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten mit NKG2D Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKG2D auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit soliden Tumoren

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKG2D auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren.

Man erkennt zwei Patienten mit einem hohen Anteil an MICA im Serum bis 670 pg/ml, die eine geringere NKG2D Expression aufwiesen von ca. 81,14 MFI, als Patienten mit niedrigerem MICA oder keinem.

Abb.13:

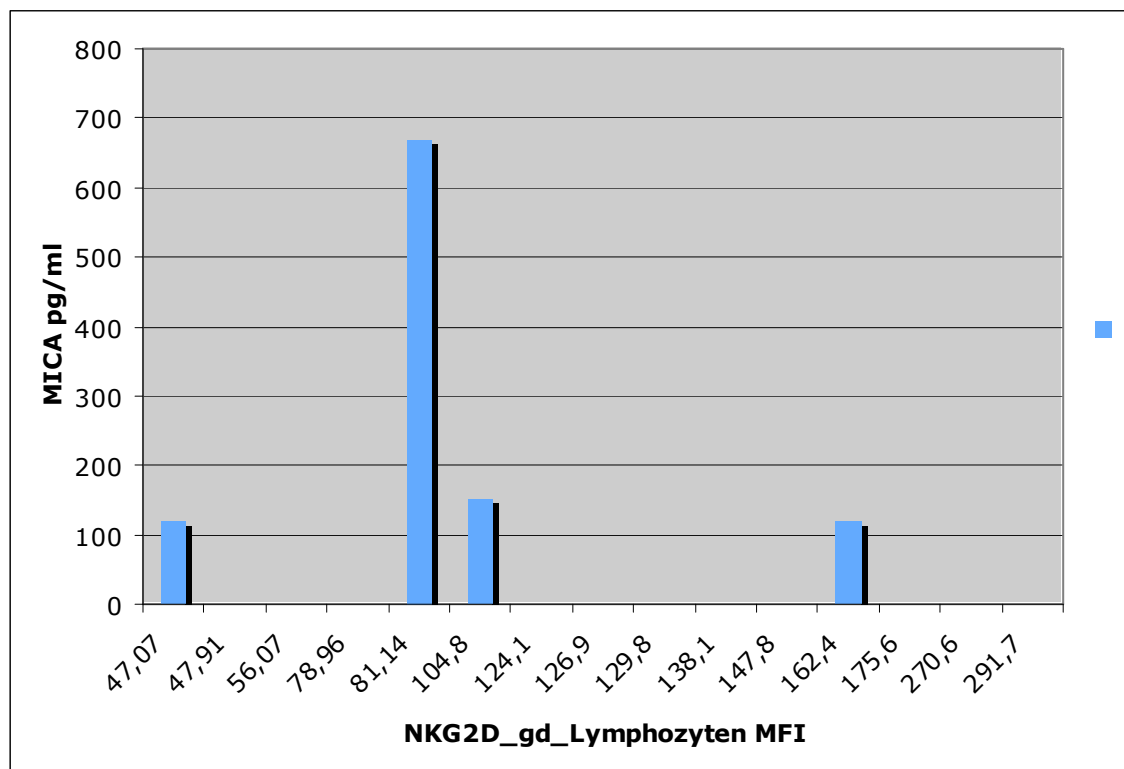


Abbildung 13: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit soliden Tumoren (4 von 15) und Anzahl der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit NKG2D Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKG2D auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKG2D auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien.

Die Patienten mit einem mittleren Anteil an NKG2D Expression von 83,4 und 88,8 wiesen einen mäßigen bis hohen Anteil an MICA im Serum von 150 und 670 pg/ml auf.

Abb.14:

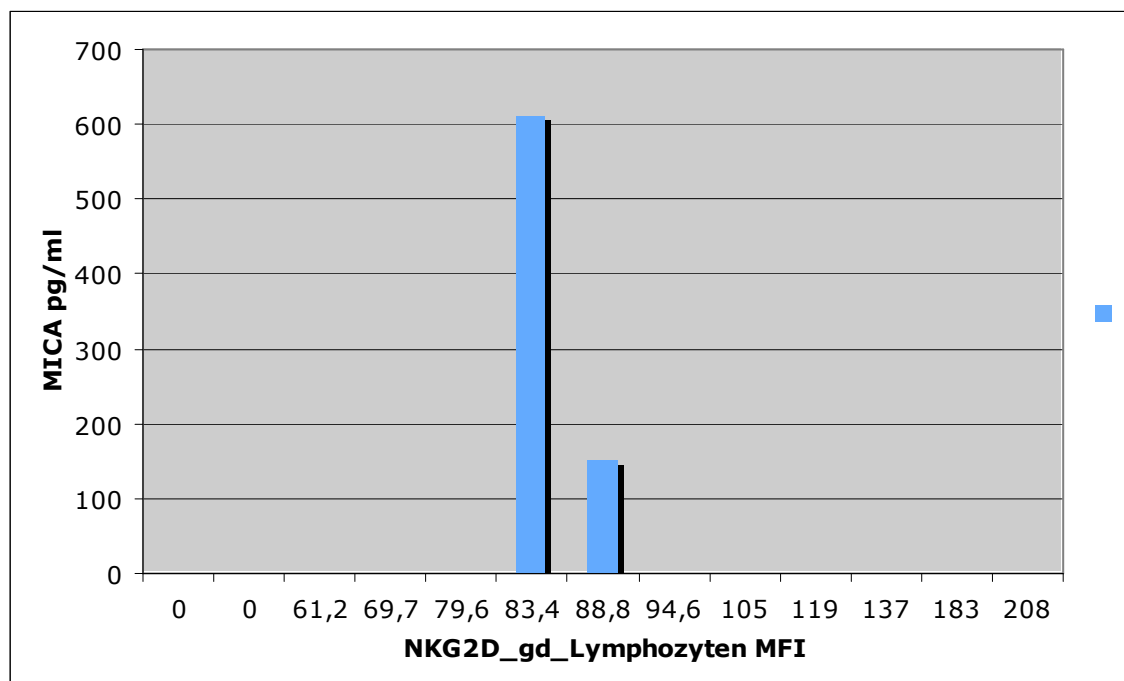


Abbildung 14: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (2 von 14) und Anzahl der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit NKG2D Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKG2D auf NK-Zellen bei Patienten mit soliden Tumoren

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKG2D auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren. Man erkennt, dass der Patient mit einem sehr hohen Anteil an MICA im Serum von 670 pg/ml eine deutlich niedrigere NKG2D Expression von 43,4 MFI aufwies. Zwei Patienten mit niedrigem MICA wiesen eine deutlich höhere NKG2D Expression auf.

Abb.15

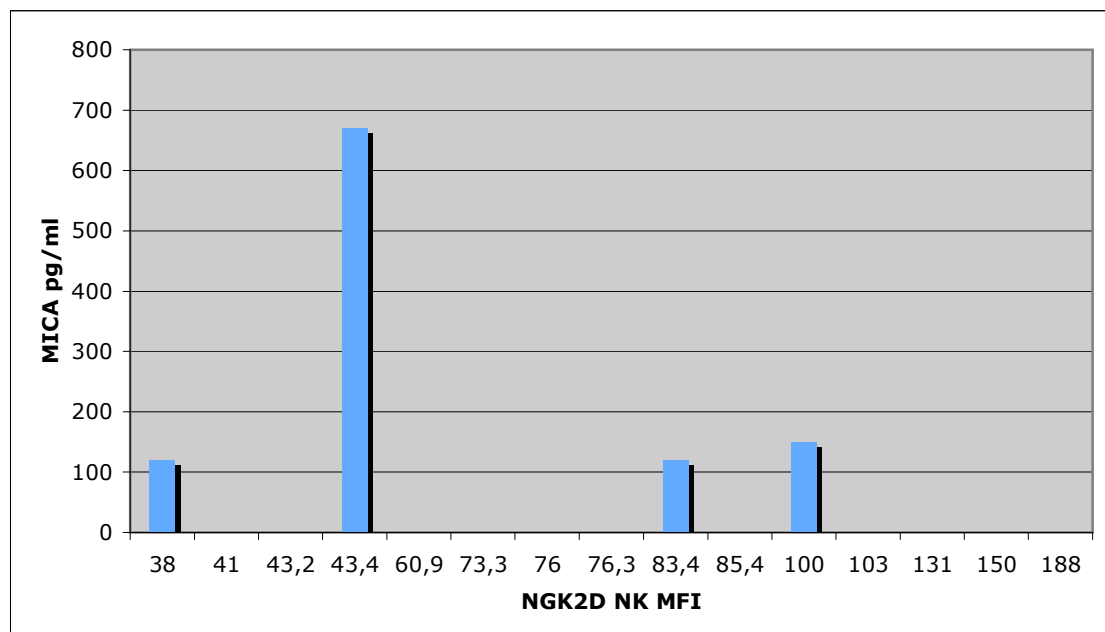


Abbildung 15: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit soliden Tumoren (4 von 15) und der Anzahl der NK-Zellen mit NKG2D Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKG2D auf NK-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKG2D auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien.

Wiederum zeigte sich bei einem Patienten, der einen sehr hohen Anteil an MICA im Serum mit 610 pg/ml hatte, eine deutlich niedrigere NKG2D Expression von 101,22 MFI. Analog zu dem Patienten (4.2.1.1.) mit dem soliden Tumor.

Abb. 16

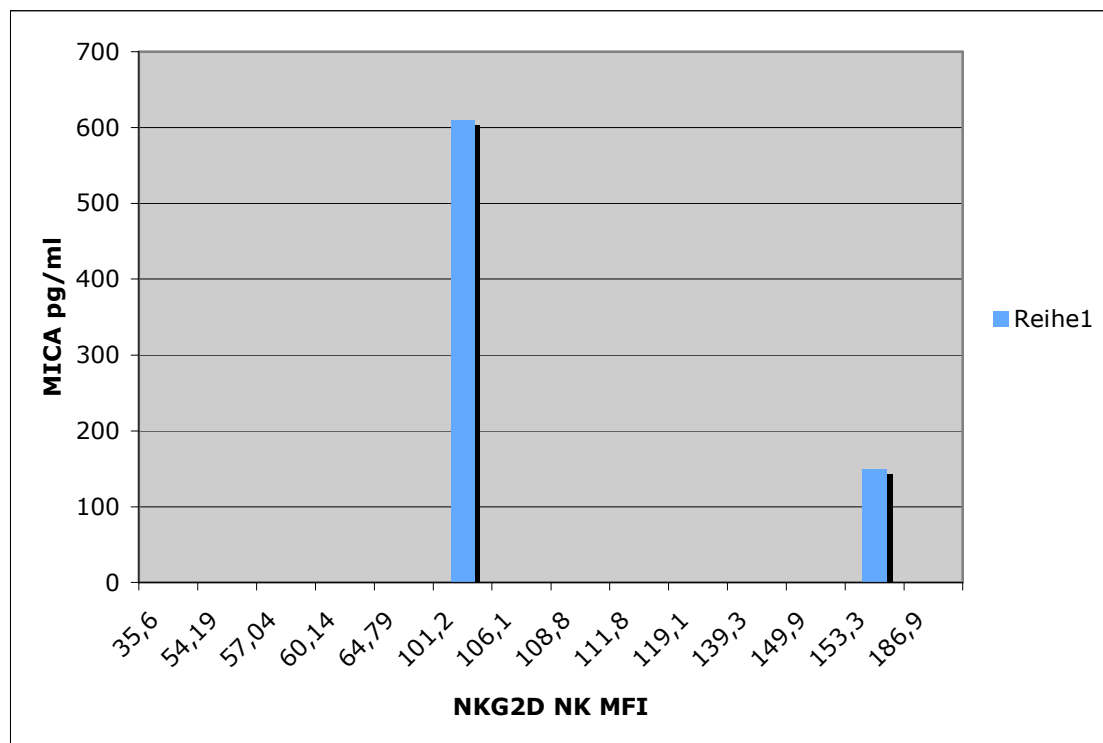


Abbildung 16: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (2 von 14) und Anzahl der NK-Zellen mit NKG2D Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKp46 auf NK-Zellen bei Patienten mit soliden Tumoren

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKp46 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren.

Patienten mit einem hohen Anteil an MICA im Serum zeigten eine deutlich niedrigere NKp46 Expression, als Patienten mit niedrigeren MICA Werten oder keinem. Diese wiesen höhere NKp46 Rezeptoren auf.

Abb.17

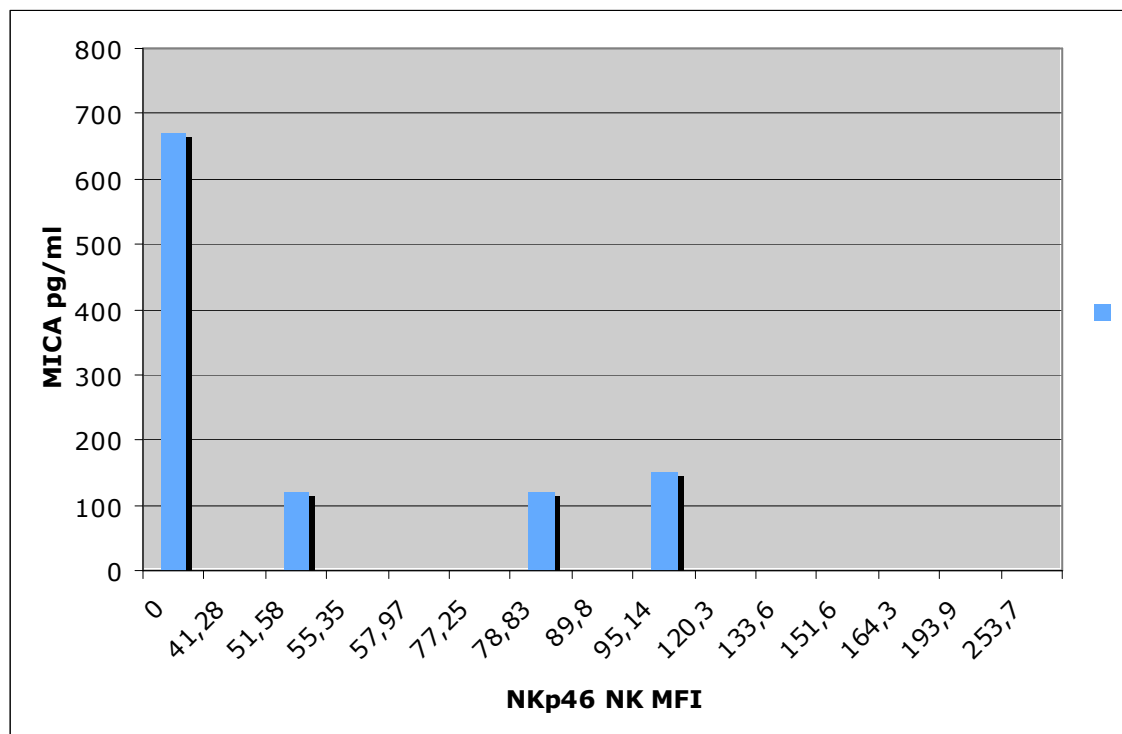


Abbildung 17: Darstellung des MHC-1 Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (4 von 15) und Anzahl der NK-Zellen mit NKp46 Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKp46 auf NK-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKp46 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien.

Bei der hämatologischen Tumorgruppe erkennt man einen Patienten mit MICA im Serum von 610 pg/ml mit einer niedrigeren NKp46 Expression von 99,4 MFI. Im Gegensatz zu Patienten mit keinem MICA oder niedrigeren Werten, diese zeigten höhere NKp46 Rezeptoren.

Abb.18

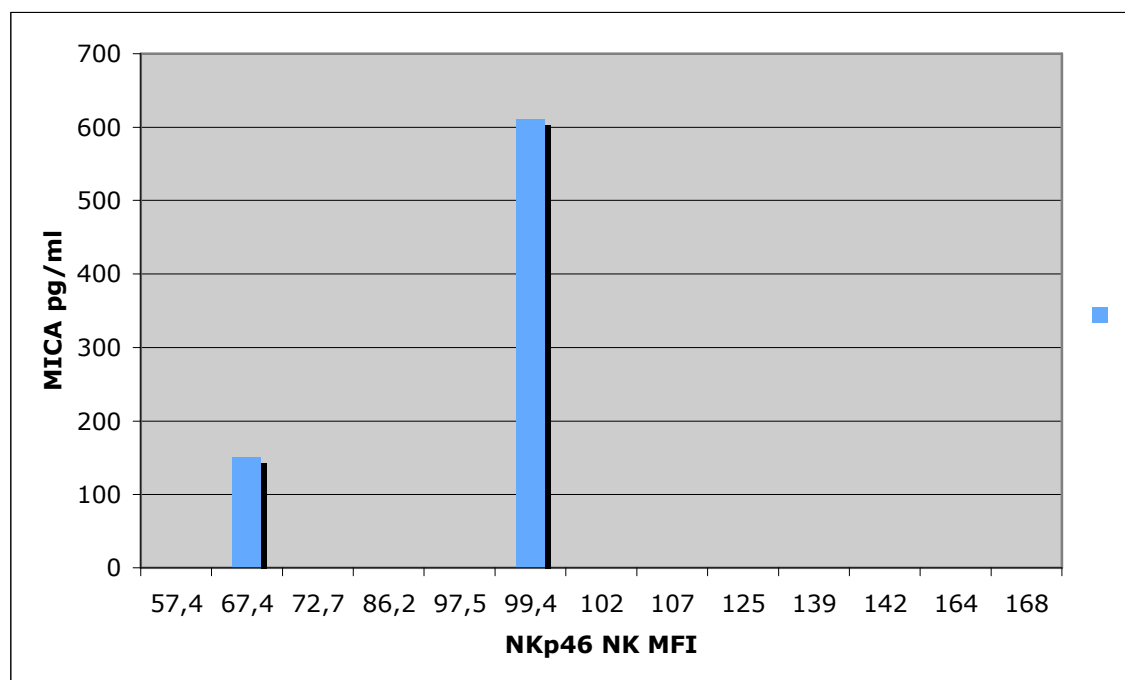


Abbildung 18: Darstellung des MHC-1 Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (2 von 14) und Anzahl der NK-Zellen mit NKp46 Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKp30 auf NK-Zellen bei Patienten mit soliden Tumoren

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKp30 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren.

Hier wird ebenfalls deutlich, dass Patienten mit einem sehr hohen Anteil an MICA im Serum eine deutlich niedrigere NKp30 Expression aufwiesen, als Patienten mit keinem oder nur geringen MICA.

Abb.19:

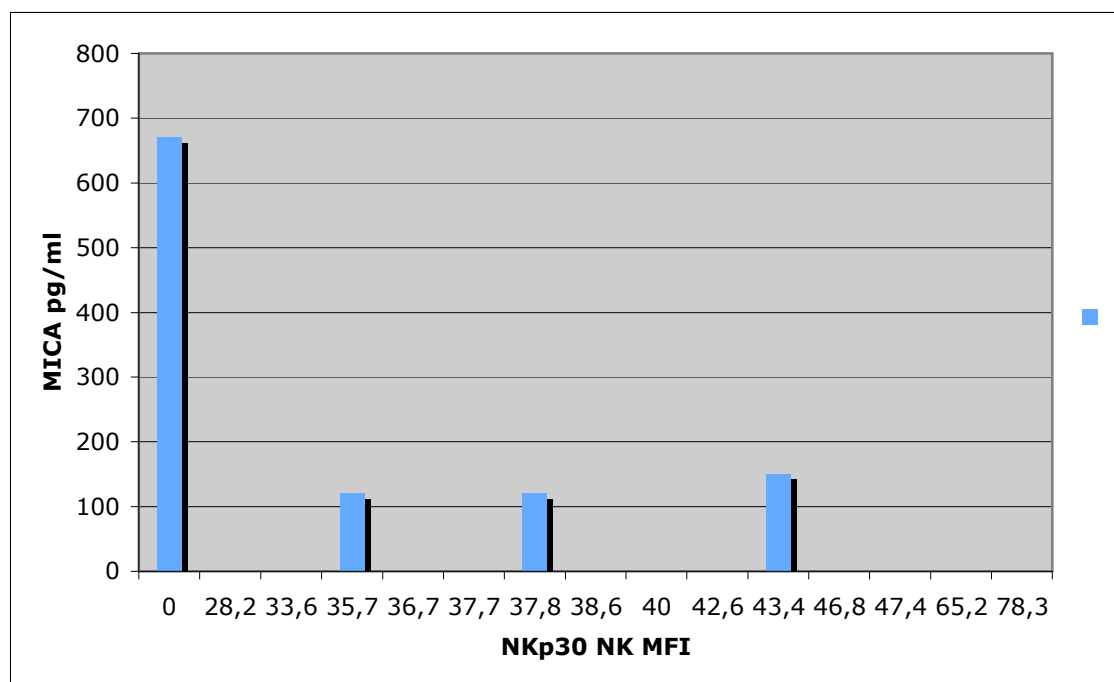


Abbildung 19: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit soliden Tumoren (4 von 15) und Anzahl der NK-Zellen mit NKp30 Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKp30 auf NK-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKp30 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien.

Patienten mit einem hohen Anteil an MICA im Serum ließen eine verminderte Anzahl an NKp30 Rezeptoren erkennen, als Patienten mit keinem MICA oder nur geringem Anteil.

Abb.20:

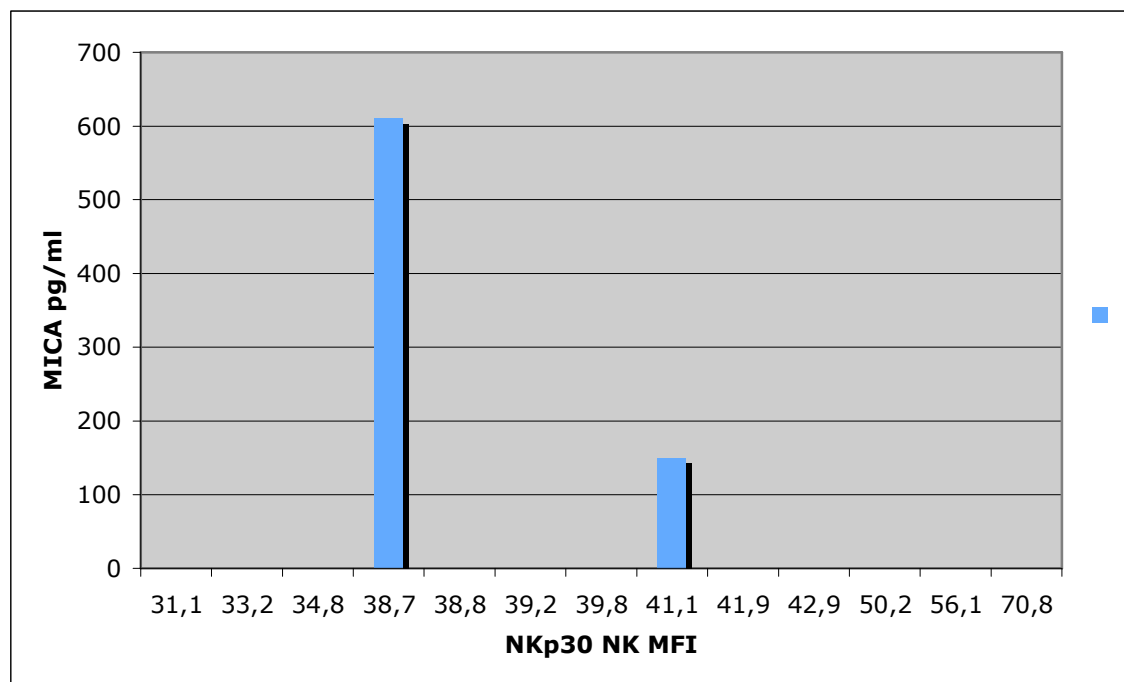


Abbildung 20: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (2 von 14) und Anzahl der NK-Zellen mit NKp30 Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKp44 auf NK-Zellen bei Patienten mit soliden Tumoren

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKp44 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren.

Ebenfalls zeigte sich, dass Patienten mit einem hohen Anteil an MICA im Serum eine deutlich niedrigere NKp44 Expression aufwiesen, als Patienten mit niedrigem MICA oder keinem.

Abb.21:

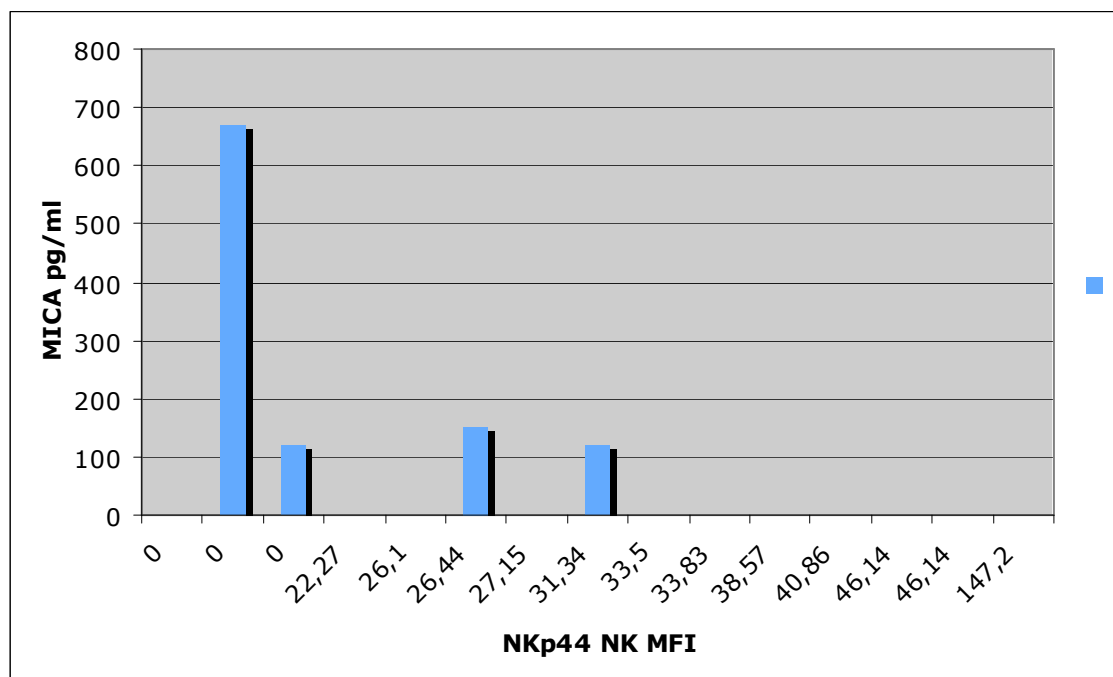


Abbildung 21: Darstellung des MHC-1 Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit soliden Tumoren (4 von 15) und Anzahl der NK-Zellen mit NKp44 Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber NKp44 auf NK-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und NKp44 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien.

Patienten mit einem hohen Anteil an MICA im Serum exprimierten weniger NKp44 Rezeptoren, als Patienten mit keinem MICA oder nur geringem Anteil.

Abb. 22:

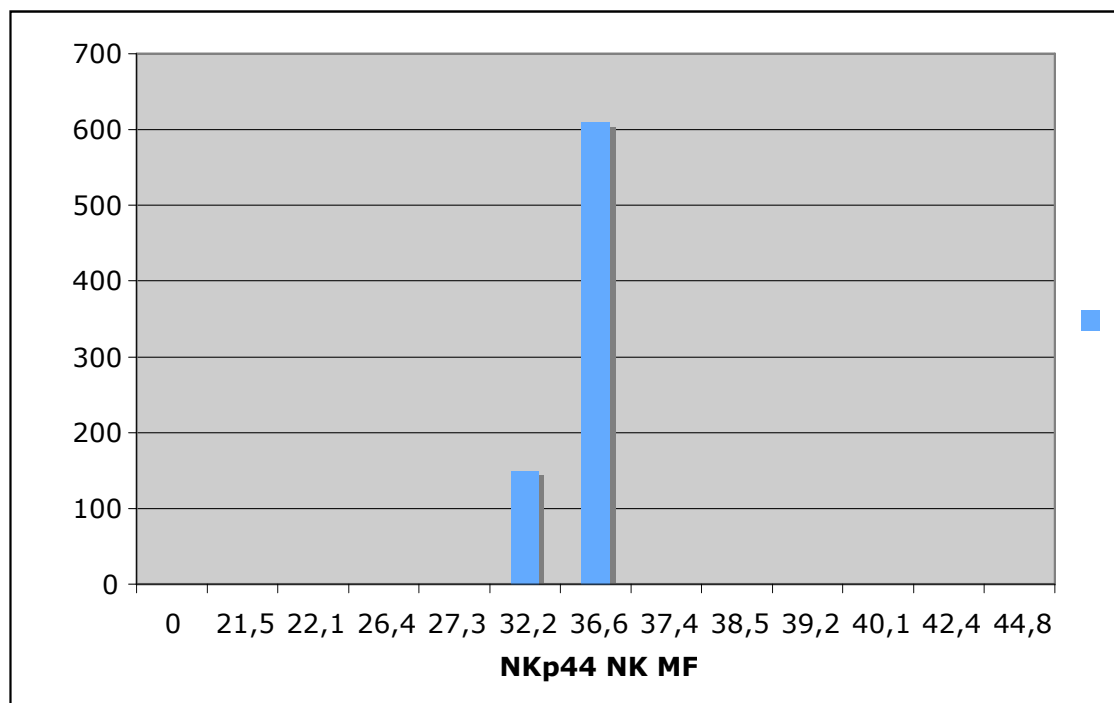


Abbildung 22: Darstellung des MHC-I Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (2 von 14) und Anzahl der NK-Zellen mit NKp44 Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber CXCR 1 auf NK-Zellen bei Patienten mit soliden Tumoren

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und CXCR1 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren.

Hier zeigte sich ebenfalls deutlich, dass ein Patient mit einem sehr hohen Anteil an MICA im Serum von 670 pg/ml eine deutlich niedrigere CXCR1 Expression, von 67,95 MFI aufwies, als Patienten mit niedrigerem MICA oder keinem.

Abb.23:

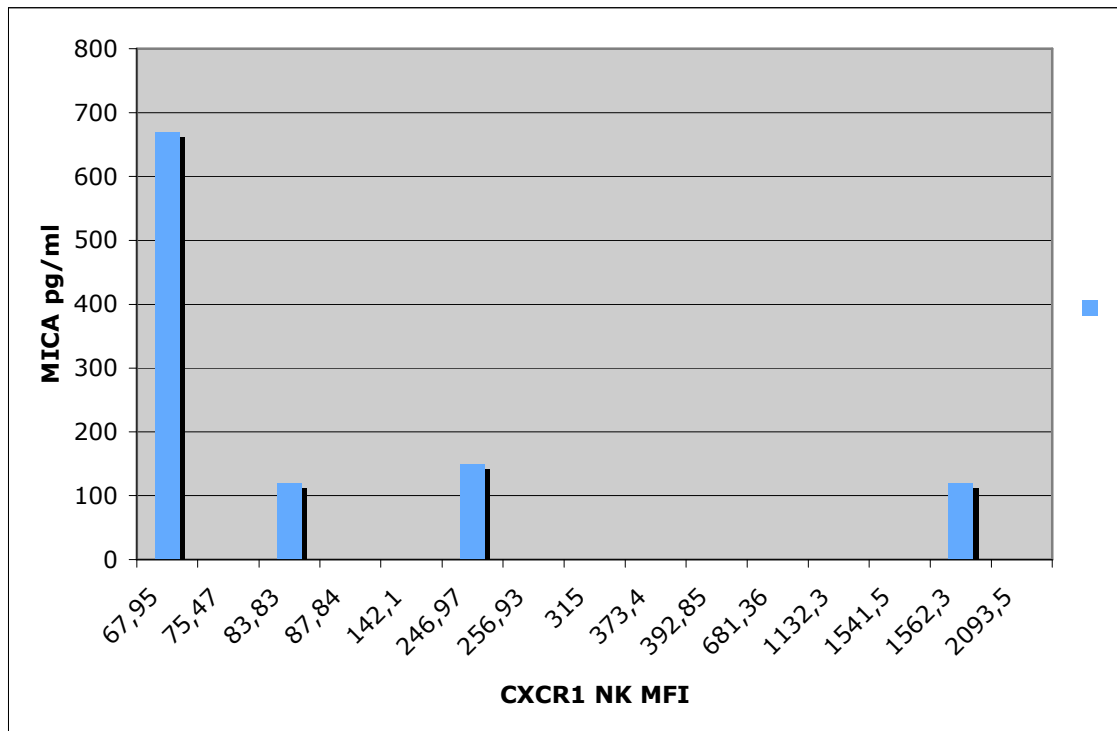


Abbildung 23: Darstellung des MHC-1 Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit soliden Tumoren (4 von 15) und Anzahl der NK-Zellen mit CXCR 1 Expression.

Löblicher NKG2D Ligand gegenüber CXCR 1 auf NK-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien

Auf Grund der niedrigen Anzahl der Patienten ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen MICA im Serum und CXCR1 auf NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien.

Bei den hämatologischen Patienten erkennt man bei einer Person einen sehr hohen Anteil an MICA im Serum von 610 pg/ml mit einer geringeren CXCR1 Expression von 743 MFI. Patienten mit keinem MICA oder nur geringem Anteil besaßen höhere CXCR1 Expressionen.

Abb.24:

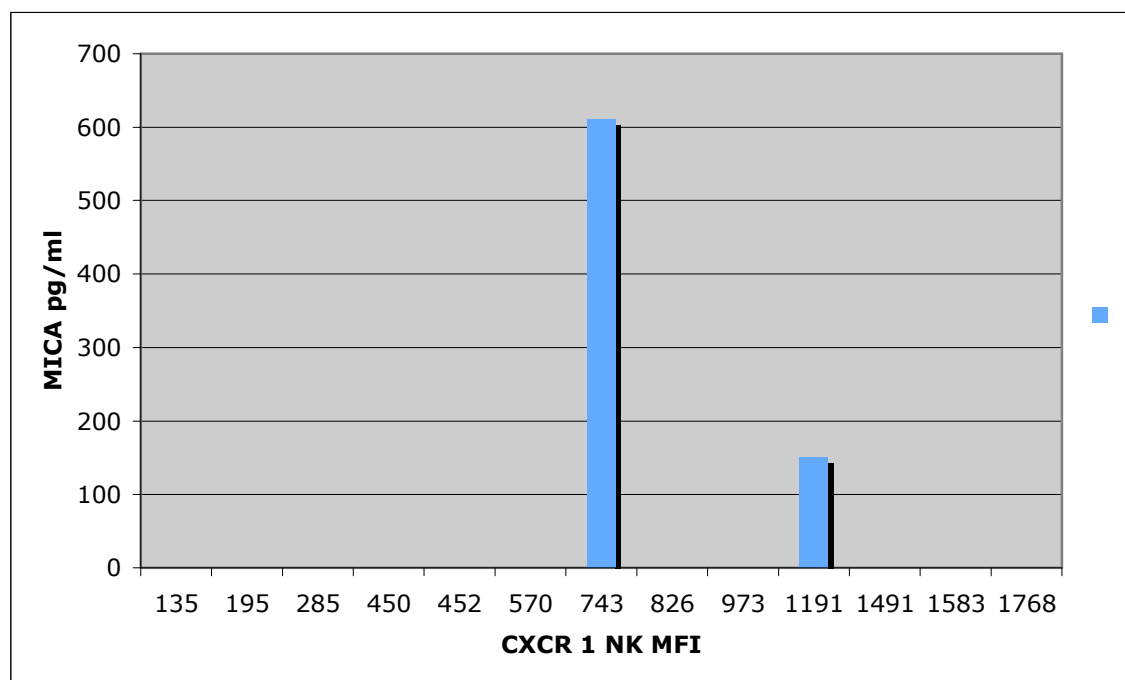


Abbildung 24: Darstellung des MHC-1 Glycoproteins MICA im Serum der Patienten mit hämatologischen Neoplasien (2 von 14) und Anzahl der NK-Zellen mit CXCR 1 Expression.

5. Diskussion

5.1. Untersuchung von Lymphozytenrezeptoren auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen bei hämatologischen und soliden Tumoren im Vergleich zu gesunden Personen

Von vielen Autoren wird die Hypothese vertreten, dass eine verminderte Anzahl an Lymphozyten im peripheren Blut von Tumorpatienten vorherrscht. Man weiß, dass z.B. bei Ovarial Tumoren eine erhöhte Anzahl an intramuralen T-Lymphozyten das Wachstum des Tumors sowie die Mortalität senken. Bei kolorektalen Karzinomen mit erhöhten Gedächtnis-T-Zellen wird eine frühe Metastasierung vermindert und das Überleben gesteigert (96,97). Eine Assoziation zwischen der reduzierten Anzahl an Lymphozyten bei Tumorpatienten spielt neben dem fortgeschrittenen Stadium der Tumoren (T4) auch die Metastasierung (M1) oder die bereits statt gehabte Strahlentherapie oder die zytotoxische Behandlung eine wichtige Rolle (96,97).

Die in der Arbeit gefundenen Werte für Lymphozyten von Normalspendern im peripheren Blut entsprechen in etwa den Normwerten (15 bis 50 %), die bei gesunden Personen dieses Alters durchschnittlich 36% mit einer mittleren Standardabweichung von 6% betragen. In der ersten Gruppe, den Patienten mit hämatologischen Neoplasien, wurde mit einem Mittelwert von 21% ein niedrigerer Wert als in der Kontrollgruppe gefunden, der niedrigste Wert lag bei nur 5%. In der zweiten Gruppe, den Patienten mit soliden Tumoren, wurde mit einem Mittelwert von 20% ein ebenfalls deutlich niedrigerer Wert als in der Kontrollgruppe gemessen. In diesem Kollektiv betrug der niedrigste Wert ebenfalls 5%. Die hier vorgelegte Untersuchung bestätigt die Angaben anderer Autoren (Dellon et al., Krüger et al.), dass zwischen Gesunden und Patienten mit soliden und hämatologischen Neoplasien in der Regel ein signifikanter Unterschied von 15-16% Punkten existiert. Zwischen den einzelnen Tumorgruppen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Lymphozyten. Diese waren in beiden Fällen gleich stark vermindert.

Innerhalb der Lymphozyten war die Subpopulation der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten bei soliden und hämatologischen Neoplasien ebenfalls signifikant vermindert. Sie wichen im

Mittelwert von 7 bis 13% Punkte im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Die Tumorgruppen jedoch unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

In manchen leukämischen Zellreihen werden z.B. MHC Klasse I Proteine hochreguliert, welche nach Classen et al. 2003 einen inhibitorischen Effekt auf NK-Zellen auslösen. Leukämie-Patienten haben so oft eine hohe Anzahl an abnormen NK-Zellen, phänotypisch und funktionell (Pierson und Miller, 1996; Castello et al., 2004). Die Werte aus dieser Untersuchung zeigten ebenfalls für die erste Gruppe, die hämatologischen Neoplasien, einen signifikant erhöhten Mittelwert von 16% gegenüber der Kontrollgruppe, deren Mittelwert bei 8% lag. Der höchste Wert bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien lag bei 45% (Morbus Hodgkin Stadium IV B und NHL Stadium IV A ohne Tumorspezifische Therapie). Bei den soliden Tumoren wurden nur 10% NK-Zellen im Mittelwert gefunden. Hier betrug der höchste Wert 19% (exulceriertes Adenokarzinom des Sigmas pT4, pN1, M0). Nur bei einer gesunden Person lag ein Wert weit über 22%, somit deutlich über der Norm von 10 bis 13%. Das kann möglicherweise durch entzündliche Veränderungen im Körper erklärt werden, die bei dieser Person zum Zeitpunkt der Untersuchung bestanden. Die soliden Tumoren unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Zwischen den einzelnen Tumorgruppen ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der NK-Zellen.

$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimieren eine Menge an anderen aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren. Der am besten untersuchte aktivierende Oberflächenmarker ist NKG2D. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von malignen Zellen und Infektionen. Dabei wird der Hauptteil der T-Zellen mit NKG2D Expression durch die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten gebildet. Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ist dieser Marker deutlich in der Anzahl vermindert sowohl auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten als auch auf NK-Zellen (21). Liganden für NKG2D sind MICA/MICB. Diese löslichen Liganden werden durch Tumorzellen und hämatopoetischen Zellen gebildet. Nur 3-7 % NKG2D positive NK-Zellen wurden bei den Patienten mit einem kolorektalen Karzinom gefunden. Bei gesunden Personen hingegen fanden sich bis zu 60-67% von NKG2D positiven NK-Zellen. Die gefundenen

Ergebnisse in der Arbeit stimmen mit denen anderer Autoren überein. Die gesunden Personen hatten einen erhöhten Wert an NKG2D auf NK-Zellen im peripheren Blut (bis zu 80%), wo hingegen die Patientin mit soliden Tumoren nur 74% dieser Zellen aufwies. Bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien waren die NKG2D positiven NK-Zellen auf 68% vermindert. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen der Kontrollgruppe und den hämatologischen Neoplasien gefunden. Zwischen den Tumorpatienten war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

In der eigenen Untersuchung waren $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit NKG2D Expression ebenfalls bei Tumorpatienten mit hämatologischen Neoplasien gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Die NKG2D positiven $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und die NKG2D positiven $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten der soliden Tumorgruppe zeigten weder einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe noch gegenüber der Patientengruppe mit hämatologischen Neoplasien.

Neben dem oben genannten aktivierenden NKG2D Oberflächenrezeptor gibt es weitere aktivierende natürliche zytotoxische Oberflächenrezeptoren (NCRs), die größtenteils auf NK-Zellen exprimiert werden. Dazu gehören NKp30, NKp46 und NKp44. Tumoren können der Immunüberwachung dieser aktivierenden Faktoren entgehen, indem sie immunsupprimierende Moleküle ausschütten, z.B. TGF- β 1, IL-4, IL-10 und PGE₂. TGF- β 1 wird von verschiedenen Tumoren gebildet, wie z.B. das maligne Melanom, das Neuroblastom, die Karzinoide und die Leukämien. Castriconi et al. (99) berichtete, dass TGF- β 1 die Expression von NKp30 und NKG2D auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in vitro herunterreguliert und die Hochregulation von NKG2D durch die Stimulation von IL-2 oder IL-15 inhibiert. In dieser Untersuchung war nur eine geringe Verminderung der NKp30 auf NK-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit soliden und hämatologischen Neoplasien im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. Der geringe Unterschied erwies sich nicht als signifikant. Für die Rezeptoren NKp44 und NKp46 konnte man ebenfalls kein Korrelat zwischen den Tumorpatienten und den gesunden Personen finden.

Die Aktivität der NK-Zellen wird weiterhin kontrolliert durch die Expression von inhibitorischen Rezeptoren, welche mit den humanen Leukozyten HLA Klasse I

Molekülen interagieren. Die HLA Klasse I spezifischen Rezeptoren sind die Killer Cell immunglobulin-like Receptors (KIRs), zu denen unter anderem p58.1, p58.2, p70 und NKG2A gehören. Es ist generell akzeptiert das IL-2 die Expression von NKp44 auf NK-Zellen erhöht (104). Verschiedene Zytokine, IL-2, IL-15 und IL-18, zeigen ebenfalls eine Hochregulation von NKG2D. Auf der anderen Seite gibt es aber auch ein inhibitorisches Signal durch die Zytokine, das die Aktivität der NK-Zellen mindert. In diesem Kontext zeigt sich, das IL-15 nicht nur NKG2D stimuliert, sondern auch den inhibitorischen Rezeptor NKG2A erhöht oder IL-18 KIR's und KAR's gemeinsam reguliert (103 bis 107).

In dieser Arbeit wurde die Expression der KIRs (p58.1, p58.2, p70 und NKG2A) auf der Zelloberfläche von NK-Zellen, $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten untersucht. Laut anderen Autoren sollen diese Faktoren bei Infektionen oder Tumorpatienten ansteigen (75). Diese Aussage konnte in der eigenen Untersuchung nicht bestätigt werden. Bei den hämatologischen Neoplasien wiesen die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten eine deutlich signifikante Verminderung der Expression an p58.1 und NKG2A im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf. Möglicherweise könnte es daran liegen, dass die Patienten zum Teil bereits chemotherapeutische Maßnahmen durchliefen.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden insbesondere NK-Zell Subpopulationen wie CD56 +16+ NK-Zellen, CD56 +16- NK-Zellen und CD56-16+ NK-Zellen untersucht. Sie spielen bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle (114). Diese Zellen besitzen ein hohes Potential an Zytotoxizität und exprimieren MHC Klasse I spezifische inhibitorische Rezeptoren. Im Gegensatz dazu produzieren CD56+ NK-Zellen in Lymphknoten einen Hauptanteil an Zytokinen. Studien haben gezeigt, dass der Anteil an CD56+16+ NK-Zellen im Serum von Gesunden etwa 20-55% beträgt und dieser bei einer HIV-Infektion sinkt (75). In dieser Untersuchung konnten wir diese Beobachtung für Tumorpatienten nicht bestätigen. Es wurden im Gegenteil leicht erhöhte Werte an CD56+16+ NK-Zellen im Serum gefunden, nämlich etwa 28%-37% bei den Tumorpatienten und etwa 27% bei den Gesunden. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

Weiterhin fand man im peripheren Blut von Gesunden und Tumorpatienten einen konstanten Anteil an CD 56+16- NK-Zellen von ca. 1,8 bis 2,3%. Im Gegensatz zu

anderen Literaturangaben (75), die etwa 6-9% an CD 56+16- NK-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen haben, fällt der Anteil beider untersuchten Patientengruppen etwas geringer aus.

In der Untersuchung von Domenico et al. (75) konnte gezeigt werden, dass die Zahl der CD56-16+ NK-Zellen im peripheren Blut bei HIV-1-seropositiven Patienten deutlich ansteigen und zwar bis auf 15-45%. Für die eigene Analyse trifft diese Aussage für hämatologische Patienten zu, jedoch nicht für solide Tumoren. Die Zahl der CD56-16+ NK-Zellen bei Gesunden betrug etwa 7 % und lag bei hämatologischen Neoplasien bei etwa 15%.

NK-Zellen exprimieren zusätzlich Chemokin Rezeptoren (CXC), unter anderem CXCR1 und CXCR2. Diese CXC-Rezeptoren können Zytokine binden, welche von Lungentumoren genauso wie bei hoch metastasierenden Tumoren sezerniert werden. CXCR1 bindet dabei IL-8 und CXCR2 bindet ENA-78 (108). Diese Chemokinrezeptoren sind wichtig für die Zellmigration.

Am untersuchten Patientenkollektiv wurde eine Analyse der Zelloberfläche von NK-Zellen bezüglich der Expression von CXCR1 durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass auf der Oberfläche von NK-Zellen bei beiden Tumorgruppen die Anzahl an CXCR1-Rezeptoren gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöht war. Der Unterschied erreichte keine Signifikanz. Vergleicht man die beiden Tumorgruppen, so fiel auf, dass bei den hämatologischen Neoplasien die Rezeptordichte (MFI 179 im Mittelwert) höher ausfiel als bei den soliden Tumoren (MFI 156 im Mittelwert). Das könnte daran liegen, dass es sich bei den Studiengruppen hauptsächlich um kolorektale - und Magen-Karzinome sowie hämatologische Erkrankungen handelte, die nur eine geringe Metastasierung aufwiesen und zum Zeitpunkt der Untersuchung größtenteils unter dem Einfluß der Chemotherapie standen. Eine andere Erklärung wäre, dass die Tumorzellen bereits CXC-Liganden produziert haben, so dass CXCR 1 nicht mehr binden konnte und so herunterreguliert wurde.

Zusätzlich wurde die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten Population im peripheren Blut untersucht. Laut Domenico et al. (75) werden die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten bei HIV-1-seropositiven Patienten und Tumorpatienten bis auf 0,5-10% herunterreguliert. In dieser

Untersuchung war die Zellgruppe allerdings statistisch nicht signifikant erniedrigt, obwohl man eine geringe Verminderung (um 0,3 bis 1 %) dieser Zellen im peripheren Blut erkennen konnte. Als Erklärung für diesen unterschiedlichen Befund könnte eine zu geringe Fallzahl an Personen sein.

Folgend wurden die Untergruppen der V δ 1 und V δ 2 $\gamma\delta$ -Zellen analysiert. Diese Zellen besitzen eine hohe lytische Aktivität und sezernieren inflammatorische Zytokine, die direkt Einfluß nehmen auf die Immunantwort bei Infektionen und Tumoren. Die meisten Zellen der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten exprimieren V δ 2 und V γ 9 und zwar etwa 60%. 20-30% exprimieren V δ 1. V δ 9V γ 2 Zellen aktivieren ebenfalls unreife dendritische Zellen und konventionelle Th1-Zellen. So spielt diese Untergruppe V δ 9V γ 2 eine wichtige Rolle im Grenzbereich zwischen erworbenem und angeborenem Immunsystem. In der Entwicklung der Immuntherapie werden z.B. $\gamma\delta$ -T-Zellen stimuliert, die so besser auf B-Zell-Lymphome oder maligne Myelom-Zellen mittels TCR reagieren.

Es wurde erwartet, dass bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen die Anzahl der V δ 1- und V δ 2- Lymphozyten herunterreguliert wird und so der Tumor dem Immunsystem besser entkommen kann. Leider konnten wir in unseren Daten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientenkollektiven feststellen. Es zeigte sich zwar, dass die Tumorpatienten, vor allem hämatologische Patienten, einen deutlich verminderten Anteil an V δ 1- und V δ 2-Lymphozyten im peripheren Blut aufwiesen, jedoch nicht signifikant. Diese Ergebnisse könnten auch daran liegen, dass die Mehrzahl der soliden Tumorpatienten bereits eine Chemotherapie erhalten hatten und die hämatologischen Patienten nicht.

Für die zytotoxischen NK-ähnlichen Zellgruppen CD16+V δ 1 $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und CD16+V δ 2 $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Karzinompatienten und der gesunden Kontrollgruppe. Die Anzahl dieser Zellen lag bei allen Patientengruppen bei etwa 0,04 bis 1,1%. Studien bei HIV-1 Patienten $\gamma\delta$ -Lymphozyten Population haben gezeigt, dass CD16+V δ $\gamma\delta$ -Lymphozyten hochreguliert werden, wenn sie über Phosphatantigene stimuliert werden (75). Vermutlich sind diese Zellen bei unseren Karzinompatienten durch die Chemotherapie reduziert.

NKT-Zellen spielen in der Immunantwort eine paradoxe Rolle. Es gibt zwei verschiedene Typen von NKT-Zellen, die beide jeweils verschiedene Arten von Zytokinen produzieren können. Dazu gehören Th1 Zytokine, sie sind verbunden mit einem protektiven Schutz bei der Immunantwort und die Th2 Zytokine, die eine supprimierende Wirkung auf die Tumormunität haben. Die NKT-Zellgruppe macht nur einen kleinen Teil der T-Lymphozyten im menschlichen peripheren Blut aus.

Einige Untersuchungen wiesen einen Zusammenhang zwischen der Reduktion an NKT-Zellen Typ I und der Tumorprogression auf (119). Die Autoren berichteten, dass eine steigende Zahl der NKT-Zellen im peripheren Blut bei hämatologischen Patienten die Überlebensrate steigerte (120). Außerdem wurde eine verbesserte Prognose bei kolorektalen Karzinomen beobachtet (121).

In der eigenen Untersuchung zeigte die solide Tumorgruppe einen gering erhöhten Anteil an NKT-Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und der hämatologischen Tumorgruppe. Die Werte waren jedoch nicht signifikant erhöht. Dies könnte daran liegen, dass diese Patienten bereits durch die Therapie profitiert haben und so die Anzahl der NKT-Zellen wieder steigt, jedoch nicht signifikant. Das Patientenkollektiv der hämatologischen Tumore besaß ähnlich niedrige Zahlen an NKT-Zellen im peripheren Blut wie die Kontrollgruppe. Grund dafür sind womöglich die fortgeschrittenen Tumorstadien und die fehlenden Therapien.

5.2. Korrelation zwischen löslichen NKG2D Liganden und der Expression von aktivierenden Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen und Lymphozyten

Die Mechanismen, der Immunantwort auszuweichen, wurden ausreichend bei Viren untersucht. Auch Tumoren entwickeln zunehmend Möglichkeiten, dem Immunsystem zu entkommen. Der Mechanismus schließt MHC Klasse I Herunterregulation, Antigenprozessierung, Antigen-Präsentation, Chemokin- und Cytokin- Produktion sowie und Lymphozyten-Rezeptor-Expression mit ein. Epitheliale Tumoren überexprimieren zum Teil MHC Klasse I Moleküle wie MIC, die durch den bereits oben beschriebenen aktivierenden Oberflächenrezeptor NKG2D erkannt werden. Zu diesen Tumoren gehören Lungen-, Mamma-, Kolon-, Nieren-, Magen-, Ovarial- und Zervixkarzinome. Außerdem werden MIC Moleküle (MICA/MICB) auf Zellen exprimiert, die physiologischem Stress ausgesetzt oder die genetisch verändert sind. Gesunde Zellen exprimieren in der Regel kein MICA oder MICB.

Da bei Tumorpatienten die Expression von NKG2D und dem Chemokin-Rezeptor CXCR1 auf Lymphozyten erhöht ist, kommt es zu einer Bindung von Liganden und Rezeptoren, die wiederum die Zellyse von Tumorzellen und auch von pathogen-infizierten Zellen aktivieren. Allerdings wird durch das ständige Wachstum des Tumors und durch die Überstimulation des MIC/NKG2D Signal die Zellyse abgeschwächt. Daneben sezerniert der Tumor lösliche MIC-Liganden, die wie TGF- β 1 im Serum die Funktion und Expression von NKG2D und CXCR1 auf Lymphozyten einschränken und dafür sorgen, dass die Tumorzellen der Immunüberwachung entkommen (Groh et al., 2002; Wu et al., 2004; 21, 28, 100, 101).

Auch in der eigenen Untersuchung ließ sich bei Patienten mit fortgeschrittenen epithelialen und hämatologischen Tumoren ein signifikant erhöhter Wert an löslichen MICA im Serum messen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, insbesondere bei metastasierten Tumoren. Die Werte stimmten mit den Ergebnissen von Wu et al. überein, welcher bei Prostata-Karzinom-Patienten ebenfalls erhöhte MICA-Werte fand (109). Man kann davon ausgehen, dass ein erhöhter Wert an MICA bei hämatologischen Tumoren ebenso Einfluss auf das Immunsystem nehmen wird, wie bei epithelialen Tumoren.

Verschiedene Studien haben ein Korrelat zwischen dem im Serum gelösten MICA-Molekül und der verminderten Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D und NKp44 auf NK-Zellen gefunden (21,28). Es wurde versucht nicht nur einen Unterschied zwischen MICA und der Herunterregulation von NKG2D auf NK-Zellen zu finden, sondern auch eine Abhängigkeit zwischen MICA und NKG2D auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten zu beweisen, bzw. für NKp46, NKp33 und CXCR1 auf NK-Zellen. Es konnte jedoch in dem untersuchten Patientenkollektiv kein statistisch relevanter Unterschied zwischen erhöhten MICA-Werten und einer Reduktion von aktivierenden Rezeptoren festgestellt werden. Möglicherweise lag dies an der niedrigen Anzahl der Patienten, die MICA im Serum nachwies, nämlich nur 6 Patienten von 29 oder an der Heterogenität der Patienten mit unterschiedlichen Tumoren und unterschiedlichen Tumorstadien. Trotzdem ließ sich erkennen, dass die Patienten mit erhöhten MICA-Werten eine Verminderung der NKG2D Expression auf NK-Zellen, auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten sowie eine Reduzierung des CXCR1 Rezeptors der NK-Zellen und eine geringe Verminderung an NKp44, NKp30 und NKp46 der NK-Zellen aufwies. Das lässt darauf schließen, dass womöglich noch weitere Faktoren, wie z.B. TGF β 1 gemeinsam mit MICA die Herunterregulation von NKG2D, CXCR1, NKp44, NKp30 oder NKp46 bewirken. Im Gegensatz dazu berichtete Osaki darüber, dass erhöhte MICA-Werte im Serum bei Magen-Karzinom Patienten nicht in Verbindung mit einer Verminderung von NKG2D auf CD8+T-Zellen stehen (110). In der eigenen Untersuchung verwendeten wir nur CD3 Antikörper, so dass wir nicht zwischen NKG2D exprimierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen unterscheiden konnten. Dies könnte ebenfalls ein Grund sein für die fehlende Korrelation zwischen dem MICA-Level und den NKG2D exprimierenden T-Zellen. Weitere Studien unter Einbeziehung von CD4+ und CD8+ T-Zellen könnten so die Aussage über eventuelle Koorelationen untermauern.

Schlussfolgernd sollten zukünftige Studien über hämatologische oder solide Tumoren mehr über aktivierende T-Zellen-Rezeptoren forschen, welche über den Oberflächenrezeptor NKG2D und die KARs beeinflusst werden.

Diese Erkenntnisse über die grundlegenden Mechanismen kann in der Immuntherapie bei Karzinomen z.B. dazu verwendet werden, MICA/MICB bzw. TGF β 1 zu blockieren und die Aktivität der individuellen T-Zellen und NK-Zellen zu steigern. Alternativ

käme in Frage die NKG2D-Liganden auf Leukämie-Zellen durch Wachstumsfaktoren zu stimulieren, um damit die Funktion der NK-Zellen zu steigern (102).

6. Zusammenfassung

NK-Zellen, NKT-Zellen und verschiedene T-Lymphozyten sind an der Immunantwort bei hämatologischen- und soliden Tumorerkrankungen entweder auf dem direkten oder indirekten Weg beteiligt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde an zwei Patientenkollektiven (solide und hämatologischen Neoplasien) mittels Durchflußzytometrie und ELISA-Verfahren das Verhalten der oben genannten Zellen untersucht. Es wurde eine Verminderung der Gesamtzahl an Lymphozyten und $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten bei hämatologischen und bei soliden Tumoren im peripheren Blut festgestellt. Weiterhin zeigte sich, wie bereits in der Literatur berichtet, bei hämatologischen Neoplasien ein signifikant erhöhter Wert an NK-Zellen und CD56-16+NK-Zellen sowie eine verminderte Expression von NKG2D auf NK-Zellen, auf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und auf $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten. Es ließ sich auch eine verminderte Expression von p58.1 und NKG2A auf $\gamma\delta$ -Lymphozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachweisen. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu soliden (epithelialen) Tumoren fand sich nicht, bis auf den oben genannten Lymphozytenanteil.

Es ließ sich zeigen, dass MICA genauso im Serum von hämatologischen Patienten vorkommt wie auch bei soliden Tumorerkrankungen, wobei vor allem Patienten mit fortgeschrittenen Stadien und Metastasierung hohe Werte aufwiesen.

Der Nachweis, dass erhöhte MICA-Werte die Parameter wie KIRs und KARs sowie Chemokinrezeptoren oder die Apoptose der Immunzellen bei hämatologischen oder bei soliden Tumorerkrankungen beeinflusst, konnte nicht geführt werden.

In Zukunft ist nicht ausgeschlossen, dass mehrere Tumorerkrankungen mit immuntherapeutischen Verfahren behandelt werden können, die entweder einen direkten oder indirekten Einfluss auf die NK-Zellen und T-Zellen nehmen. Die Immuntherapie wird derzeit zwar nicht als Alternative für eine chirurgische, chemotherapeutische oder strahlentherapeutische Therapie stehen, sondern in Zukunft gegebenenfalls in Kombination mit diesen Therapien eingesetzt werden oder diese komplementieren.

7. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BrHHP	Bromohydrinpyrophosphat
C-Domäne	konstante Domäne
CD	cluster of differentiation, Differenzierungscluster
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
D-Domäne	diversity- (Vielfalts-) Domäne
DC's	dendritische Zellen
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	fötales Kälberserum
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
HLA-A, -B,-C	Histokompatibilitäts Antigen -A, -B, -C
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
IE	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
KAR	killer cell activating receptors, aktivierende Rezeptoren
KIR	killer cell inhibitory receptor, hemmende Rezeptoren
-L	Ligand
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MICA/B	MHC class I-related chains A/B, mit MHC-Klasse-I verwandte Moleküle

NKT-Zelle	Antigen-spezifische T-Zelle mit Eigenschaften einer NK-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKR	Natürlicher Killerzell Rezeptor
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat buffered solution
PCD	Programmed cell death
PE	Phycoerythrin
Th1	inflammatorische T-Zelle
Th2	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
TCR	T-Cell-Rezeptor
V-Domäne	variable Domäne

8. Literaturverzeichnis

1. K. Sesterhenn, G.R.F. Krueger, Ch. Uhlmann: Zur zellulären Immunreaktivität von Tumorpatienten: T-Zellen im peripheren Blut. *Laryngologie, Rhinologie, Otologie* 56/10, 1977.
3. De Libero, G., et al. Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral $\gamma\delta$ -T cells. *J.Exp. Med.*, 1991;173: 1311-1322
4. Carding SR. A role for $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to influenza virus. *Res Immunol* 1990;141(7): 603-6.
5. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Recognition and Destruction of Virus-Infected Cells by Human Gamma-Delta CTL. *J. Immunol.* 1994;153:5133-5139.
6. Johnson RM, Lancki DW, Sperling AL, et al. A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I. *J Immunol* 1992;148(4):983-8 .
7. De Paoli P, Gennari D, Martelli P, Cavarzernani V, Comoretto R, Santini G. Gamma Delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 1990;161:1013-6.
8. Autran B, Triebel F, Katlama C, Rozenbaum W, Hercend T, Debre P. T cell receptor gamma/delta lymphocyte subsets during HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1991;75(2): 206-10.
9. De Paoli P, Gennari D, Martelli P, et al. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1991;83(2): 187-91.

10. Raziuddin S, Telmasani AW et al. Gamma delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1992;22(5): 1143-8.
11. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, et al. Lymphocytes bearing antigenspecific gamma delta T cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 1998;339 (6225): 544-8.
12. Roussilhon C, Agrapart M, Ballet JJ, Bensussan A. T lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria (letter). *J Infect Dis* 1990;162(1): 283-5.
13. Ho M, Webster HK, Tongtawe P, Pattanapanyasat K, Weidanz WP. Increased gamma delta T cells in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett* 1990;25(1-3): 139-41.
14. Goodier M, Fey P, Eichmann K, Langhorne J. Human peripheral blood gamma delta T cells respond to antigens of *Plasmodium falciparum*. *Int Immunol* 1992;4(1): 33-41.
15. Falin B, Flenghi L, Pileri S, et al. Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol* 1989;143(8): 2480-8.
16. Hara T, Mizuno Y, Takaki K, et al. Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 90(1): 204-10 (1992).
17. Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F, et al. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol* 1993;23(5):1177-80.
18. Sumida T, Maeda T, Takahashi H, et al. Predominant expansion of V gamma 9/Vdelta 2 T cells in a tularemia patient. *Infect Immun* 1992 60(6): 2554-8.

19. Brenner, M.B., et al. Identification of a putative second T-cell receptor. Nature,1986: 322:145-9.
20. Prof. Dr. Zinkernagel: Vortrag gehalten Mai 1999 auf der Jaherversammlung der Krebsliga des Kanton Zürich: Immunabwehr gegen Tumoren
21. Ekaterina S. Doubrovina, Mikhail M. Doubrovin, Elena Vider, Richard B. Sission, Richard J. O'Reilly, Bo Dupont, and Yatin Vyas,: Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. J. Immunol.2003: 171: 6891-6899
22. Williams N. T-cells on the Mucosal Frontline. Science 1998
23. Kaufmann, S.H.E.& D. Kabelitz: Gammadelta T lymphocytes and heat shock proteins. Curr top Microbiol Immunol 1991:167, 191-207
24. Alijuf, M., A. Ezzat & M.O.Musa: Emerging role of gammadelta T-cells in health and disease. Blood Rev 2002 16, 203-206
25. Ensslin, A. S. & B. Formby: Comparison of cytolytic and proliferative activities of human gammadelta and alphabeta T cells from peripheral blood against various human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst 1991: 83, 1564-1569
26. Girardi, M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E.Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R.E. Tigelaar & A.C. Hayday: Regulation of cutaneous malignancies by gammadelta T cells. Science 2001:294, 605-609
27. M. Ferencik, J. Rovensky, V. Mat'ha, M. Herold. Kompendium der Immunologie. Grundlagen und Klinik. SpringerWien NewYork 2006

28. June-Chul Lee, Kyung-Mi Lee, Dong-Wan Kim, and Dae Seong Heo. Elevated TGF- β 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *J Immunol*. 2004, 172:7336-40.
29. Chien, Y.H., R. Jores, M.P. Crowley: Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* 1996;14, 511-532
30. Yamashita, Y., Y. Tanaka, M. Harazaki, B. Mikami & N. Minato: Recognition mechanism of non-peptide antigens by human gamma/delta T cells. *Int. Immunol* 2003;11:1301-1307
31. Porcelli, S.A., C.T. Morita & R.L. Modlin: T-cell recognition of non-peptide antigens. *Curr Opin Immunol* 1996;4: 510-516
32. Hayday, A.C.: Gammadelta T cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:975-1026
33. Allison, T. J. & D.N. Garboczi: Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Mol Immunol* 2002;38:1051-1061
34. Altincicek, B., J. Moll, N. Campos, G. Foerster, E. Beck, J.F. Hoeffles, C. Grosdemange-Billiard, M. Rodriguez-Concepcion, M. Rohmer, A. Boronat, M. Eberl & H. Jomaa: Cutting edge: Human gammadelta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythrol 4-phosphat pathway of isoprenoid biosynthesis. *J immunol* 2001;166:3655-3658
35. Belmont, C., E. Espinosa, F. Halary, Y. Tang, M.A. Peyrat, H. Sicard, A. Kozikowski, R. Buelow, R. Poupot, M. Bonneville & J.J. Fournie: A chemical basis for selective recognition of non-peptid antigens by human delta T cells. *FASEB J* 2000;14:1699-1670

36. Morita, C.T, E. M. Beckman, J.F. Bukowski, Y. Tanaka, H. Band, B.R. Bloom, D.E. Golan & M.B. Brenner: Direct presentation of non-peptid prenyl pyrophosphate antigens to human gammadelta-T-cells. *Immunity* 1995;3:495-507
37. Bürk, M.R., L. Mori, and G.d. Libero. Human Vg9-Vd2 cells are stimulated in a crossreactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. *Eur. J. Immunol* 1995;25:2025-58.
38. Tanaka, Y., C. T. Morita, E. Nieve, M.B. Brenner & B.M. Bloom: Natural and synthetic non-peptid antigens recognized by human gammadelta T cells. *Nature* 1995;357:155-158
39. Kunzmann, V., E. Bauer, J. Feurle, F.Weissinger, H.P. Tony & M.Wilhelm: Stimulation of gammadelta T-cells by aminobiphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 2003;102:200-06.
40. Kunzmann, V., E. Bauer, and M. Wilhelm: g/d T cell stimulation by pamidronate. *New Engl. J. Med*, 1999;340:737-8
41. Kaufmann, S.H.E & D. Kabelitz: Gammadelta T lymphocytes and heat shock proteins. *Curr Top Microbiol Immun* 1991;167:191-207.
42. Kolb, H.J., et al.: Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*2006: 108(3):1092-9.
43. Fisch, P., et al.: Control of B cell Lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vg9Vd2 T-cells in tumor immunity. *Eur.J.Immunol*, 1997;27:3368-3379

44. Poccia, F., et al., CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both antiviral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive Vg9Vd2 T-Lymphocytes. *J Immunol*, 1997;159:6009-6017.
45. Haas, W., P. Peireira and S. Tonegawa, g/d Cells. *Annu.Rev.Immunol* 1993. 11: 637-685.
46. Burns, J., S. Lobo and B. Bartholomew, Requirement for CD4 positiv T-Zellen in the gd T cell proliferative response to Daudi Burkitt's Lymphoma. *Cell Immunol*. 1996;174: 19-24.
47. Elloso, M.M., et al., Human gd T cell subset-proliferative response to malarial antigen in vitro depends on CD4 positiv T cells or Cytokines that signal through components of the Il-2R. *J.Immunol* 1996;157:2096-2102.
48. Ueta, C., et al.: Interleukin-12 activates human gd T cells: synergistic effect of tumor necrosis factor-L. *Eur. J. Immunol* 1996;26:3066-3073.
49. Angelini, D.F., et al.: FcγR III discriminates between two subsets of Vg9Vd2 effector cells with different responses and activation pathway. *Blood* 2004;104:1801-7.
50. Wilhelm, M. et al.: gd receptor-expressing T-cell clones from a cutaneous T-cell lymphoma suppress hematopoiesis. *Ann. Hematol.* 1992;65:111-15.
51. Geissler, R.G., et al.: $\gamma\delta$ T cell-receptor-positive lymphocytes inhibit human hematopoietic progenitor cell growth in HIV type 1-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1996;12:577-584.
52. Dobmeyer, T.S., et al.: Mechanism of gd T-cell-mediated inhibition of stem cell differentiation in vitro: possible relevance for myelosuppression in HIV-infected individuals. *Cell. Immunol* 1998;184:26-36.

53. Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by $\gamma\delta$ T cells of MICA/B. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:6879-84.
54. Poggi A, Venturino C, Catellani S, et al.: V δ 1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. Cancer Res 2004;64:9172-9.
55. Märten A., von Lilienfeld-Toal M., Büchler MW. , Schmidt J.: Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity. Int. J Cancer 2006;119:2359-65.
56. Viey E, Fromont G, Escudier B, et al.: Phosphorylated $\gamma\delta$ T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. J Immunol. 2005;174:1338-47.
57. Bonneville M, Scotet E.: Human V γ 9V δ 2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. Curr Opin Immunol 2006;18:1-8.
58. Guber HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L.: De libero G. Human T cell receptor $\gamma\delta$ T cells recognize endogenous melatonin metabolites in tumor cells. J Exp Med 2003;197:163-8.
59. Scotet E., Martinez LO, Grant E, et al.: V γ 9V δ 2 T cell receptor interaction with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-1. Immunol 2005;22:71-80.
60. Thompson K, Rojas-Navea J, Roger MJ: Alkylamines cause V γ 9V δ 2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. Blood 2005 (in Press)
61. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al.: V γ 9V δ 2 T cell response to colon carcinoma cells. J. Immunol. 2005; 175(8): 5481-5488.

62. Ferrarini M, et al.: Killing of laminin receptor-positive human lung cancers by tumor infiltrating lymphocytes bearing $\gamma\delta$ (+) t-cell receptors. *J. Natl Cancer Inst.* 1996;88:436-441.
63. Schilbach KE, et al.: Human $\gamma\delta$ T-lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J. Immunol* 2000;23(5): 536-548.
64. Wang MH., et al.: Specific activation of human peripheral blood $\gamma\delta$ Lymphocytes by sonicated antigens of *Mycobacterium tuberculosis*:role in vitro in killing human bladder carcinoma cell lines. *Scand.J.Immunol.* 38(3): 239-246.
65. Bukowski JF, Morita CT, Tanaka Y et al.: Vg9Vd2 TCR-dependent recognition of nonpeptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J.Immuno.* 1995;154(3), 998-1006.
66. Bank I, Book M, Huszar M, et al.: V δ 2+ $\gamma\delta$ T-Lymphocytes are cytotoxic to the MCF 7 breast carcinoma cell line and can be detected among the T-cells that infiltrate breast tumors. *Clin. Immunol.Immunopathol.*1993: 67(1): 17-24.
67. Fujimiya Y, Suzuki Y, Katakura R, et al.: In vitro interleukin-12 activation of peripher blood CD3+CD56+ and CD3+CD56- $\gamma\delta$ T-cells from glioblastoma patients. *Clin. Cancer Res.* 1997;3(4): 633-643.
68. Yamaguchi T, Fujimiya Y, Suzuki Y, Katakura R, Ebina T:A simple methode fort he propagation and purification of $\gamma\delta$ T-cells from peripheral blood of gliablastoma patients using solid-phase antiCD3 antibody and soluble IL-2. *J.Immunol.Methodes* 1997;205(1): 19-28.
69. Lamb, L.S. Jr, P. Musk, Z Ye, F.van Rhee, S.S. Geier, J.J. Tong, K.M. King & P.J.Hanslee-Downey: Human gammadelta+ T lymphocytes have in vivo graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:601-6.

70. Williams N: T-cells on the mucosal frontline. *Science* 1998;280:198-200
71. Holoshitz, J., FD. Koning, J.E. Coligan, J. De Bruyn & S. Strober: Isolation of CD4-CD8- mycobacteria-reactive T lymphocytes clones from rheumatoid synovial fluid. *Nature* 1989;339:226-9.
72. Gaulard PH, Arnulf B, Belhadj K, Reyes F: $\gamma\delta$ T-cell lymphomas. *Ann Oncol* 1999;10:31
73. Moretta, A., Poggi, D., Pende, G., G. Tripodi, A.M., Orengo, et al.: CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor AB. *J Exp Med* 1991;174:1393-98.
74. Moretta, A, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, et al.: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19: 197-223.
75. Domenico M., J. Benjamin, M. Daucher, et al.: Natural killer cells in HIV-1 infection: Dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Nat Academy of Sciences* 2003;100(25): 1511-16.
76. Steeber, D.A., & T.F. Tedder: Adhesion molecule cascade direct lymphocyte recirculation and migration during inflammation. *Immunol Res* 2001;22:299-317.
77. Newman, P.J.: The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;100:25-9.
78. Moser B. & P. Loetscher: Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunol* 2001;2:123-8.
79. Cyster, J. G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-2102.

80. Roth, S.J., T.G. Diacovo, M.B. Brenner, et al.: Transendothelial chemotaxis of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to chemokines. *Eur.J.Immunol* 1998;28:104-13.
81. Poggi, A., Zocchi R.M., et al.: RIL-12- mediated NKRP1A upregulation and consequent enhancement of endothelial transmigration of Vdelta 2+ TCR gammadelta+ T lymphocytes from healthy donors and multiple sclerosis patients. *J Immunol* 1999;162:4349-54.
82. Zocchi R.M. und Poggi A.: Role Of Gammadelta T Lymphocytes In Tumor defense. *Fron Bioscience* 2004;9:2588-604.
83. Lieberman, J.: The ABC of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3:361-370.
84. Trapani, J.A., J. Davis, V.R. Sutton & M.J. Smyth: Proapoptotic function of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol* 2000;12:323-9.
85. Wajant, H.: The Fas signalling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-6.
86. Zhou, T., J. D. Mountz & R.P. Kimberley: Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol Res* 2002;26:323-6.
87. Depraetere, V. & P. Goldstein: Fas and other cell death signalling pathway. *Semin Immunol* 1997;9:93-107.
88. Gao, y., W. Yang, M.Pan, E. Scully, M. Girardi, L.H. Augenlicht & J. Craft: Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* 2003;198:433-442.

89. Ferrarini, M., G. Consogno, P. Rovere, C. Sciorati, L. Dagna, D. Resta, C. Rugarli & A.A. Manfredi: Inhibition of caspases maintains the antineoplastic function of gammadelta T cells repeatedly challenged with lymphoma cells. *Cancer Res* 2001;61:3092-95.
90. Rathmell, J. C. & C.B. Thompson: The central effectors of cell death in the immun system. *Annu Rev Immunol* 1999;17:781-828.
91. Bossi, G., G.M. Griffiths: Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 1999;5:90-6.
92. Spaggiari, GM, P. Contini, A. Dondero, R. Carosio, F. Puppo, F. Indiveri, M.R. Zocchi & A. Poggi: Soluble HLA class 1 induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class 1 receptor through FasL-Fas interaction. *Blood* 2002;100:4098-4107.
93. Kabelitz D. & Wesch D.: Features and Funktionen of $\delta\gamma$ T Lymphocytes: Focus on Chemokines and their Receptors. *Rev Immunol* 2003;23(5&6): 339-370.
94. Lafont, V. J. Liautard, J.P. Liautard & J. Favero: Produktion of TNF- α by human V γ 9 δ 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol* 2001;166: 7190-99
95. Dolstra, H., H. Fredrix, A. van der Meer, T. de Witte, C. Figdor & E. van de Winkel van Kemenade: TCR gamma delta cytotoxic T lymphocytes expressing the killer cell-inhibitory receptor p58.2 (CD 158b) selectively lyse acute myeloid leukemia cells. *Bone Marrow Transplant* 27:2001:1087-93.
96. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intramural T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348 (3): 203-13

97. Pages F, Berger A., Camus M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (25): 2654-66
98. Castriconi, R, et al. 2003. Transforming growth factor β 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4120
99. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S et al. Gammadelta cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102:200-6
100. Diefenbach, A., E. Tomasello, M. Lucas et al. 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat. Immunol.* 3: 1142.
101. Sahil, H. H.G. Rammensee, and A. Steinle. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* 169:4098
102. Siegler U. et al. Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia* 2005; 19: 2215-2222.
103. Sivori S. et al. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer ig-like receptors. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3439-3447.
104. Vitale M et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major-histocompatibility complex-restricted tumor cell lyses. *J Exp Med* 1998; 187: 2065-2072.
105. Sutherland Cl. Et al. UL 16-binding proteins, novel MHC Class I related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002; 1689: 671-679.

106. Song H et al. IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF β in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol* 2006; 242: 39-45
107. Mingari MC et al. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD 94/NKG2A as the only HLA Class I specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1374-1380
108. Walz A. et al. 1991. Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *J. Exp. Med.* 174: 1355.
109. Wu JD et al. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 2004, 114(4):560-568.
110. Osaki T et al. Decreased NKG2D expression on CD8+T cells is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13 (2Pt 1): 382-387.
111. Alan A.Z. Alexander et al. Isopentenyl Pyrophosphate-activated CD56+ $\gamma\delta$ T-Lymphocytes display potent Antitumor activity toward human Squamous. *Clin Cancer Res* 2008, 14(13): 4232-4240.
112. Angelini Df et al. Fc γ RIII discriminates between 2 subsets of V γ 9V δ effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* 2004; 104: 1801-7.
113. Becknell B. and Caligiuri M.A. Importance of natural killer cells in tumor immunity. 2008. *J.Immunother*; 31: 685-692)
114. Iannello A., Ahmad A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24: 487-499.

115. Park JM, Terabe M, Van den Broeke LT, et al. Unmasking immunosurveillance against a syngeneic colon cancer by elimination of CD4+NKT regulatory cells and IL-13. *Int.J Cancer* 2004; 114 (1): 80-7.
116. Terabe M, Matsui S., Park JM et al. Transforming growth factor- β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003; 198 (11): 1741-52.
117. Cardell,S. et al. 1995 CD1-restricted CD4+T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp. Med* 1995(182): 993-1004.
118. Kawano T, Koezuka Y, et al. CD d- restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278(5343): 1626-9.
119. Subleski, J.J. et al. 2006. Enhanced antitumor response by divergent modulation of natural killer and natural killer T cells in the liver. *Cancer Res.* 66:11005-11012.
120. Molling JW, Kolgen W, Van der Vliet HJ, et al. 2005. Peripheral blood IFN- γ -secreting V α 24+V β 11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer* 115(1): 87-93.
121. Yoneda K, Morii T, Nieda M, et al. The peripheral blood V α 24+ NKT cell numbers decrease in patients with haematopoietic malignancy. *Leuk Res* 2005; 29(2):147-52.
122. Herberman, R.B., Nunn, and D.H. Lavrin. 1975 Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. 1. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16:126.
123. Poggi A., Venturino C., Catellani S., Clavio M., Miglino M., Gobbi M et al. Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res* 2004;64: 9172-9179

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. V. Kunzmann
für die Überlassung des Dissertationsthemas
und die allzeit tatkräftige und kompetente Unterstützung während der
Anfertigung und Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten	geboren am	22. 08. 1981 in Suhl
	Anschrift	Brauhausstrasse 14, 36037 Fulda
	Eltern	Christel Perniß: Handelskauffrau Klaus-J. Perniß: Dipl. Mineraloge
Schule	08/88-07/92	Lautergrundschule, Suhl
	08/92-07/00	Gymnasium „Johann G. Herder“, Suhl Abschluss: allgemeinen Hochschulreife
Soziales-Jahr	07/00-01/01	Au-pair-Zeit in Washington D.C., USA
Medizinstudium	04/01-07/07	Medizinstudium an der Bayerischen Julius-Maximilian Universität Würzburg Abschluss Staatsexamen, Erhalt der Approbation
Berufslaufbahn	seit 09/07	Assistenzarzt in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Klinikums Fulda