

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Untersuchung zum Einfluss des
Nahrungsergänzungspräparates Biobran/ MGN-3 auf die
Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Petra Zerbes
aus
Freiburg i. Br.
2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichtstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem und Tumorimmunologie	1
1.2	Natürliche Killer Zellen	5
1.2.1	NK-Zell-Rezeptoren	6
1.2.1.1	Killer Immunglobulin-like Rezeptoren (KIRs)	7
1.2.1.2	C-Typ-Lektin-Rezeptoren	8
1.2.1.3	Aktivierende Rezeptoren der Ig-Superfamilie	9
1.2.1.4	Adhäsionsmoleküle	10
1.2.2	Mechanismen der Zytolyse durch NK-Zellen	11
1.3	Zytokine und Interleukine	13
1.3.1	Zytokine im Überblick	13
1.3.2	Interleukin-2	14
1.4	Biobran/MGN-3	16
1.4.1	Entwicklung und Herstellung von Biobran	16
1.4.2	Molekülstruktur und Wirkung	17
1.4.3	Nebenwirkungen und Toxizität von Biobran	19
1.5	CD-Oberflächenantigene	20
1.6	Fragestellung	22
2	Material	23
2.1	Allgemeine Materialien	23
2.1.1	Geräte-, Glas- und Plastikmaterial	23
2.1.2	Stammlösungen	24
2.2	Material für die Isolierung peripherer mononukleärer Zellen	24
2.3	Material für die Zellanreicherung	25
2.4	Material für die Zellzählung und Mikroskopie	25
2.5	Material für die Zytotoxizitätstests	25
2.6	Material für die Durchflusszytometrie	26
2.7	Material für die Zytokinaktivitätsmessung	27
2.8	Zelllinien	27

Inhaltsverzeichnis

3	Methoden	28
3.1	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) mit Ficoll-Hypaque .	28
3.1.1	Grundlagen:	28
3.1.2	Durchführung:	28
3.2	Zellanreicherung - Magnetized activated cell sorting (MACS)	29
3.2.1	Grundlagen:	29
3.2.2	Durchführung:	29
3.3	Zytotoxizitätstest (BATDA-Release-Assay)	30
3.3.1	Grundlagen	30
3.3.2	Durchführung	31
3.4	Durchflusszytometrie	33
3.4.1	Grundlagen	33
3.4.2	Durchführung	34
3.5	Zytokinaktivitätsmessung	36
3.6	Zellkulturen	37
3.7	Zellzahlbestimmung	37
3.8	In-vivo Versuche mit gesunden freiwilligen Spendern	38
3.9	Auswertung	39
4	Ergebnisse	40
4.1	In-vitro Versuchsreihe	40
4.1.1	Isolierung CD56 ⁺ - Zellen	40
4.1.2	Zytotoxizitätstests	40
4.1.2.1	Zytotoxische Aktivität gegen K562	41
4.1.2.2	Zytotoxische Aktivität gegen A204	43
4.1.2.3	Zytotoxische Aktivität gegen RH30	45
4.1.2.4	Zytotoxische Aktivität gegen RD	47
4.1.3	FACS-Analysen	48
4.1.3.1	CD25	49
4.1.3.2	CD69	51
4.1.3.3	NKG2A/CD94	53
4.1.3.4	KIR-Rezeptoren, CD 56, CD16, NKG2D, CD226	55
4.1.3.5	CD122, CD132, IL-15R α	60
4.1.4	Zytokinaktivitätsmessung	62
4.2	In-vivo Versuchsreihe	66
4.2.1	Zytotoxizitätstests	66
4.2.1.1	Zytotoxische Aktivität gegen K562	67
4.2.1.2	Zytotoxische Aktivität gegen A204	68

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.3	Zytotoxische Aktivität gegen cALL-Blasten	70
4.2.2	FACS-Analysen	71
4.2.2.1	CD25	72
4.2.2.2	CD69	73
4.2.2.3	NKG2A/CD94	75
4.2.2.4	KIR-Rezeptoren	75
4.2.2.5	CD56	76
4.2.2.6	CD16	76
4.2.2.7	NKG2D	77
4.2.2.8	CD226	77
4.2.2.9	NKp44/46/30	78
4.2.3	Zytokinaktivitätsmessung	78
4.2.3.1	IL-2	78
4.2.3.2	TNF- α	79
4.2.3.3	IFN- γ	80
4.2.3.4	IL-5, IL-10, IL-12, GM-CSF	81
5	Diskussion	83
5.1	Methodenkritik	84
5.1.1	Zellanreicherung mit MACS	84
5.1.2	Durchflusszytometrie	85
5.1.3	Zytotoxizitätstest	85
5.2	Einfluss von Biobran und IL-2 auf die Zytotoxizität von NK-Zellen	86
5.3	Einfluss von Biobran und IL-2 auf CD-Oberflächenantigene	90
5.4	Einfluss von Biobran und IL-2 auf die Aktivität verschiedener Zytokine	95
5.5	Fazit	96
6	Zusammenfassung	98
	Abbildungsverzeichnis	100
	Tabellenverzeichnis	102
	Literaturverzeichnis	103
	Anhang	115

Abkürzungen

ADCC	Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BATDA	Bis (acetoxymethyl) 2,2':6',2''-Terpyridine-6,6''-Dicarboxylid Acid
BSA	Bovine Serum Albumine
BRM	Biological Response Modifier
cALL	common Acute Lymphoblastic Leukemia
CD	Cluster of Differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas-Ligand
Fc	Fragment, crystallizable
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Light Scatter
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human-Leukocyte-Antigen
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

Abkürzungen

ITAM	Immunreceptor Tyrosine-based Activating Motif
ITIM	Immunreceptor Tyrosine-based Inhibiting Motif
KAR	Killer Cell Activating Receptor
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor
LAK	Lymphokin aktivierte Killerzellen
LFA	Lymphocyte Function-associated Antigen
MACS	Magneted activated Cell Sorting
MHC	Main Histocompatibility Complex
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen
NKT-Zellen	Natürlich-Killer-T-Zellen
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RNA	Ribonucleic Acid
SSC	Sideward Light Scatter
TCR	T-Cell Receptor
TDA	2,2':6',2''-Terpyridine-6,6''-Dicarboxylid Acid
TDI	Toluene Diisocynate
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF	Transforming Growth Factor
TRAIL	TNF-related Apoptosis inducing Factor Ligand
ULBP	Unique long 16-binding Protein

1 Einleitung

1.1 Immunsystem und Tumورimmunologie

Das Immunsystem hat die Aufgabe uns vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen. Dabei hat es im Verlauf von 400 Millionen Jahren gelernt, zwischen "gefährlich" und "ungefährlich", sowie "fremd" und "eigen" zu unterscheiden. Das Immunsystem lässt sich in ein unspezifisches und ein spezifisches Immunsystem unterteilen [47]. Bei Ersterem handelt es sich um das entwicklungsgeschichtlich ältere, angeborene System, dessen Komponenten unabhängig vom eindringenden Erreger aktiv werden. Letzteres besteht aus T- und B-Lymphozyten, die hochspezifisch auf ihr jeweiliges Antigen reagieren, klonal expandieren können und so eine effektive Immunabwehr, sowie eine Gedächtnisreaktion ermöglichen. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind zwar lymphatischen Ursprungs, besitzen aber keine antigenspezifischen Rezeptoren und können ohne vorherige Sensibilisierung agieren. Somit gehören sie zum angeborenen Immunsystem und sie nehmen eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort ein [47].

Einsatz der Immunreaktion zur Tumorbekämpfung

Krebs war im Jahr 2007 laut statistischem Bundesamt nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweit häufigste Todesursache in Deutschland:

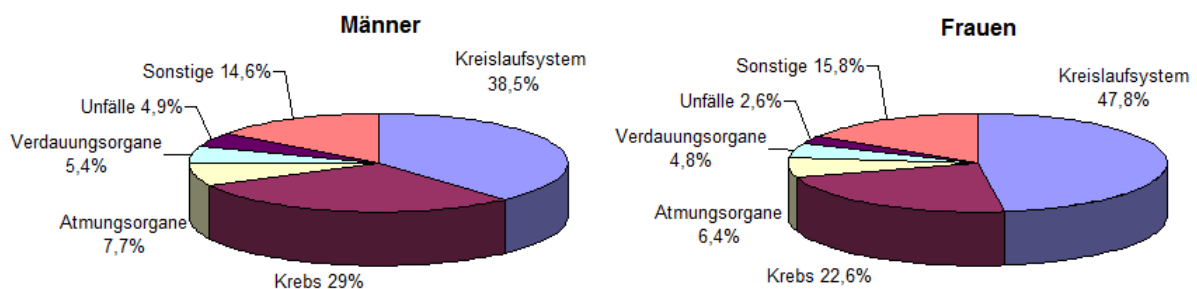


Abbildung 1.1: Todesursachenstatistik, Deutschland-2007

1 Einleitung

Krebs wird durch das progressive Wachstum der Nachkommen einer einzigen transformierten Zelle verursacht. Zur Heilung müssen daher sämtliche bösartigen Zellen entfernt oder zerstört werden. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze und Herangehensweisen, die von der chirurgischen Operation über Strahlentherapie bis hin zu pharmakologischer Systemtherapie und supportiven Therapien reichen.

Das tiefere Verständnis über die Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen hat zur Entwicklung neuer Behandlungsansätze geführt. An dieser Stelle ist vor allem die Immuntherapie zu nennen. Ziel ist es, das körpereigene Immunsystem gegen den Tumor zu mobilisieren und so eine Abwehrreaktion zu erzielen. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von Tumorantigenen auf der Oberfläche entarteter Zellen, sowie die Fähigkeit des Organismus gegen diese Antigene immunologisch reagieren zu können.

Die Tumorimmunologie weist verschiedene aktive, passive und adoptive Strategien auf:

Einen Ansatzpunkt der Tumorimmunologie bilden **monoklonale Antikörper (AK)**. Aktuell sind in der Onkologie sechs unkonjugierte AK zugelassen, 80 weitere werden in klinischen Studien erprobt [38, 89]. AK können ihren Effekt über verschiedene Mechanismen erzielen. Sie sind in der Lage, über ihr Antigen-bindendes Fragment (Fab) an funktionelle Tumor-Antigene zu binden. So inhibieren sie die mitogenen, bzw. zum Überleben notwendigen Mechanismen der Tumorzelle, die sich von normalen Zellen oft unterscheiden. Cetuximab, ein AK gegen den Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR), inhibiert beispielsweise die Tyrosin-Kinase. Trastuzumab wirkt über verschiedene Mechanismen, indem er an extrazellulären Domänen des Rezeptors andockt und so die Signalübertragung inhibiert und Immunzellen rekrutiert. Ein anderer Abwehrmechanismus der AK erfolgt über die Fc (Fragment, crystallizable) -Region. Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen und andere Zellen des retikuloendothelialen Systems besitzen Fc-Rezeptoren mit denen sie an die Fc-Domäne der AK andocken und diese samt Antigen phagozytieren, oder Komponenten des Immunsystems rekrutieren können. Es liegen Daten vor, die diesem Mechanismus einen signifikanten Beitrag zur klinischen Effektivität bescheinigen [38].

Allerdings sind den Vorteilen der Therapie mit AK auch Grenzen gesetzt: neben enormen Kosten führt dieser passive Therapieansatz nicht zur Herausbildung einer Gedächtnisreaktion, sodass immer wieder erneute AK-Infusionen nötig sind. Des Weiteren können die hergestellten AK selber immunogen wirken und so vor allem bei mehrfacher Anwendung zu Problemen führen. Und schließlich erkennen AK nur spezifische Oberflächenproteine, was die Breite der möglichen Ziele einschränkt [53].

1 Einleitung

Eine weitere Therapieoption stellt die **T-Zell basierte Immuntherapie** als adoptive Therapieform dar. T-Zellen sind in der Lage über ihren Rezeptor Peptid-MHC (Main Histocompatibility Complex) -Komplexe zu erkennen. Hierbei werden intrazelluläre Proteine zunächst innerhalb der Zelle in einzelne Peptide zerlegt und dann zusammen mit MHC-Molekülen an der Zelloberfläche exprimiert und so den T-Zellen präsentiert. Als problematisch gestaltet sich die oft niedrige Immunogenität von Tumor-assoziierten Antigenen, die auch im normalen Gewebe exprimiert werden. Somit besteht die Gefahr der Autoimmunität. Dem trägt das Immunsystem Rechnung, indem alle sich entwickelnden T-Zellen, die eigene Antigene mit hoher Affinität erkennen, bereits im Thymus eliminiert werden. Außerdem gibt es periphere Toleranzmechanismen, wie beispielsweise die regulatorischen T-Zellen, welche diejenigen Zellen aufspüren, der Selektion im Thymus entgangen sind. Bei der adoptiven T-Zell-Therapie werden antigen-spezifische T-Zellen in-vitro generiert, getestet und dann zurück in den Patienten transferiert. Eine andere Möglichkeit stellt der **T-Zell-Rezeptor (TCR) -Gen-Transfer** dar. Hierbei kann den T-Zellen Tumorantigen-Spezifität verliehen werden, indem durch virale Vektoren die α - und die β - Kette des TCR in die T-Zelle transferiert werden. Dieser Gentransfer birgt jedoch potentielle Risiken: die Verwendung retroviraler Vektoren, das Risiko der Mutagenese und es können potentiell autoreaktive TCRs unklarer Spezifität entstehen [53].

Eine andere Zellpopulation, die in den letzten Jahren verstärkt in den Mittelpunkt der Krebstherapie gerückt ist, stellen die **Natürlichen Killerzellen** dar. Ihre Zytotoxizität wird über aktivierende und inhibierende Rezeptoren gesteuert. Letztere üben in der Regel eine stärkere Wirkung aus, sodass bei gleichzeitiger Aktivität normalerweise die inhibitorische Komponente überwiegt. Diese Inaktivierung der NK-Zellen durch körpereigene Moleküle machen sich jedoch auch maligne Zellen zunutze und schaffen es so, der NK-Zell-vermittelten Immunität zu entgehen. Dem Einsatz endogener oder durch adoptiven Transfer in den Empfängerorganismus eingebrachter NK-Zellen sind somit Grenzen gesetzt. Eine Möglichkeit NK-Zellen trotzdem zu nutzen stellt die Stammzelltransplantation mit alloreaktiven NK-Zellen dar [101]. Die Killer-Immunglobulin-like-Rezeptor (KIR) -Gene sind individuell sehr unterschiedlich angelegt. Jede NK-Zelle eines Individuums exprimiert mindestens einen MHC-Klasse-I spezifischen inhibitorischen Liganden, der die NK-Zellen davon abhält eigene Zellen zu attackieren. NK-Zellen eines Individuums sind jedoch alloreaktiv gegenüber Zellen eines anderen Individuums, denen passende inhibitorische KIR-Liganden fehlen (KIR-Liganden-Mismatch). Andererseits tolerieren sie diejenigen Zellen, die passende KIR-Liganden exprimieren und so die NK-Zellen in ihrer Aktivität hemmen. Diesem Konzept zufolge weisen also allogene NK-Zellen mit einem KIR-Liganden-Mismatch gegenüber potentiellen Targetzellen eine höhere zytotoxische Aktivität auf, als gegenüber entsprechenden autologen oder "passenden" Zellen. Die-

1 Einleitung

ser Ansatz konnte bislang in Tiermodellen nachgewiesen werden. Alloreaktive Spender-NK-Zellen schützten den Wirt vor einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD), indem sie seine T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen reduzierten und gleichzeitig den Graft-versus-Leukemia (GvL) -Effekt triggerten. Beim Menschen ist die Datenlage allerdings nicht eindeutig, bisherige Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Abgesehen von der allogenen Transplantation birgt die NK-Zell-Immuntherapie jedoch auch noch weitere Hoffnungen: Einerseits durch Human-Leukocyte-Antigen (HLA)-haploidente NK-Zellinfusionen, andererseits durch Antikörper gegen inhibitorische KIRs. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit die Tumorzellen für NK-Zellen zugänglicher zu machen, indem die Todesrezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen durch bestimmte Moleküle verstärkt exprimiert werden.

Einen weiteren Ansatzpunkt der Tumorummunologie stellen **Zytokine** dar. Zytokine sind regulatorische Peptide, die der Steuerung der Immunantwort dienen und bei Aktivierung des Immunsystems von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen und Fibroblasten sezerniert werden können. Sie können autokrine, endokrine und parakrine Wirkung entfalten und setzen eine Kaskade humoraler und zellulärer Vorgänge in Gang. Deren Ziel ist es, eingedrungenes Fremdmaterial zu eliminieren oder eine Toleranz zu induzieren. Von besonderem Interesse in der Onkologie sind bestimmte Interleukine [72] (z.B. IL-2), Interferone (IFN) [42] und Tumornekrosefaktoren (TNF) [108, 106]. Als nachteilig bei deren Anwendung erweisen sich die zum Teil erheblichen Nebenwirkungen bei systemischer Applikation [21].

In der Krebstherapie ist IL-2 eines der am häufigsten angewandten Zytokine. Eine Therapie mit IL-2 ist bis jetzt nur bei metastasiertem malignem Melanom und Nierenzellkarzinom indiziert, da nur hier eine deutliche Anti-Tumor-Wirkung beobachtet wurde. Ein Schwachpunkt dieses Therapieansatzes ist jedoch die notwendige, da effizienzsteigernde Verabreichung hoher Dosen von IL-2, die zu schweren Nebenwirkungen führen kann. So traten im Rahmen von klinischen Studien sogar therapiebedingte Todesfälle auf [55, 94]. Ein weiteres Problem liegt in der wachsenden Immunresistenz der Tumorzellen im Verlaufe der Therapie. Darin könnte ein Erklärungsansatz für das unterschiedliche Ansprechen auf die Therapie begründet sein. In einigen Fällen konnte bewiesen werden, dass die Krebstherapie zu einem Verlust an β 2-Mikroglobulinen auf der Tumorzelloberfläche führt, welche Bestandteile des MHC-I-Komplexes sind. Fehlt dieses Protein kann die Tumorzelle nicht mehr von zytotoxischen T-Zellen angegriffen werden und entgeht der Immunabwehr [90].

Wie ist nun der heutige Stellenwert der zellulären Immuntherapie zu bewerten? Bisher sind noch viele Fragen offen: So sind beispielsweise häufig die Unterschiede zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen noch nicht hinreichend bekannt. Darüber hinaus be-

steht auch hinsichtlich des Zeitpunkts und der Lokalisation der Verabreichung weiterer Klärungsbedarf.

1.2 Natürliche Killer Zellen

NK-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle. Neben B- und T-Lymphozyten stellen NK-Zellen mit einem Anteil von 5-15% der Lymphozyten im peripheren Blut eine dritte eigenständige Lymphozytenpopulation dar, deren Existenz in den 70er Jahren das erste mal beschrieben wurde [43, 52]. Ihr prozentualer Anteil an den Lymphozyten unterliegt einer ausgeprägten Tagesrhythmik [11] und ist von vielen Faktoren abhängig, wie z.B. körperlicher Aktivität, Stress, Infektions- oder Entzündungsreaktionen. NK-Zellen können fremde Zellen, Tumorzellen oder bakteriell- bzw. virusinfizierte Zellen zerstören [4]. Morphologisch imponieren sie im Blut als große Lymphozyten mit azurophilen Granula (Large Granular Lymphocytes), phänotypisch zeichnen sie sich durch das Antigenmuster $CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$ aus. Aktiviert werden NK-Zellen durch Interferone (IFN- α und β) und Zytokine (v.a. IL-12) von Makrophagen, die vor allem in der frühen Phase von Infektionen sezerniert werden. NK-Zellen unterliegen keiner MHC-Restriktion, d.h. sie können spontan, ohne vorherige spezifische Sensibilisierung attackieren. Sie sind in der Lage körpereigene Zellen zu erkennen und diejenigen zu eliminieren, die durch veränderte oder fehlende MHC-Erkennungsstruktur immunologisch unkenntlich geworden sind. Diese Beobachtung formulierte Kärre erstmals Mitte der 80er Jahre als so genannte "Missing-self-Hypothese" [66, 48]. Zusätzlich zur Erkennung fehlender oder verminderter MHC-Moleküle, trägt wahrscheinlich auch die Präsentation bestimmter Signalpeptide innerhalb des MHC-Komplexes dazu bei, dass die Targetzelle als eigen erkannt, und von der NK-Zelle verschont bleibt.[49]. Auf Grund dieser Fähigkeiten fallen den NK-Zellen innerhalb des Immunsystems die folgenden Aufgaben zu:

- **Tumor-Immunsurveillance** und hämatopoetische Stammzelltransplantation: NK-Zellen kontrollieren den Körper kontinuierlich auf aberrante Zellen, die Tumoran-tigene exprimieren oder ihre MHC-Expression reduziert bzw. aufgegeben haben. In einer 11-jährigen epidemiologischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine ver-ringerte NK-Zell Aktivität bei Erwachsenen mit einem erhöhten Krebs-Risiko ein-hergeht [45]. In einer anderen Studie konnte beobachtet werden, dass bei allogener Stammzelltransplantation bei bestimmten Krebserkrankungen, wie z.B. der akuten myeloischen Leukämie, die Entwicklung der Spender-NK-Zellen bei einem Emp-fänger ohne passende KIR-Liganden, sowohl zu einem verbesserten Outcome, als auch zu einer erhöhten Lebenserwartung führt. Eine GvHD trat dabei nicht auf [95].

1 Einleitung

- **Bekämpfung von Virusinfektionen:** Hier spielen die NK-Zellen v.a. in der frühen Phase der Immunantwort eine entscheidende Rolle. So konnte in einer Studie an Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber einem bestimmten Herpesvirus nach NK-Zell Depletion bzw. zusätzlicher NK-Zell Gabe gezeigt werden [64]. Allerdings ist man sich über eine entsprechende Rolle der NK-Zellen beim Menschen noch nicht im Klaren. Es konnte beobachtet werden, dass Patienten mit einer NK-Zell-Immundefizienz trotzdem nicht häufiger an Virus- oder Tumorerkrankungen leiden als gesunde Menschen [24].
- NK-Zellen wirken an der **Regulation** verschiedener Zellen mit, wie z.B. Dendritischer Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Endothelzellen.
- Diskutiert werden weiterhin Funktionen der NK-Zellen im Bereich von Organtransplantationen, der Kontrolle parasitärer Erkrankungen und HIV-Infektionen, sowie bei Autoimmunität und Asthma [112].

1.2.1 NK-Zell-Rezeptoren

Um die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen zu gewährleisten, müssen sie über ein System verfügen, das es ihnen erlaubt zwischen körperfremden bzw. infizierten und körpereigenen bzw. nicht-infizierten Zellen zu unterscheiden. Hierfür ist ein Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren erforderlich [74]. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt der Einfluss der inhibierender Rezeptoren und sorgt dafür, dass als "normal" erkannte Zellen nicht von NK-Zellen angegriffen werden [57]. Die Aktivität eines einzigen Rezeptortyps reicht aus, um ein komplettes inhibitorisches Signal zu generieren [60]. Strukturell können die NK-Zell-Rezeptoren in die Klassen der Immunoglobulin-like Rezeptoren und die Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Familie eingeteilt werden.

1 Einleitung

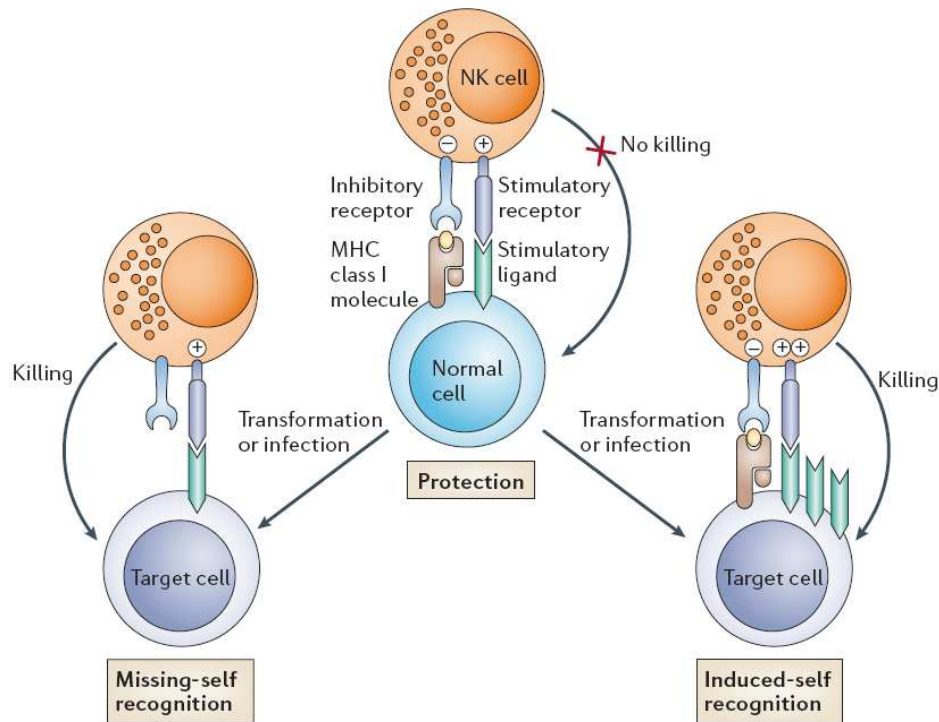


Abbildung 1.2: Missing-self und Induced-self Mechanismus von NK-Zellen [87]

1.2.1.1 Killer Immunglobulin-like Rezeptoren (KIRs)

Die extrazellulären Domänen aller KIRs sind identisch. Sowohl für inhibierende als auch für aktivierende Rezeptoren fungieren HLA-Klasse-I-Moleküle als Liganden, wobei erstere mit höherer Affinität binden. Die kodierenden Gene dieser Rezeptoren liegen auf dem Leukozyten-Rezeptor-Komplex auf Chromosom 19 [14]. Bisher sind 15 KIR-Gene bekannt, von denen 11 für Rezeptoren mit zwei Immunglobulindomänen (KIR2D-Gene) und vier für Rezeptoren mit drei Immunglobulindomänen (KIR3D-Gene) kodieren.

Inhibierende KIR-Rezeptoren und ihre Liganden

Zu dieser Gruppe gehören Isoformen der 158-Familie mit entweder zwei oder drei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen und langer intrazytoplasmatischer Domäne (KIR2DL, KIR3DL). Diese weist ein Tyrosin-haltiges inhibierendes Motiv (Immunreceptor Tyrosine-based Inhibiting Motif, ITIM) auf [111]. Bindet der Rezeptor an passende MHC-I-Moleküle wird das zytoplasmatische Tyrosin phosphoryliert, wodurch die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 an den Rezeptorkomplex binden können. Durch Dephosphorylierungen aller nachgeschalteten Signalkomponenten kommt es zur Abschaltung der Effektorwirkung der NK-Zellen [82, 15, 58].

Die beiden Rezeptoren KIR2DL2 und KIR2DL3 (p58.2/CD158b) binden Allelprodukte

1 Einleitung

der HLA-C-Gruppe1 (HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8). Dagegen bindet KIR2DL1 (p58.1/CD158a) an HLA-C-Moleküle der Gruppe 2, die durch die Allelprodukte HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5 und -Cw6 repräsentiert sind [10]. Als weiterer Rezeptor dieser Gruppe erkennt KIR3DL1 (p70/158e1) HLA-B-Allotypen mit dem serologischen Bw4-Motiv [17, 41]. KIR3DL2 (p140/CD158k) erkennt schließlich HLA-A3 und HLA-A11 Moleküle [85].

Aktivierende KIR-Rezeptoren und ihre Liganden

Alle aktivierenden Rezeptoren der Ig-Familie besitzen einen kurzen zytoplasmatischen Teil, über den sie mit transmembranären Adapterproteinen (in NK-Zellen CD3 ζ , Fc ϵ R1 γ und DAP12) verknüpft sind. Diese umfassen Tyrosin-haltige aktivierende Immunrezeptor-Motive (Immunreceptor Tyrosine-based Activating Motif, ITAM), welche über die Rekrutierung von Tyrosinkinasen aktivierende Signale weiterleiten [9]. Als Liganden dienen den beiden Rezeptoren KIR2DS1 (p50.1/CD158h) und KIR2DS2 (p50.2,3/CD158j) dieselben HLA-C-Liganden wie KIR2DL1 und KIR2DL2/3 [103]. KIR2DS4 (CD158i) bindet sowohl an MHC-Klasse-I (HLA-Cw4) Moleküle als auch an nicht-MHC-Klasse-I-Liganden [51]. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass KIR3DS1 (p70/CD158e2) HLA-Bw4-Allele bindet, jedoch konnte dies nicht eindeutig bestätigt werden [78]. Die Liganden für KIR2DS3 (p50.2,3/CD158j) und KIR2DS5 (CD158g) sind bislang noch unbekannt.

1.2.1.2 C-Typ-Lektin-Rezeptoren

Hierbei handelt es sich um Heterodimere, die aus einer Kette CD94, welche konstitutiv auf NK-Zellen exprimiert wird, und jeweils einer inhibitorischen (NKG2A, B) oder einer aktivierenden (NKG2C, E, H) Kette bestehen [62]. Diese Rezeptoren werden von Genen kodiert, die in der Region des Chromosoms 12 liegen [14]. Sowohl der inhibierende Rezeptor CD94/NKG2A, als auch der aktivierende Rezeptor CD94/NKG2C interagieren mit HLA-E, womit die Integrität der HLA-Klasse-I-Moleküle auf der Zellmembran der Targetzelle überprüft wird. Auch hier überwiegt in der Regel der inhibierende Effekt. NKG2A (CD159a) besitzt eine zytoplasmatische ITIM-enthaltende Domäne und leitet auf diese Weise das inhibitorische Signal durch Rekrutierung von SHP-1 weiter [88]. Das aktivierende Heterodimer CD94/NKG2C enthält für die Weiterleitung aktivierender Signale die ITAM-enthaltende Adapterkette DAP12, welche durch Rezeptor-Liganden-Bindung phosphoryliert wird und zu einer Rekrutierung von Signalmolekülen führt.

Einziges aktivierendes Homodimer dieser Gruppe ist NKG2D (CD314) [117]. Dieser Rezeptor erkennt Proteine, die von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen freigesetzt werden. Beispiele hierfür sind die HLA-ähnlichen Moleküle MICA/B, die von beschädigten Darmzellen oder Tumorzellen produziert werden, sowie die UL16-Bindeproteine ULBP1-4

1 Einleitung

(Unique long 16-binding Protein), die von virusinfizierten Zellen freigesetzt werden [18]. Das Homodimer enthält keine ITAM-Sequenz. Es assoziiert mit dem Adapterprotein DAP10, welches die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert.

1.2.1.3 Aktivierende Rezeptoren der Ig-Superfamilie

Hierzu gehören die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) NKp44 (CD334), NKp30 (CD337) und NKp46 (CD335), die als einzige Marker selektiv von NK-Zellen exprimiert werden. Einziger NCR, der nicht zur Ig-Superfamilie sondern zu den C-Typ-Lektin Rezeptoren gehört, ist NKp80. Er fungiert als Korezeptor der anderen NCRs und sein Ligand wurde vor einigen Jahren als das Activation Induced C-Typ-Lectin (AICL) entdeckt [115]. Als Liganden der anderen NCRs vermutet man Kohlenhydratstrukturen [86]. Diese Rezeptoren assoziieren mit unterschiedlichen Adaptermolekülen: NKp46 und NKp30 mit CD3 ζ , NKp46 zusätzlich mit CD3 ζ -Fc ϵ R1 γ . Sie werden beide sowohl von ruhenden als auch von aktivierten NK-Zellen exprimiert [98] und die Expression von NKp30 steht in Zusammenhang mit derjenigen von NKp46. NKp44 wird nur von IL-2 stimulierten NK-Zellen exprimiert und ist mit DAP12 assoziiert. Auch seine Expressionsdichte steht in Zusammenhang mit derjenigen der anderen beiden Rezeptoren [110, 16]. Die Weiterleitung der Signale der NCRs erfolgt über die ITAM enthaltenden Adaptermoleküle DAP12 und CD3 ζ durch die Aktivierung der PI-3-Kinase und die Phosphorylierung weiterer Kinasen. Andere Rezeptoren, die NK-Zellen aktivieren können, sind CD244, CD160 sowie einige Integrine.

Weiterhin gehört zu diesen Rezeptoren eine Untergruppe der CD2-Familie: 2B4 (CD244), NTB-A (NK-, T-, B-cell Antigen), CRACC (CD319) und DNAM-1 (CD226). Hierbei handelt es sich um aktivierende Rezeptoren, die keine eigene ITAM-Domäne besitzen oder nicht damit assoziiert sind [102].

Die folgende Liste gibt noch einmal einen Überblick über die bisher bekannten NK-Zellrezeptoren und ihre Liganden

Tabelle 1.1: Liste der bekannten inhibierenden NK-Rezeptoren und ihrer Liganden

Rezeptor (ITIM)	Ligand (MHC)	Rezeptor (ITIM)	Ligand (nicht-MHC)
KIR2DL1	HLA-C Gr.1	KLRG1	E/N/P-Cadherin
KIR2DL2/3	HLA-C Gr.2	NKR-P1 (CD161)	LLT1
KIR3DL1	HLA-B Allele	Siglec-7	Sialinsäure
KIR3DL2	HLA-A Allele	Siglec-9	Sialinsäure
LIR-1/ILT2	Multiple HLA-Klasse-I	iRp60	unbekannt
CD94/NKG2A	HLA-E	LAIR-1	Kollagen Typ IV

1 Einleitung

Tabelle 1.2: Liste der bekannten aktivierenden NK-Rezeptoren und ihrer Liganden

Rezeptor (ITAM)	Ligand	Rezeptor (nicht-ITAM)	Ligand
KIR2DS1.2	HLA-C niedrige	NKG2D	ULBPs, MICs
KIR2DS3,5,6	unbekannt	2B4	CD48
KIR2DS4	HLA-Cw4	CD2	LFA-3
KIR3DS1	unbekannt	CRACC	CRACC
CD94/NKG2C	HLA-E	NTB-A	NTB-A
NKp30	unbekannt	CD7	SECTM1, Galaktin
NKp44	Hämagglutinin	DNAM-1	CD155 (PVR)
NKp46	Hämagglutinin	KIR2DL4	HLA-G
NKp80	AICL	CD44	Hyaluronsäure
CD16 (FcγRIIIA)	IgG		

Rezeptor (Integrin)	Ligand
LFA-1	ICAM-1,5
MAC1	ICAM-1, Fibrinogen
VLA-4	VCAM-1, Fibronectin

1.2.1.4 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle vermitteln die Bindung einer Zelle an eine andere oder an Proteine der zellulären Matrix. Bei Adhäsionsmolekülen, die bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen, handelt es sich um Integrine, Selektine und Genprodukte der Ig-Superfamilie. Selektine sind membranständige Glykoproteine, die spezifische Kohlenhydratgruppen binden. Sie werden auf aktiviertem Endothel induziert und lösen Wechselwirkungen zwischen diesem und Leukozyten aus. Intercellular adhesion molecules (ICAMs) auf dem Endothel sind für eine festere Adhäsion der Leukozyten verantwortlich. Sie binden an heterodimere Proteine der Integrin-Proteinfamilie auf den Leukozyten, so genannten Lymphocyte Function-associated Antigens (LFAs). Alle im Folgenden aufgelisteten Adhäsionsmoleküle haben Einfluss auf die Interaktion von NK- mit Targetzellen und gehören der IgG Superfamilie an. Einzige Ausnahme stellt LFA-1 dar, welches den Integrinen zuzurechnen ist:

1 Einleitung

Tabelle 1.3: Adhäsionsmoleküle

Bezeichnung	CD-Antigen	Funktion
ICAM 1	CD54	Ligand für LFA 1 von zytotoxischen T-Zellen
ICAM 2	CD 102	Ligand für Integrine, ermöglicht z.B. die Bindung von Lymphozyten an Antigen-präsentierende Zellen
ICAM 3	CD50	Interaktion zwischen Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen
LFA 1	CD11a/CD18	Interaktion zwischen NK-Zellen und CTLs mit ihren Targetzellen
LFA 2	CD2	Bindet LFA3 als Liganden und ist wichtig für die Zelladhärenz
LFA 3	CD58	Bindet an CD 2 und wird u.a. auch auf B-Zellen, T-Zellen und Monozyten exprimiert

1.2.2 Mechanismen der Zytolyse durch NK-Zellen

Jeder Aktivierung einer NK-Zelle muss vorher eine Interaktion zwischen einem spezifischen Liganden und dem entsprechenden NK-Zell-Rezeptor vorausgegangen sein. Dies geschieht im Wesentlichen über den Fas/Fas-Ligand (FasL) Mechanismus, den Perforin-Granzym Mechanismus und das TRAIL (TNF-related apoptosis inducing factor ligand) System [63]. Experimente haben gezeigt, dass das Perforin-Granzym-System unverzichtbar bei der Tumorlyse ist, während der Fas/FasL-Mechanismus nach IL-2 Stimulation an Bedeutung gewinnt [12].

Fas/FasL-Mechanismus

NK-Zellen exprimieren drei Liganden der TNF-Familie: FasL, TNF und TRAIL. Exprimiert die Targetzelle entsprechende Rezeptoren, CD95 für FasL, R1 für TNF und DR4/DR5 für TRAIL und treten diese mit den Liganden der NK-Zelle in Verbindung, so wird in der Zielzelle Apoptose induziert. Über intrazelluläre Signalkaskaden kommt es schließlich zu Chromatinkondensation, Zellschrumpfung, Kernsegmentierung und DNA-Fragmentierung [1].

Perforin-Granzym-Mechanismus

Dies ist der weitaus häufigere Mechanismus der Zell-Lyse. Er wird ausgelöst durch die calciumabhängige Freisetzung lytischer Granula, die Perforin und Granzyme enthalten. Perforin polymerisiert in der Membran der Targetzelle zu Poren mit einem äußeren lipophilen und einem inneren hydrophilen Anteil. Hierdurch kommt es zu einem Ladungs- und

1 Einleitung

Wasserausgleich und folglich zu einer Lyse der Targetzelle. Bei den Granzymen handelt es sich um eine Gruppe von Proteasen. In welcher Form Perforin und Granzym zusammenarbeiten ist noch nicht endgültig geklärt. Versuche, in denen gezeigt wurde, dass Granzym B auch Perforin-unabhängig in die Zielzelle eindringen kann, widersprechen früheren Annahmen, dass Granzyme mit Hilfe der durch Perforin induzierten zylinderförmigen Poren in die Targetzelle gelangen. Außerdem wurde festgestellt, dass die durch Perforin induzierten Poren einen viel zu kleinen Durchmesser haben, um Granzyme in die Zelle eindringen zu lassen. Ein anderer Ansatz geht davon aus, dass Granzyme über Endozytose in die Targetzelle aufgenommen werden, oder an der Zelloberfläche spezifische Rezeptoren vorhanden sind [96]. Einmal in die Targetzelle eingedrungen, lösen Granzyme durch Aktivierung von Caspasen den programmierten Zelltod aus. Perforin allein induziert somit nur Nekrose, während Granzyme auch Apoptose initiieren können.

Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC)

NK-Zellen sind als einzige Lymphozyten befähigt, neben natürlicher Zytotoxizität auch Antikörper-abhängige Zytotoxizität auszuüben [4]. Infizierte Zellen, die an ihrer Oberfläche fremde, an MHC-Moleküle gebundene Peptide aufweisen, werden normalerweise von T-Zellen zerstört. Mit Viren infizierte Zellen können zusätzlich auf ihrer Oberfläche virale Proteine exprimieren, die von Antikörpern erkannt und durch NK-Zellen getötet werden können. Ausgelöst wird dieser Prozess, indem an eine Zelle gebundene Antikörper mit Fc-Rezeptoren der NK-Zelle in Kontakt treten. NK-Zellen exprimieren den Rezeptor FC γ RIII (CD16), der IgG1- und IgG3-Subklassen erkennt und einen zytotoxischen Angriff auslöst [61]. Dieser verläuft wie oben beschrieben über den Perforin-Granzym-Mechanismus.

Sekretorische Aktivität von NK-Zellen

Neben den oben beschriebenen drei Hauptmechanismen der Zytolyse setzen NK-Zellen während der Targetzelllyse verschiedene Zytokine frei, und haben auf diese Weise einen entscheidenden Anteil an der Regulation, Entwicklung und Vollendung der Immunantwort [5]. Beispielsweise kommt es zur Ausschüttung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie von Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF). Des Weiteren sezernieren NK-Zellen IFN- γ , das die Differenzierung von T-1-Helferzellen anregt, die Produktion der MHC-Moleküle steigert und eine starke antimykobakterielle und antivirale Wirkung besitzt. Durch Sezernierung dieser Zytokine lenken NK-Zellen das Immunsystem in Richtung zellulärer Immunantwort und mit der Ausschüttung weiterer Zytokinen wie IL-1, IL-3, IL-4, IL-6 nehmen sie massiv Einfluss auf andere immunkompetente Zellen. Somit spielen NK-Zellen sowohl bei der Regulation und Optimierung

1 Einleitung

der frühen, angeborenen Immunantwort, als auch bei der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle, da sie zur Antikörper-vermittelten Zytotoxizität befähigt sind [13].

1.3 Zytokine und Interleukine

Bei Zytokinen handelt es sich um kleine lösliche Proteine, die von einer Zelle sezerniert werden und das Verhalten oder die Eigenschaften der Zelle selbst oder einer anderen Zelle beeinflussen. Sie werden auch von vielen Zellen freigesetzt, die nicht zum Immunsystem gehören. Als Interleukine oder Lymphokine bezeichnet man die von Lymphozyten freigesetzten Zytokine.

1.3.1 Zytokine im Überblick

In der folgenden Tabelle sind kurz diejenigen Zytokine aufgeführt, die für diese Arbeit von Bedeutung sind:

Tabelle 1.4: Zytokine

Zytokin	Rezeptor	produzierende Zellen	Wirkungen
IL-2	CD25 (α), CD122 (β), CD132 (γ)	T-Zellen	Aktivierung und Proliferation bzw. Differenzierung von NK-Zellen, B- und T-Zellen
IL-4	CD124	T-Zellen, Mastzellen	Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, Inhibitor von Makrophagenfunktionen, Stimulation aktivierter B-Zellen
IL-5	CD125, β_c	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung Eosinophiler
IL-10	IL-10R α , CFR2-4	T-Zellen, Makrophagen	wirksamer Inhibitor von Makrophagenfunktionen
IL-12	IL-12R β_1 , IL-12R β_2	B-Zellen, Makrophagen	aktiviert NK-Zellen, induziert die Differenzierung von CD-4-Zellen zu TH_1 -ähnlichen Zellen

1 Einleitung

IL-15	IL15R α , CD122 (β), CD132 (γ)	mononukleäre Zellen, Endothelzellen, Epithelzellen	Steigerung der Proliferation und Migration von T-Zellen, Förderung der Entwicklung von B-Zellen, Verstärkung der Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen; reguliert T-, B- und NK-Zell Aktivierung und Proliferation
TNF-α	p55, p75, CD120a, CD120b	aktivierte Monozyten und Makrophagen, NK-Zellen, T-/B-Zellen	lokale Entzündung, Endothelaktivierung, zytotoxisch für viele transformierte Zellen
IFN-γ	CD119, IFNGR2	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, erhöhte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungssystems, Ig-Klassenwechsel, hemmt <i>TH</i> ₂ -Zellen
GM-CSF	CD116, β c	Makrophagen, B-Zellen, Fibroblasten, EC	stimuliert Wachstum und Differenzierung der myelomonozytischen Zelllinie, besonders der dendritischen Zellen

1.3.2 Interleukin-2

IL-2 ist ein 14 bis 17 kD schweres Glykoprotein, das beim Menschen von einem einzelnen Gen auf Chromosom 4 kodiert wird. Es wurde 1976 erstmals als ein Protein beschrieben, welches das Wachstum und die Proliferation von T-Zellen unterstützt [75]. Seit damals werden ihm viele biologische Fähigkeiten zugeschrieben, unter anderem die Stimulation der Proliferation von Lymphozyten, die Induktion der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen und die Anregung der Produktion vieler anderer Zytokine, wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- β , IL-6 und IFN- γ [100, 27]. IL-2 wird von CD4⁺-T-Zellen und in etwas geringeren Mengen auch von CD8⁺-T-Zellen produziert. Das Zusammentreffen einer T-Zelle mit einem spezifischen Antigen in Gegenwart des erforderlichen costimulierenden Signals bewirkt, dass die T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus eintritt. Gleichzeitig wird die Synthese von IL-2 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors induziert. Dieser besteht aus

1 Einleitung

den 3 Ketten α (CD25), β (CD122) und γ (CD132). Während die β - und γ - Kette von ruhenden T-Zellen exprimiert werden und IL-2 nur mit mäßiger Affinität binden, wird die α -Kette von aktivierten Zellen exprimiert und es kommt zur Bildung eines hochaffinen heterodimeren Rezeptors. Aufgrund der Bindung von IL-2 durchlaufen die T-Zellen den Rest des Zellzyklus. Des Weiteren fördert IL-2 die Differenzierung der T-Zellen zu bewaffneten T-Effektorzellen. IL-2 stellt somit den wichtigsten autokrinen Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten dar und die Menge an IL-2 bestimmt das Ausmaß der T-Zell-abhängigen Immunantwort. Auf menschliche B-Zellen wirkt es sowohl als Wachstumsfaktor als auch als Stimulus für die Antikörpersynthese. Außerdem stimuliert IL-2 das Wachstum von NK-Zellen und erhöht ihre zytotoxische Fähigkeit, sodass so genannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) generiert werden, welche ohne MHC-Restriktion andere Zellen töten können [39].

IL-2 kann seit 1983 auf gentechnischem Weg hergestellt werden und steht so ausreichend für wissenschaftliche Untersuchungen und für den Einsatz in der Klinik zur Verfügung. Erste Ergebnisse aus Tierversuchen waren so viel versprechend, dass Rosenberg et al. IL-2 seit 1984 auch in klinischen Studien beim Menschen als Monotherapie und auch in Kombination mit autologen LAK-Zellen anwendeten. Die Ergebnisse fielen unterschiedlich aus. Mit einer Effektivität von 15-30% wurden die besten Ergebnisse bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms sowie des malignen Melanoms erzielt. Es konnte durch die Kombinationstherapie jedoch kein nennenswerter zusätzlicher Erfolg erzielt werden [92, 94]. Mit dem Ziel, die Wirksamkeit gegen Tumorerkrankungen zu steigern und die unerwünschten Nebenwirkungen zu verringern, wird die Möglichkeit der Kombination von IL-2 mit weiteren Substanzen untersucht, vor allem mit anderen Lymphokinen und Zytostatika.

Die zentrale Rolle von IL-2 bei der Auslösung erworbener Immunreaktionen wird anhand von Medikamenten deutlich, die meist zur Unterdrückung unerwünschter Immunreaktionen verwendet werden, z.B. bei Transplantatabstoßung: Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen beispielsweise die IL-2-Produktion, indem sie die Signalgebung über den T-Zell-Rezeptor unterbinden.

Die systemische Applikation von IL-2 ist heute gemäß den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Urologie und der für Immuntherapie nur beim metastasierten Nierenzellkarzinom und beim metastasierten malignen Melanom etabliert. Nebenwirkungen der IL-2 Therapie sind unter anderem Fieber, Myalgie, Schüttelfrost und Abnahme des Allgemeinzustandes. Die low-dose Therapie wird jedoch bei Patienten mit bösartigen Erkrankungen über mehrere Wochen relativ gut vertragen. Sobald aber höhere Dosen IL-2 verabreicht werden, ist dies mit einer beträchtlichen Toxizität verbunden [93].

1 Einleitung

Ziele weiterer Untersuchungen und Forschungsarbeiten sind die Verminderung der Nebenwirkungen und die Steigerung der Wirksamkeit der kombinierten Chemo-Immuntherapie, sowie die Bewertung einer langfristigen Anwendung als Erhaltungstherapie.

1.4 Biobran/MGN-3

1.4.1 Entwicklung und Herstellung von Biobran

Biobran wurde das erste Mal 1992 in Japan von Hiroaki Media entwickelt. Bei dem generischen Namen MGN-3 handelt es sich lediglich um die Anfangsbuchstaben seiner Entdecker Maeda, Ghoneum und Ninomiya. Vermarktet wird das Produkt von Daiwa unter dem Namen Biobran. Fast alle Forschungsarbeiten, die zu Biobran bisher publiziert wurden, gehen auf die Forschungsgruppe um Ghoneum und Maeda zurück.

Seit langem schon ist bekannt, dass viele Polysaccharide als Biological Response Modifiers (BRM) wirken und das Immunsystem stimulieren können. Ballaststoffen wird die Fähigkeit zugeschrieben den Cholesterin-Spiegel zu senken, den Zuckerstoffwechsel zu verbessern, und Giftstoffe aus dem Darm zu entfernen. Einige werden sogar als Immunmodulatoren in der Tumorbehandlung eingesetzt, Reiskleie besitzt antivirale Eigenschaften und bestimmte Pilzfasern können die Immunreaktion fördern [83]. Viele der Polysaccharide aus Pflanzenfasern können auf Grund ihres zu großen Molekulargewichts nicht über den Darm aufgenommen werden. Spaltet man sie jedoch in kleinere Komponenten, so genannte Hemizellulosen, können sie unverdaut über den Dünndarm in die Blutbahn gelangen und ihre Wirkung entfalten. An dieser Stelle setzt Biobran an: Reiskleie enthält Zellulose, Hemizellulose, Pektin und Lingin. Hemizellulose ist ein Heteroglycan, das viele Monosaccharide enthält und eine komplexe Struktur besitzt. Ein spezieller Typ der Hemizellulose ist Hemizellulose B. Diese ist wasserlöslich und besteht aus einer langen Xylose-Kette mit Arabinoseästen, die wiederum Äste von Galaktose, Glukose oder Uronsäure besitzen. Ihr Molekulargewicht ist viel kleiner als das der anderen Hemizellulosen, was zu der Annahme führt, dass sie ohne Änderung der Molekülstruktur aufgenommen werden kann. Hemizellulose B selbst hat allerdings keine immunmodulatorische Wirkung. Durch partielle Hydrolyse von Hemizellulose B aus Reiskleie mit einem Enzymextrakt aus dem Myzel des Shiitake-Pilzes wird das Reiskleie-Hemizellulose-Derivat Biobran/MGN-3 hergestellt. Dessen Hauptbestandteil ist das auch als β -1,4-Xylophyronase-Hemizellulose bezeichnete Arabinoxylan.

1.4.2 Molekülstruktur und Wirkung

Im Jahr 2004 stellten Miura et al. auf dem jährlichen Treffen der Japanese Society of Applied Glycoscience eine Studie vor, in der sie versuchten, den chemischen Inhaltsstoff von Biobran zu analysieren, der den immunmodulatorischen Effekt hervorruft. Als Indikator diente die Stimulation von Makrophagen durch Messung von Stickstoff, IL-1 β und TNF- α , sowie die Untersuchung der chemischen Strukturen des aktiven Bestandteils von Biobran durch Ionen-Austausch-Chromatografie und die Bestimmung des Molekulargewichts. Es zeigte sich, dass die Hauptkomponenten von Biobran Arabinose, Galaktose und Glukose sind. Die Resultate dieser Analysen lassen die folgende Polysaccharid-Struktur vermuten:

1. Arabinogalaktan mit einer 1,4- β -Galaktan-Hauptkette und Arabinose-Seitenketten
2. Arabinoxylan mit einer 1,4- β -Xylan-Hauptkette und Arabinose-Seitenketten
3. Arabinan mit einer 1,5- α -Hauptkette und Arabinose-Seitenketten
4. β -1:1,4-Glukan

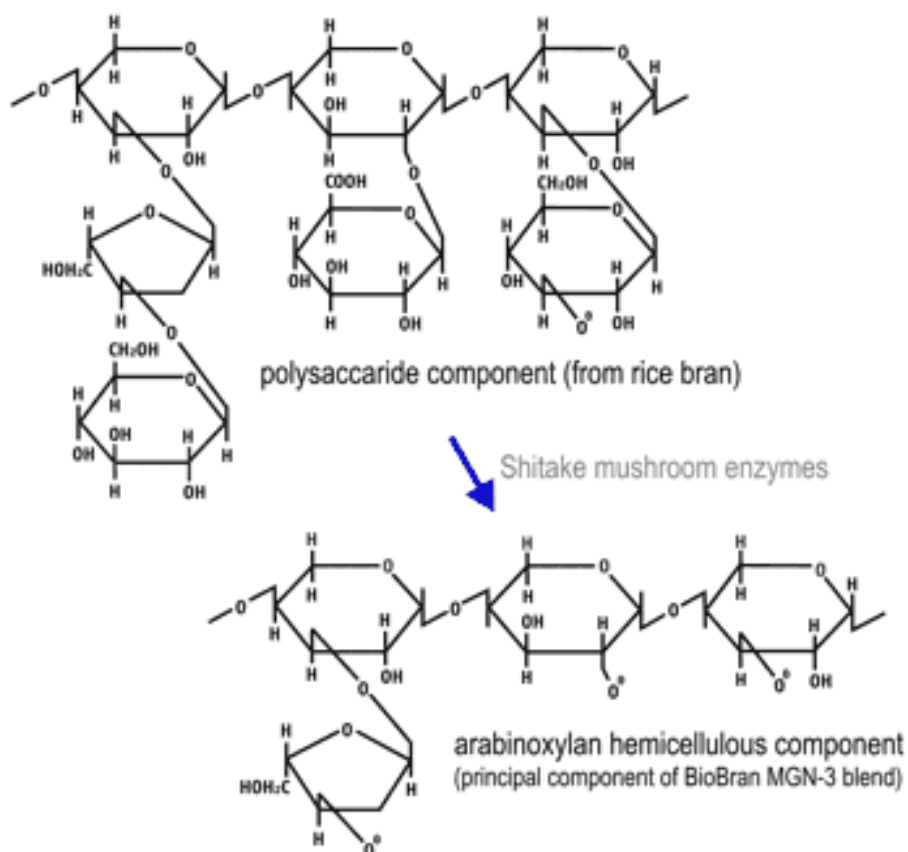


Abbildung 1.3: Strukturformel von Biobran nach A.Paterson

1 Einleitung

Allerdings sind noch weitere Analysen notwendig um herauszufinden, ob diese Polysaccharide gemischt oder als Teile eines Moleküls vorliegen. Nach der vorliegenden Studie ist jedoch anzunehmen, dass die immunmodulatorische Komponente von Biobran ein komplexes Heteropolysaccharid ist.

Aber wie genau wirkt nun dieses Polysaccharid auf den Körper? Die Frage nach dem exakten Wirkmechanismus von Biobran kann bis zum heutigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. In verschiedenen Studien konnte bislang *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass durch Biobran sowohl die Aktivität von NK-Zellen als auch parallel dazu die Ausschüttung von $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ gesteigert wird [30, 34]. Dieser Effekt konnte auch für Versuche mit peripheren mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) nachgewiesen werden. Zusätzlich war hier ein synergistischer Effekt von MGN-3 und IL-2 zu beobachten, der bei gereinigten NK-Zellen fehlte, da deren Aktivität bereits bei Anwendung einer der beiden Komponenten ihr Maximum erreicht hatte [34]. In derselben Studie wurde versucht herauszufinden, auf welchem Weg Biobran sowohl die NK-Zellaktivität als auch die Sekretion von Zytokinen anregt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass MGN-3 CD69, CD25 und CD54 hoch reguliert. Eine weitere Studie von Ghoneum zeigte, dass durch Biobran, parallel zur Steigerung der Aktivität von PBMCs, auch deren Granularität, Esterase-Aktivität und Konjugation an Antigene zunahm [31]. Da NK-Zellen in unserem Immunsystem eine sehr wichtige Rolle spielen und der Effekt von Biobran besonders auf sie sehr groß ist, orientieren sich viele Studien zu Biobran in diese Richtung. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass Biobran die NK-Zellaktivität auf das fünffache steigern kann [30]. Aber auch für B- und T-Zellen konnte eine Steigerung um 200 bis 250% nachgewiesen werden. Des Weiteren ließ die Wirkung von Biobran über die vierjährige Dauer der Studie nicht nach, was für immunmodulatorische Substanzen sehr selten ist [28]. Mit seinen immunstärkenden und gleichzeitig entzündungshemmenden Eigenschaften werden Biobran folgende Wirkungen zugeschrieben:

- Allgemeine Aufrechterhaltung der Gesundheit durch Erhöhung der Aktivität der Leukozyten.
- Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit und der Lebensqualität (durch Verminderung der Nebenwirkungen, getestet an Cisplatin und Doxorubicin) bei Krebspatienten, vor allem durch Aktivitätssteigerung der NK-Zellen [46]. Ghoneum konnte in einer Studie 2003 nachweisen, dass mit Biobran vorbehandelte menschliche Leukämie-Zellen der Linie HUT 78 verstärkt zu Apoptose neigen und dies womöglich durch eine Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9 hervorgerufen wird [32]. In einer späteren Studie 2005 mit menschlichen Brustkrebszellen beobachtete er bei mit Biobran behandelten Krebszellen eine erhöhte Phagozytose-induzierte Apop-

1 Einleitung

toseaktivität, deren Mechanismus möglicherweise ebenfalls durch eine Erhöhung der Aktivität der Caspasen 8 und 9 zustande kommt [33].

- Antivirale Eigenschaften, getestet an HIV [29].
- Evtl. antibakterielle Eigenschaften, Studien hierzu sind jedoch nicht eindeutig.
- Verbesserung von Diabetes mellitus. Ohara et al. konnten in einer Studie an Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes nachweisen, dass Biobran zwar nicht den Blutzuckerspiegel senken und Insulin erhöhen kann, jedoch eine Erhöhung von Triglyzeriden und totalem Cholesterol verhindert, den totalen Proteinanteil erhöht und die Wasseraufnahme reduziert [81]. In einer weiteren Studie an Ratten zur Glukosetoleranz konnte beobachtet werden, dass Biobran das Ansteigen der Plasmaglukose abmildern kann [80].
- Reduktion der Entzündungsreaktion des Körpers z.B. bei Arthritis.
- Reduktion der Mastzelldegranulation bei Allergikern und somit Verminderung der Symptome. Argumente hierzu liefert eine Studie von Kanbayashi und Endo: Bei Mäusen wurde mit Hilfe von TDI (Toluene Diisocyanate) eine Asthma-Reaktion induziert und daraufhin die Serumhistaminspiegel, der Anteil Eosinophiler im Blut und die Dicke des Ohrläppchens gemessen. Diejenigen Mäuse, die zuvor mit MGN-3 behandelt wurden wiesen bei allen drei Messungen wesentlich niedrigere Werte auf [23].

Allerdings ersetzt Biobran keinesfalls die konventionellen Therapieformen. Es kann immer nur zusätzlich angewendet werden um diese zu verstärken und zu unterstützen. Außerdem sind noch viele weitere und größere in vivo Studien nötig, insbesondere auch Doppel-Blind-Versuche, um exaktere Ergebnisse, Langzeitwirkungen und Statistiken zu bekommen.

1.4.3 Nebenwirkungen und Toxizität von Biobran

Nach Maeda von Daiwa Pharmaceutical sind durch Biobran keine Sicherheitsprobleme zu befürchten. Die bei der Produktion verwendeten Stoffe sind Reiskleie, lauwarmes Wasser und Enzyme (Carbohydrase) vom Shiitake Pilz, die schon eingehend auf Sicherheit überprüft wurden. Das Endprodukt kann zwar Spuren von Pilz enthalten, jedoch traten selbst bei Personen mit Pilzunverträglichkeit bislang fast ausnahmslos keine allergischen Reaktionen auf. Biobran wurde von der japanischen Health Food and Nutrition Food Association anerkannt und erfüllt die strengen, unter Aufsicht des Gesundheits- und Wohlfahrtsministeriums festgelegten Anforderungen. Die Sicherheit von Biobran wurde bislang durch Studien zur akuten oralen Toxizität an Ratten, durch den Ames-Salmonella-Mutagenitätstest, eine Studie zur subchronischen Toxizität und eine Studie mit Meer-

1 Einleitung

schweinen zur Antigenität untersucht. Alle Ergebnisse bescheinigen dem Produkt eine ausreichende Sicherheit. Des Weiteren wurde die Sicherheit durch eine Studie mit Krebspatienten, die Biobran über einen Zeitraum von sechs Monaten einnahmen, bestätigt [109].

1.5 CD-Oberflächenantigene

Die Phänotypisierung von Leukozytensubpopulationen und deren Reifungsgrad erfolgt anhand der Expression bestimmter Moleküle auf der Zelloberfläche. Um diese Moleküle nachzuweisen, bedient man sich monoklonaler Antikörper, die spezifisch das entsprechende Antigen binden. Die Summe, der für ein bestimmtes Oberflächenmolekül typischen Antikörper, bezeichnet man als "Cluster of Differentiation (CD)". Im Folgenden werden die für diese Arbeit von Bedeutung erscheinenden CD-Oberflächenantigene kurz charakterisiert:

Tabelle 1.5: CD-Oberflächenantigene

CD-Antigen	Zellexpression	Funktion
CD3	Thymocyten, T-Zellen	bestehend aus den invarianten akzessorischen Ketten CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ ; bildet zusammen mit der TCR α -und TCR β -Kette und der ζ -Kette den α : β -T-Zell-Antigenrezeptorkomplex; hiermit Erkennung und Bindung von Peptid-MHC-Liganden; Zelloberflächenexpression und Signalübertragung
CD16	Neutrophile, NK-Zellen, Makrophagen	Bestandteil des niedrigaffinen Fc-Rezeptors Fc γ RIII; vermittelt Phagozytose und ADCC.
CD25	aktivierte B-Zellen, T-Zellen, Monozyten	α -Kette des IL2-Rezeptors
CD56	NK-Zellen	Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM)
CD69	aktivierte T- , B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen	frühes Aktivierungsantigen

1 Einleitung

CD94	NK-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen	beteiligt an Regulation und Funktion von NK-Zell Aktivierung und Adhäsion.
CD122	Untergruppe von T-Zellen, NK-Zellen	verantwortlich für die durch IL-2 ausgelöste Signaltransduktion; dominierende Struktur bei der Aktivierung von T- und NK-Zellen
CD132	B-, T-Zellen, NK- Zellen, Mastzellen, Neutrophile	γ -Kette des IL2-Rezeptors; gemeinsame Untereinheit der IL2-, IL4-, IL7-, IL9- und IL15-Rezeptoren
CD158a	Untergruppe NK-Zellen	Hemmung der Zytotoxizität von NKC durch Bindung an HLA-C-Allelprodukte der HLA-C-Gruppe 2 (Cw1,3,7,8)
CD158b	Untergruppe NK-Zellen	Hemmung der Zytotoxizität von NKC durch Bindung an HLA-C-Allelprodukte der HLA-C-Gruppe 1 (Cw2,4,5,6)
CD158e	Untergruppe NK-Zellen	Hemmung der Zytotoxizität von NKC bei Bindung an HLA-B-Allotypen (HLA Bw4)
CD159e (NKG2A)	NK-Zellen	Bindung an CD94 und so Bildung des NK-Rezeptors; Hemmung der Zytotoxizität von NKC bei Bindung an MHC-I-Moleküle
CD226	NK-Zellen, Thrombozyten, Monozyten, Untergruppe T-Zellen	Adhäsionsglykoprotein; Bindung an CD112, CD155 und einen unbekanntem Liganden tragende Zellen; Vernetzung von CD226 mit Antikörpern führt zur Aktivierung der Zellen.
CD314 (NKG2D)	NK-Zellen, T-Zell- Subpopulationen	aktivierendes Homodimer; erkennt MICA- und MICB-Moleküle
CD335 (NKp46)	NK-Zellen	gehört zur Familie der Natural Cytotoxic Receptors (NCR); wirkt aktivierend auf NK-Zellen
CD336 (NKp44)	NK-Zellen	gehört zur Familie der Natural Cytotoxic Receptors (NCR); wirkt aktivierend auf NK-Zellen
CD337 (NKp30)	NK-Zellen	gehört zur Familie der Natural Cytotoxic Receptors (NCR); wirkt aktivierend auf NK-Zellen
IL-15Rα	NK-, NKT-Zellen	Aktivierung
$\gamma\delta$	T- Zellsubpopulation	unbekannt; evtl. beteiligt an der Erkennung bakterieller Liganden und Tumorzellen; spielen evtl. eine Rolle bei der Immunreaktion bei Infektionen und der pathophysiologischen Regulation von Autoimmunprozessen

1.6 Fragestellung

Krebsbedingte Todesfälle stehen an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik in den industrialisierten Ländern. Aktuell liegt der Schwerpunkt der Forschung auf der Suche nach Therapien, insbesondere Immuntherapien. Ein großer Nachteil sind allerdings die häufig sehr starken Nebenwirkungen, die eine Weiterführung der Therapie in den nötigen Dosen oft unmöglich machen. Ziel muss es daher sein, diese Nebenwirkungen, z.B. durch die Kombination verschiedener Substanzen, zu verringern. NK-Zellen weisen bei der Abwehr maligner Zellen eine Schlüsselfunktion auf. An diesen Punkten setzt die vorliegende Arbeit an:

Ziel war es, den Einfluss und den Wirkmechanismus des Nahrungsergänzungspräparates Biobran/MGN-3 auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zu untersuchen. Die bisherige Studienlage zu Biobran besteht fast ausschließlich aus Forschungsarbeiten von Professor Ghoneum und seiner Arbeitsgruppe, der maßgeblich an der Entwicklung von Biobran beteiligt war. Im ersten Teil der Arbeit wurde Biobran auf seinen direkten aktivitätssteigernden Effekt auf NK-Zellen gegenüber Rhabdomyosarkom- und Ewingsarkomzellen untersucht. In einem zweiten Teil wurde getestet, ob diese zytotoxizitätssteigernde Eigenschaft von Biobran auch bei gesunden Versuchspersonen *in vivo* nachweisbar war. Zusätzlich zu den Zytotoxizitätstests wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Zytokinaktivitätsmessungen versucht, dem zugrunde liegenden Wirkmechanismus auf die Spur zu kommen.

2 Material

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Geräte-, Glas- und Plastikmaterial

sterile Werkbank Hera safe	Heräus
Brutschrank Hera cell	Heräus
Kühlschrank, Gefrierschrank	Liebherr
Laborzentrifugen:	Hettich
- Rotixa 50 RS - Rotixa RP	
Blutanalysegeräte: Cellcounter Advia	Bayer
Beheizbares Wasserbad	Memmert
Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 106	Bandelin
Vortexer VF 2	Heidolph
Schüttler, Titramax 100	Heidolph
Pipettiergerät Multipette Plus	Brand
Pipettiergerät Pipettboy	Integra Bioscience
Sterile Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50ml)	Costar
Verstellbare Pipetten, Pipetman (10, 100, 200, 1000µl)	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
PPN-Röhrchen, steril, 15ml, 50ml	Greiner
Röhrchenständer	Nalgene
Reaktionsgefäße, steril, 1,5ml	Eppendorf
Zellkulturflaschen 50ml, 250ml	Costar, Greiner
Handschuhe	Ansell
Desinfektionsspray	Braun
Spritzen, 5, 10, 20, 50ml	Braun
Butterfly 21	Sarstedt
Kanülen Sterican	BD Microlance

2.1.2 Stammlösungen

Stammlösung A: Medium für die Zellkultivierung von K562 und Zytotoxizitätsassay

500 ml RPMI 1640	Biochrom
50 ml inaktiviertes Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
5 ml L-Glutamin (200ml)	Biochrom
5 ml Penicillin (1000U)/Streptomycin (10mg/ml)	Biochrom
12,5 ml Hepes-Buffer 1M	Biochrom

Stammlösung B: Medium für die Zellkultivierung von adhärennten Zellen

500 ml DMEM	BD Whittaker Lonza
50 ml inaktiviertes Fetales Kälberserum (FCS)	Laboratories
5 ml L-Glutamin (200ml)	Biochrom
5 ml Penicillin (1000U)/Streptomycin (10mg/ml)	Biochrom
12,5 ml Hepes-Buffer 1M	Biochrom

Stammlösung C: MACS-Puffer

500 ml Phosphat buffered saline (PBS)	BD Whittaker Lonza
10,6 ml EDTA (250 mM)	Universitätsapotheker
10 ml Humanalbumin 20	DRK BW

Stammlösung D: FACS-Puffer

500 ml Phosphat buffered saline (PBS)	BD Whittaker Lonza
1,66 ml Bovine serum albumine (BSA), 30%	Sigma
5 ml Natriumazid, 10%	Sigma

2.2 Material für die Isolierung peripherer mononukleärer Zellen

peripheres Vollblut	Freiwillige Spender
Heparin	Ratiopharm
Ficoll	Biochrom
Phosphat buffered saline (PBS)	BD Whittaker Lonza

2.3 Material für die Zellanreicherung

Mini MACS (Magnet)	Miltenyi Biotec
MLC-1 Handmagnet	Miltenyi Biotec
Separationssäule Typ LS+	Miltenyi Biotec
Stammlösung B	
Polyglobulin 5%	Bayer
CD56 Microbeads	Miltenyi Biotec

2.4 Material für die Zellzählung und Mikroskopie

Neubauer Zählkammer	Brandt
Deckglas	Menzel
Trypanblau (0,4%)	Sigma
Lichtmikroskop	Olympus
Inversionsmikroskop	Olympus

2.5 Material für die Zytotoxizitätstests

Sonifier Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power
Victor 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer
angeschlossene Hardware	Compaq
Software Wallac 1420 Workstation	Perkin Elmer
Mikrotiterplatte, U-Form, F-Form	Greiner
BATDA-Ligand	Perkin Elmer
Europium-Lösung	Perkin Elmer
Lyse-Puffer	Perkin Elmer
Polyglobulin	Bayer
IL-2	Chiron GmbH
IL-15	R&D
Biobran	Braun

2.6 Material für die Durchflusszytometrie

FACS Calibur	Becton Dickinson
angeschlossene Hardware	Apple
Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson
Quifikit	Dako
Stammlösung C	
Analyseröhrchen	BP

monoklonale Antikörper

Antikörper	Markierung	Hersteller
IgG1	FITC	Becton Dickinson
IgG1	APC	Becton Dickinson
IgG2a	PE	Becton Dickinson
IgG2	PerCP	Becton Dickinson
CD56	FITC	Becton Dickinson
CD56	APC	Becton Dickinson
CD25	FITC	Becton Dickinson
CD69	APC	Becton Dickinson
CD158a	FITC	Miltenyi Biotec
CD158b	PE	Becton Dickinson
CD158e	APC	Becton Dickinson
CD3	PerCP	Becton Dickinson
CD16	PE	Becton Dickinson
CD94	FITC	Becton Dickinson
NKG2D	APC	R&D
NKG2A	PE	Immunotec/ Coulter
CD226	PE	Becton Dickinson
CD132	PE	Becton Dickinson
CD122	PE	Becton Dickinson
IL15R α	PE	eBioscience
Nkp44	PE	Beckman Coulter
Nkp30	PerCP	Beckman Coulter
Nkp46	APC	Beckman Coulter
$\gamma\delta$	PE	Becton Dickinson

2.7 Material für die Zytokinaktivitätsmessung

2.8 Zelllinien

K562	bereits im Labor vorhanden
A204	bereits im Labor vorhanden
RD	bereits im Labor vorhanden
RH30	bereits im Labor vorhanden
Blasten	bereits im Labor vorhanden

3 Methoden

3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) mit Ficoll-Hypaque

3.1.1 Grundlagen:

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque ermöglicht die Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus heparinisiertem, peripherem Vollblut. Die Methode beruht auf den unterschiedlichen Dichteigenschaften der jeweiligen Zellen. Ficoll besitzt eine höhere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, jedoch eine geringere als Erythrozyten und Granulozyten. Nach erfolgter Zentrifugation setzen sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen am Boden des Röhrchens ab, während sich die mononukleären Zellen in der so genannten Interphaseschicht zwischen Ficoll und dem sich darüber befindlichen Serum befinden. Diese Schicht kann abpipettiert werden und die PBMCs stehen für weitere Versuche zur Verfügung. Als Material diente heparinisiertes, peripheres Vollblut freiwilliger Spender.

3.1.2 Durchführung:

- Heparinisiertes Vollblut wird im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. 30-35 ml dieser Mischung werden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig auf 15-20 ml Ficoll-Hypaque aufgeschichtet.
- Die Röhrchen werden bei 400g und 20 C° für 30 min zentrifugiert (Anlaufzeit 100s, Bremse 0).
- Nach erfolgreicher Zentrifugation wird der Überstand mit einer sterilen Pipette abgesaugt. Der aus PBMCs bestehende Ring wird mit einer weiteren sterilen Pipette abgenommen und in ein frisches 50ml-Röhrchen überführt.
- Die abgenommenen PBMCs werden in PBS resuspendiert und anschließend bei 10C° und 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird erneut mit einer

sterilen Pipette abgesaugt, das Zellpellet in MACS Puffer resuspendiert und der gleiche Waschschrift erfolgt ein zweites mal.

- Nach erneuter Abnahme des Überstandes werden die gewonnenen Zellen in zwei 50ml-Röhrchen überführt und mit MACS-Puffer auf 30-35 ml aufgefüllt.
- Zur Bestimmung der Zellzahl werden aus jedem Röhrchen ca. 400 μ l Zellsuspension entnommen und am Zählgerät gezählt, während der Rest ein weiteres mal zentrifugiert wird.
- Die Zellen werden auf 100 Mio/ml eingestellt.

3.2 Zellanreicherung - Magnetized activated cell sorting (MACS)

3.2.1 Grundlagen:

Das „Magnetic activated cell sorting“ (MACS) ermöglicht die Isolierung von Zellen, die zuvor mit immunomagnetischen Substanzen markiert wurden. Das Prinzip beruht auf der Kopplung von Zellen mit kleinen magnetischen Eisenoxid-Partikeln (Microbeads), die sich an definierte Zellepitope binden. Für die Isolierung der NK-Zellen werden CD56⁺-Microbeads verwendet, die sich gegen ein bestimmtes Adhäsionsmolekül, das neural cell adhesion protein (NCAM), richten. Dies ergibt jedoch keine reine Isolierung der NK-Zellen, da auch NKT-Zellen und Subpopulationen von T-Zellen dieses Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Für unsere Zwecke ist diese Methode jedoch ausreichend. Lässt man die angereicherte Zellsuspension durch eine Trennsäule laufen, die mit einer paramagnetische Eisenmatrix gefüllt ist und sich in einem starken Magnetfeld befindet, so bleiben die mit den Microbeads konjugierten Zellen in der Säule hängen, während die nichtmarkierten Zellen (Negativfraktion) durchlaufen. Die Säule wird aus dem Magnetfeld herausgenommen und die konjugierten Zielzellen können als Positivfraktion mit Puffer eluiert und aufgefangen werden.

3.2.2 Durchführung:

- Isolierung der PBMCs wie in Abschnitt 3.1 beschrieben und Einstellen der Zellen auf 100 Mio/ml.

Alles nun Folgende wird auf Eis bei 4°C durchgeführt:

- Inkubation der PBMCs mit Polyglobulin (Flebogamma) im Verhältnis 50 μ l/ml für 10 min, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.

3 Methoden

- Anschließend werden die CD56 Microbeads in einem Verhältnis von 200 μ l pro 10^8 Zellen hinzugegeben und für 30 min auf Eis und dem Schüttler inkubiert.
- Waschen der Zellen mit entgastem MACS- Puffer bei 400g und 10°C für 10 Minuten. Die Entgasung am besten schon am Anfang vornehmen, da sie etwas Zeit (20-30 Min.) in Anspruch nimmt und der Puffer danach wieder abkühlen muss.
- Resuspension der Zellen in ca. 5 ml MACS-Puffer. Die Trennsäule und das MACS System werden installiert und die Säule zwei mal mit je 5 ml Puffer durchspült. Es ist darauf zu achten, dass sie zwischen den einzelnen Schritten nicht trockenläuft.
- Die Zellsuspension auf die Säule geben und vollständig durchlaufen lassen.
- Nachspülen der Säule mit fünf mal 2 ml Puffer um unmarkierte Zellen vollständig zu entfernen.
- Die Säule aus dem Magnet nehmen und auf ein 15 ml Röhrchen aufsetzen. Erneut mit Puffer auffüllen, den Stempel aufsetzen und den Puffer schnell und kräftig durch die Säule drücken. Man hat nun die Positivfraktion mit den gewünschten Zielzellen erhalten.
- Waschen der eluierten Zellen (keine Pufferzugabe nötig) bei 300g und 10°C für 10 Minuten und Resuspension des Zellpellets in ca. 5 ml Medium.

3.3 Zytotoxizitätstest (BATDA-Release-Assay)

3.3.1 Grundlagen

Der BATDA-Release-Assay dient der Untersuchung der quantitativen NK-Zellfunktion und stellt eine Alternative zum klassischen radioaktiven Chromfreisetzungstest dar. Hierbei wird die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber einer bestimmten Zielzellpopulation gemessen, die zuvor mit TDA (2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylid acid), einem fluoreszenzverstärkenden Antikörper, markiert wurden. Hierfür werden die noch lebenden Targetzellen zunächst mit BATDA, der hydrophoben Form von TDA, inkubiert. BATDA diffundiert durch die Zellmembran und wird intrazellulär von Esterasen zu hydrophilem TDA hydrolysiert, welches die Zellmembran nicht mehr passieren kann und sich in den Targetzellen anreichert. Nun folgt die Inkubation der Targetzellen mit den Effektorzellen. Lysierte Targetzellen setzen den hydrophilen, fluoreszenzverstärkenden Liganden TDA frei. Nach Zugabe von Europiumlösung verbindet sich dieser mit Europium zu einem stark fluoreszierenden, stabilen Chelatkomplex (EuTDA), welcher zeitverzögert im Fluorimeter gemessen werden kann. Die Zytotoxizität der Effektorzellen lässt sich als prozentualer Anteil der lysierten Targetzellen, bezogen auf die maximale Anzahl aller ly-

3 Methoden

sierbaren Zellen errechnen. Im Test müssen deshalb folgende Werte zusätzlich bestimmt werden:

Maximallyse: maximal erreichbarer Wert, wenn alle Targetzellen lysiert sind

Spontanlyse: bezeichnet den Wert, der durch die Freisetzung des Liganden von abgestorbenen Targetzellen zustande kommt, ohne den Einfluss von Effektorzellen

Background: wird als Hintergrundkontrolle aus dem Überstand gemessen und zur Berechnung der Maximallyse benötigt

spezifische Lyse: Sie lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{spezifische Lyse in \%} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} * 100$$

3.3.2 Durchführung

Für die Zytotoxizitätstests wurden folgende Targetzellen verwendet:

- erythroleukämische Zelllinie K562
- Rhabdomyosarkomzellen A204
- Rhabdomyosarkomzellen RH30
- Rhabdomyosarkomzellen RD

Für den gesamten Versuchsablauf wird auf 37 °C angewärmtes Medium verwendet.

Markierung der Targetzellen:

- Die Targetzellen werden in einem 15ml Falconröhrchen auf 1Mio/ml eingestellt
- Zugabe des BATDA-Liganden (2,5 µl/ml für K562; 4 µl/ml für Blasten) und Inkubation im Brutschrank für 30 min (K562) bzw. 60 min (Blasten), wobei alle 10 min vorsichtig geschüttelt wird.
- Nach erfolgter Inkubation werden die Zellen mit angewärmtem Medium auf ca. 7 ml aufgefüllt, bei 200g für 5 min abzentrifugiert (300g für 7 min bei Blasten), der Überstand abpipettiert und das Zellpellet resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird insgesamt fünf mal durchgeführt, um den BATDA-Liganden möglichst vollständig aus dem Überstand zu entfernen.
- Im Anschluss an den letzten Waschschrift werden die Zellen in der Neubauerzählkammer gezählt und auf 50000/ml eingestellt (Blasten 200000/ml). Durch Hinzufügen von Trypanblau können tote Zellen in der Neubauerzählkammer identifiziert werden. Ist ihr Anteil sehr hoch, ist mit einer hohen Spontanlyse zu rechnen, so

3 Methoden

dass das Testergebnis evtl. nicht auswertbar ist. Dieser Effekt kann durch Einfügen eines zusätzlichen Waschschrittes vermieden werden.

- Ein Teil der Zellen wird erneut abzentrifugiert und der Überstand als Background verwendet.

Gewinnung der Effektorzellen und Herstellung der Verdünnungsreihe:

Als Effektorzellen dienen NK-Zellen freiwilliger Spender, die am Vortag nach den in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschriebenen Methoden isoliert wurden. Die NK-Zellen wurden anschließend mit Medium auf eine Konzentration von 1 Mio/ml eingestellt und auf 9 Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank mit folgenden zusätzlichen Substanzen inkubiert:

1. Röhrchen: nur NK-Zellen
2. Röhrchen: NK-Zellen + 40 U/ml IL-2
3. Röhrchen: NK-Zellen + 1000 U/ml IL-2
4. Röhrchen: NK-Zellen + 1 ng/ml IL-15
5. Röhrchen: NK-Zellen + 10 ng/ml IL-15
6. Röhrchen: NK-Zellen + 10 µg/ml MGN-3
7. Röhrchen: NK-Zellen + 10 µg/ml MGN-3 + 40 U/ml IL-2
8. Röhrchen: NK-Zellen + 10 µg/ml MGN-3 + 1 ng/ml IL-15

Für den Nachweis der zytotoxischen Eigenschaften werden die Effektorzellen in unterschiedlichen Konzentrationen zu einer gleich bleibenden Anzahl von Targetzellen gegeben, um zu verdeutlichen, dass die gemessene Lyse auf die Zytotoxizität der Effektorzellen zurückzuführen ist. Beim Testansatz werden je 100 µl Effektor- und Targetzellen pro well eingesetzt. Die Zahl der Targetzellen beträgt somit 5000 pro well. Um die E/T-Verhältnisse von 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 zu erreichen, muss, bei einer Ausgangskonzentration der Effektorzellen von 1 Mio/ml, eine 2:1 Verdünnungsreihe über 4 Stufen hergestellt werden. Diese Verdünnungsreihe wird für jedes einzelne der Effektorröhrchen hergestellt.

Testansatz:

Der Testansatz erfolgt in einer Mikrotiterplatte mit 96 Rundboden-Kavitäten (wells). Background, Spontanlyse und Maximallyse werden jeweils vierfach bestimmt, die Proben der Verdünnungsstufen jeweils dreifach.

Background: Es werden 100 µl Targetzell-Überstand (25 µl bei Blasten) und 100 µl Medium (175 µl bei Blasten) angesetzt.

3 Methoden

Spontanlyse: Es werden 100 µl Targetzellen (25 µl bei Blasten) und 100 µl Medium (175 µl bei Blasten) angesetzt.

Maximallyse: Es werden 2 verschiedene Arten der Maximallyse angesetzt: Für den ersten Ansatz werden 100 µl Targetzellen (25 µl bei Blasten) zu 20 µl Lysepuffer und 80 µl Medium (155 µl bei Blasten) gegeben, ein zweiter Ansatz ergibt sich aus 100 µl Ultraschall-zertrümmerter Targetzellen (25 µl bei Blasten) und 100 µl Medium (175 µl bei Blasten).

- Für die Proben der Verdünnungsstufen werden nun in jedes Well 100 µl Targetzellen zu 100 µl Effektorzellen der entsprechenden Stufe pipettiert. Die Platten werden bei 37 °C und 100g für 2 min anzentrifugiert und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.
- Nach erfolgter Inkubation wird bei 37 °C, 200 g und Bremse 3 für 5 min erneut zentrifugiert, da für die Messung nur der aus den lysierten Zellen freigesetzte Überstand benötigt wird.
- In einer Flachbodenplatte wird nun die entsprechende Anzahl an Wells mit je 200 µl Europium-Lösung und je 20 µl Überstand beschickt und der Ansatz unter Lichtabschluss für 20 min auf den Schüttler gestellt.
- Anschließend kann das Ergebnis am Multilabel-Counter gemessen und ausgewertet werden.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie, auch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) genannt, ermöglicht die quantitative Bestimmung von physikalischen und chemischen Zelleigenschaften auf Einzelzellebene. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzellsuspension mit Überdruck in einen dünnen Probenstrahl fokussiert, stark beschleunigt und passieren einzeln einen gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge (hydrodynamische Fokussierung). Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten Antikörper gemessen.

Beim Phänomen der Lichtstreuung spielen Faktoren wie Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit und intrazelluläre Bestandteile eine Rolle. In einem zweidimensionalen Diagramm werden das Vorwärtsstreulicht (Forward Light Scatter = FSC) entlang des einfallenden Lichtstrahls als Maß für die Zellgröße und das dazu senkrecht gestreute Seitwärtsstreu-

3 Methoden

licht (Sideward Light Scatter = SSC) als Maß der intrazellulären Granularität wiedergegeben. Stellt man diese beiden Parameter für Vollblut gegeneinander in einem Koordinatensystem dar, ergibt sich eine charakteristische Aufteilung der Zellen in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten.

Eine immunologische Phänotypisierung der Zellen kann durch Markierung der Zellen mit monoklonalen, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern erfolgen. Durch Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Rücksprung auf ihr Ausgangsniveau emittieren sie ein Photon. Diese Photonenkonzentration kann registriert werden und verhält sich proportional zur Anzahl an Bindungsstellen einer Zelle, die mit Farbstoff-gekoppelten Antikörpern besetzt ist. Die meisten Zellen zeigen auch ohne Anfärbung eine gewisse Autofluoreszenz. Durch Messung einer Kontrollprobe wird vorher festgelegt, ab welcher Fluoreszenzintensität eine Zelle als positiv gilt und die Fluoreszenz somit auf den gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper zurückzuführen ist.

Verwendet man unterschiedlich markierte Antikörper, können mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Hierbei müssen allerdings zwei Voraussetzungen erfüllt sein: die Farbstoffe müssen bei einer bestimmten Wellenlänge gemeinsam anregbar sein und die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima müssen sich deutlich voneinander unterscheiden. So können sie von verschiedenen Detektoren getrennt voneinander in bestimmten Kanälen gemessen werden. Solche FACS Geräte besitzen mehrere Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, sodass sich das Spektrum der gleichzeitig einsetzbaren Farbstoffe deutlich erweitert. Häufig verwendete Farbstoffe sind z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) oder Allophycocyanin (APC).

Das für die Messungen dieser Arbeit verwendete Gerät arbeitet mit zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge und es können bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig verwendet werden.

3.4.2 Durchführung

Immunfluoreszenzfärbung

- Die zu untersuchenden Zellen werden auf 1 Mio/ml eingestellt
- Jeweils 10 µl der fluoreszierenden monoklonalen Antikörper werden in den gewünschten Kombinationen in FACS-Röhrchen vorgelegt.
- In jedes dieser Röhrchen werden 100 µl Zellsuspension pipettiert.
- Die Proben werden geschüttelt (Vortexer) und unter Lichtabschluss 30 min im

3 Methoden

Kühlschrank inkubiert.

- Nach erfolgter Inkubation werden die Röhrrchen mit Stammlösung C aufgefüllt, abzentrifugiert (400g, 10 min, 10 °C) und dekantiert.
- Die gefärbten Zellen werden resuspendiert und unter Lichtabschluss im Kühlschrank bis zur Messung (am besten am selben Tag) aufbewahrt.

Für die in-vitro Versuche wurden Zellen und Antikörper nach folgendem Schema verwendet:

Nach Isolierung der CD56⁺-Zellen der freiwilligen Spendern wurden die Zellen auf 1 Mio/ml eingestellt, auf vier Röhrrchen verteilt und über Nacht im Brutschrank mit folgenden zusätzlichen Substanzen inkubiert:

1. Röhrrchen: CD56⁺-Zellen
2. Röhrrchen: CD56⁺-Zellen + 40 U/ml IL-2
3. Röhrrchen: CD56⁺-Zellen + 10 µg/ml MGN-3
4. Röhrrchen: CD56⁺-Zellen + 40 U/ml IL-2 + 10 µg/ml MGN-3

Am darauf folgenden Tag wurden aus jedem Röhrrchen 4/bzw. 6x100 µl Zellsuspension in je ein FACS-Röhrrchen pipettiert und mit folgenden Antikörpern inkubiert:

Röhrrchen	Zellen	AK1	AK2	AK3	AK4
1	NK	IgG1 FITC	IgG2a PE	IgG2a PerCP	IgG1 APC
2	NK	CD158a FITC	CD158b PE	CD3 PerCP	CD158e APC
3	NK	CD56 FITC	CD16 PE	CD3 Per CP	NKG2D APC
4	NK	CD 94 FITC	NKG2A PE	CD3 PerCP	CD56 APC
5	NK	CD25 FITC	CD226 PE	CD3 Per CP	CD69 APC
6	NK	CD25 FITC	CD122 PE	CD3 Per CP	CD56 APC
7	NK	-	CD132 PE	CD3 Per CP	CD56 APC
8	NK	-	IL15Rα PE	CD3 Per CP	CD56 APC
9	NK+IL-2	CD158a FITC	CD158b PE	CD3 Per CP	CD158e APC
10	NK+IL-2	CD56 FITC	CD16 PE	CD3 Per CP	NKG2D APC
11	NK+IL-2	CD 94 FITC	NKG2A PE	CD3 Per CP	CD56 APC
12	NK+IL-2	CD25 FITC	CD226 PE	CD3 Per CP	CD69 APC
13	NK+MGN-3	CD158a FITC	CD158b PE	CD3 Per CP	CD158e APC
14	NK+MGN-3	CD56 FITC	CD16 PE	CD3 Per CP	NKG2D APC
15	NK+MGN-3	CD 94 FITC	NKG2A PE	CD3 Per CP	CD56 APC
16	NK+MGN-3	CD25 FITC	CD226 PE	CD3 Per CP	CD69 APC

3 Methoden

17	NK+MGN-3	CD25 FITC	CD122 PE	CD3 Per CP	CD56 APC
18	NK+MGN-3	-	CD132 PE	CD3 Per CP	CD56 APC
19	NK+MGN-3	-	IL15R α PE	CD3 Per CP	CD56 APC
20	NK+IL-2+MGN-3	CD158a FITC	CD158b PE	CD3 Per CP	CD158e APC
21	NK+IL-2+MGN-3	CD56 FITC	CD16 PE	CD3 Per CP	NKG2D APC
22	NK+IL-2+MGN-3	CD 94 FITC	NKG2A PE	CD3 Per CP	CD56 APC
23	NK+IL-2+MGN-3	CD25 FITC	CD226 PE	CD3 Per CP	CD69 APC

Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Für diese Arbeit wurde der Durchflusszytometer FACS-Calibur verwendet und die Auswertung mit der zugehörigen Software CellQuest durchgeführt. Ausgehend von Routineeinstellungen werden die genauen Messeinstellungen anhand der Kontrollen durchgeführt:

- Die Verstärkerspannungen für FSC und SSC werden so eingestellt, dass in der Darstellung SSC (y-Achse) gegen FSC (x-Achse) die übliche Zellverteilung zustande kommt. Um die Zielpopulation, die Lymphozyten, kann in dieser Darstellung ein Gate gesetzt werden. So können in einem weiteren Diagramm nur diese Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt werden.
- Anhand der Kontrollfärbungen werden nun die Verstärkerspannungen der verschiedenen Messkanäle so eingestellt, dass sich die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen 10^0 und 10^1 der Fluoreszenzskala befinden.
- Nach der Geräteeinstellung erfolgt die Messung der Proben. Zur Auswertung wird wieder ein Gate auf die Lymphozytenpopulation gesetzt. Diese Zellen werden dann in einem weiteren Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt, wobei immer zwei Kanäle gegeneinander dargestellt werden. Zur statistischen Auswertung wird in dieses Diagramm ein Quadrant gesetzt, so dass Zellen als einfach/doppelt negativ und einfach/doppelt positiv definiert werden können. Die absoluten und relativen Häufigkeiten dieser verschiedenen Zellen werden von der Software automatisch berechnen.

3.5 Zytokinaktivitätsmessung

Die Zytokine wurden mit Hilfe des Bio-Plex Cytokine Assays bestimmt. Dieser Test ermöglicht die quantitative Detektion von Zytokinen. Er verfügt über farbgekoppelte monoklonale Antikörper, die für bestimmte Zytokine spezifisch sind. Diese Antikörper

sind an Polystyrolkugeln (Beads) gekoppelt und reagieren mit Zytokinen aus Zellkulturüberständen. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird von einem biotinylierten sekundären Antikörper in der Mikrotiterplatte detektiert und nach Zugabe von Streptavidin-Phykoerythrin (PE), welches an den sekundären Antikörper bindet, erkannt. Mittels des Bioplex-Suspension-Array Systems, das auf dem durchflusszytometrischen Prinzip basiert, können die Zytokine durch Kugeln-Farbe und -Floureszenz identifiziert und anhand Zytokin-spezifischer Standardreihen quantifiziert werden.

Der Versuch wurde nach Angaben des Herstellers (Bio-Plex Cytokine Assay, BIO-RAD) durchgeführt. Das Serum wurde mit Antikörper-gekoppelten Beads inkubiert, gewaschen, erneut mit biotinylierten-Antikörpern inkubiert, wiederum gewaschen und abschließend mit Streptavidin-Phykoerythrin inkubiert. Die Messung erfolgte mit der zugehörigen Bio-Plex-Software, die die Zytokin-Konzentrationen automatisch anhand von Standardkurven kalkuliert.

3.6 Zellkulturen

Es wurden die Rhabdomyosarkomzelllinien A204, RH30 und RD verwendet, sowie die erythroleukämische Zelllinie K562 als typische NK-sensitive Targetzelle. K562 wurde als Suspensionskulturen in Stammlösung A bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank geführt und alle 2-3 Tage umgesetzt, indem ein Teil des alten Mediums samt Zellen entfernt und durch frisches Medium ersetzt wurde. Der Zustand der Zellen hinsichtlich Proliferation und Vitalität wird mit dem Lichtmikroskop bestimmt, zusätzlich kommt es durch den Stoffwechsel der Zellen und die damit verbundene pH-Wert-Änderung zu einem sichtbaren Farbumschlag der Kultur von rotviolett nach gelb. Bei den anderen drei Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen, die sich bei Proliferation an die Oberfläche des Kulturgefäßes anheften. Bei der Umsetzung muss zunächst das alte Medium komplett entfernt werden und der Zellrasen dann mit 3-4 ml Trypsin bedeckt werden, welches Proteine spaltet und die Zellen so von der Oberfläche löst. Nach ca. 5 min Wartezeit und wiederholtem Klopfen haben sich alle Zellen gelöst, ein Teil kann verworfen und der Rest mit frischem Medium aufgefüllt werden.

3.7 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte entweder vollautomatisch mit einem Zählgerät (Advia) oder mit Hilfe der Neubauerzählkammer. Hierbei wird die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt, in die Zählkammer gefüllt und die Zellen von

vier Quadraten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Dabei kann die Vitalität der Zellen beurteilt werden, da tote Zellen aufgrund des Integritätsverlustes ihrer Membranbarriere mit Trypanblau angefärbt werden und als schwarz-blaue Punkte erscheinen.

3.8 In-vivo Versuche mit gesunden freiwilligen Spendern

Zusätzlich zur in-vitro Versuchsreihe wurde Biobran an 10 freiwilligen gesunden Spendern in-vivo getestet, um herauszufinden, ob sich auch hier Effekte zeigen. Die 10 Probanden nahmen Biobran über einen Zeitraum von 2 Wochen drei mal pro Tag vor den Mahlzeiten in einer Dosierung von 1000mg ein. Es wurden jeweils Zytotoxizitätstests, Zytokinaktivitätsmessungen und FACS-Analysen vorgenommen. Als Ausgangswert diente eine Versuchsreihe vor Beginn der Einnahme von Biobran. Die Versuche wurden nach einer und nach zwei Wochen Einnahme von Biobran wiederholt, sowie zwei Wochen nach Absetzen des Nahrungsergänzungspräparates.

Bei der Blutentnahme wurde zusätzlich zu einer heparinisierten 50ml Spritze noch Blut in ein Serumröhrchen abgefüllt, um aus dem Überstand die Zytokinaktivität zu bestimmen. Des Weiteren wurde von jedem Probanden bei jeder Blutentnahme ein Differentialblutbild aus Vollblut erstellt, damit später absolute und relative Zellzahlbestimmungen erfolgen konnten.

Die darauf folgende Isolierung der PBMCs verlief nach dem gleichen Schema wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben.

Ein Teil der PBMCs wurde für FACS-Messungen verwendet. So konnte ein eventuell vorhandener Effekt durch Biobran auch an T-Zellen untersucht werden. Die restlichen PBMCs wurden mit Hilfe des MACS-Systems (siehe 3.2) getrennt und man erhielt die gewünschten CD56⁺- Zellen.

Die restlichen Zellen wurden zur Hälfte ohne, zur Hälfte mit 40 U/ml IL-2 über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag erneut mit Hilfe von FACS-Messungen analysiert und die NK-Zellfunktion mit einem Zytotoxizitätstest bestimmt.

Zytotoxizitätstest

Der Zytotoxizitätstest wurde wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben durchgeführt. Als Targetzellen dienten die Zelllinien K562, A204, sowie cALL Blasten eines Patienten.

3 Methoden

FACS

Bei den in-vivo-Versuchen wurden nicht die CD56⁺-Zellen untersucht, sondern bereits die PBMCs verwendet, so dass auch T-Zellen der Analyse zugeführt wurden. Antikörper wurden dabei nach folgendem Schema verwendet:

Röhrchen	AK1	AK2	AK3	AK4
1	IgG1 FITC	IgG2 PE	IgG2 PerCP	IgG1 APC
2	CD158b FITC	CD158a PE	CD3 PerCP	CD158e APC
3	CD56 FITC	CD16 PE	CD3 PerCP	NKG2D APC
4	CD94 FITC	NKG2A PE	CD3 PerCP	CD56 APC
5	CD25 FITC	CD226 PE	CD3 PerCP	CD56 APC
6	CD56 FITC	$\gamma\delta$ PE	CD3 PerCP	CD69 APC
7	CD56 FITC	Nkp44 PE	Nkp30 PerCP	Nkp46 APC

Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit 40 U/ml IL2 über Nacht inkubiert und die Zellen der Röhrchen 1, 5 und 6 am nächsten Tag erneut mit einer FACS-Messung analysiert.

3.9 Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism verwendet. Alle Versuchsreihen wurden mit Hilfe gepaarter t-Tests verglichen und auf signifikante Unterschiede überprüft, wobei das Signifikanzniveau mit $p=0,05$ festgelegt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 In-vitro Versuchsreihe

4.1.1 Isolierung CD56⁺- Zellen

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen mussten diese zunächst angereichert werden. Dies geschah durch Isolierung der PBMCs mit Hilfe der Ficoll-Dichtezentrifugation aus peripherem freiwilligem Spenderblut sowie anschließender Anreicherung der CD56⁺-Zellen mit dem MACS-System. Nach diesem Schritt waren in der angereicherten Zellsuspension neben NK-Zellen auch die ebenfalls für das Oberflächenantigen CD56 positiven natürlichen-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) enthalten. Auf eine weitere Depletion mit Hilfe von magnetischen CD3⁺Antikörpern wurde bewusst verzichtet, damit in der erfolgten FACS-Analyse sowohl NK- als auch NKT-Zellen auf Veränderungen ihrer Oberflächenantigene untersucht werden konnten. Die Methode der Zellseparierung mit Hilfe des MACS-Systems wurde als hinreichend etabliert angesehen.

4.1.2 Zytotoxizitätstests

Die angereicherten CD56⁺-Zellen wurden bei den in-vitro Versuchen über Nacht mit IL-2 und MGN-3 nach in Abschnitt 3.3 beschriebenem Schema inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die zytotoxische Aktivität der verschiedenen stimulierten Zellen mit Hilfe des BATDA-Release-Assay untersucht. Als Targetzellen dienten die erythroleukämische Zelllinie K562, als typische NK-sensitive Zelllinie, sowie die drei Rhabdomyosarkomzelllinien A204, RH30 und RD. Ziel war es, vor allem herauszufinden, ob sich die zytotoxische Potenz von NK-Zellen durch Biobran alleine, sowie durch Kombination von Biobran und IL-2 steigern lässt. Für die statistische Berechnung wurden gepaarte t-Tests verwendet, das Signifikanzniveau α bei 0,05 festgelegt. Bei den Versuchen wurden teilweise bei den stimulierten NK-Zellen höhere Lyseraten erzielt, als bei den Versuchsansätzen zur Maximallyse, sodass der höchste Wert als 100% angesetzt und alle anderen entsprechend umgerechnet werden mussten. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen und Schaubildern dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1.2.1 Zytotoxische Aktivität gegen K562

In die Auswertung einbezogen wurden 6 gesunde freiwillige Spender. Die Spontanlyseraten der Zytotoxizitätstests lagen zwischen 8,1 und 28,6%. Die Versuche wurden alle mit den 4 Effektor-Target-Verhältnissen 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 durchgeführt.

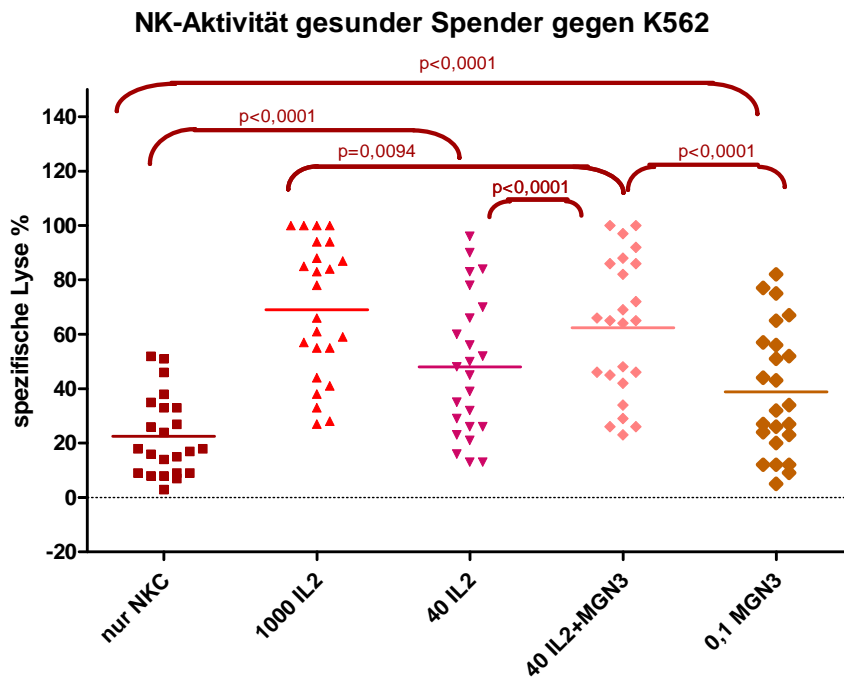


Abbildung 4.1: Darstellung der NK-Zell-Aktivität 6 gesunder Spender gegen K562, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse. Zusammenfassung aller E:T-Verhältnisse.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der NK-Zellaktivität 6 gesunder Spender, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse, gegen K562 - Mittelwerte und Standardabweichungen.

E:T		20:1	10:1	5:1	2,5:1
NKC	Mean	37	30	17	8
	SD	19	13	6	3
1000 U/ml IL2	Mean	97	82	60	38
	SD	6	14	12	11
40 U/ml IL2	Mean	76	59	37	20
	SD	17	18	14	7
40 U/ml IL2 + 0,1 mg/dl MGN3	Mean	94	74	52	30
	SD	7	9	10	7
0,1 mg/dl MGN3	Mean	62	46	30	17
	SD	22	20	13	9

4 Ergebnisse

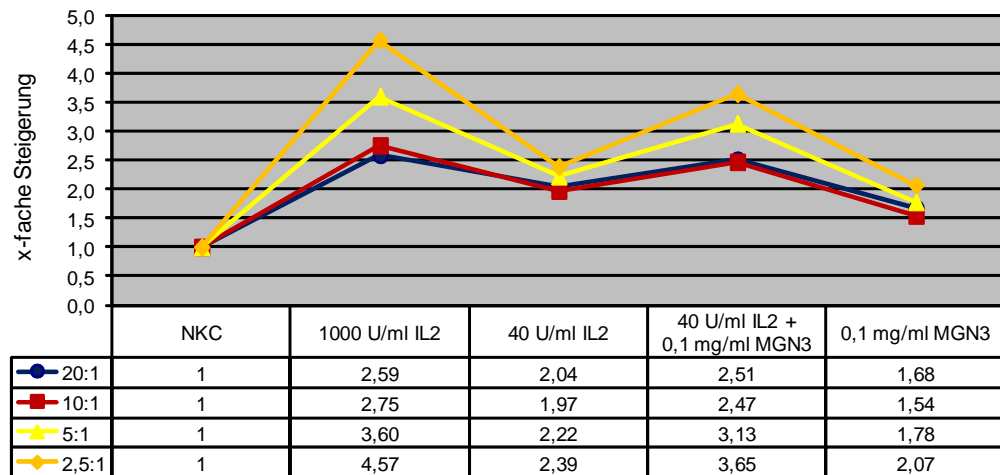


Abbildung 4.2: Darstellung der x-fachen Steigerung der Zytotoxizität stimulierter NK-Zellen gegen K562. Als Ausgangswert dienen die Werte aus den Zytotoxizitätstest der unstimulierten NK-Zellen.

Wie aus den Schaubildern 4.1, 4.2 und der Tabelle 4.1 ersichtlich ist, unterscheiden sich die zytotoxischen Potentiale von unstimulierten NK-Zellen und stimulierten NK-Zellen gegen K562 deutlich. Die höchsten Lyseraten wurden im Ansatz der mit 1000 U/ml IL-2 stimulierten Zellen erreicht. Es ist deutlich sichtbar, dass Biobran die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen signifikant steigert und in Kombination mit geringen Mengen IL-2 ein Summationseffekt auftritt und die Werte sogar nahe an Ergebnisse der mit 1000 U/ml IL-2 stimulierten NK-Zellen heranreichen. Aus dem Schaubild 4.2 ist ersichtlich, dass die Werte der niederen E:T-Verhältnisse deutlichere Unterschiede der zytotoxischen Aktivität aufweisen als die 20:1 und 10:1 Verhältnisse. Grund hierfür könnte sein, dass das Killing bei einem hohen E:T-Verhältnis oft auch schon bei unstimulierten NK-Zellen Werte zwischen 80 und 100% annahm und eine Steigerung somit kaum möglich war.

4 Ergebnisse

4.1.2.2 Zytotoxische Aktivität gegen A204

In die Auswertung einbezogen wurden 11 gesunde freiwillige Spender. Die Spontanlyse-raten der Zytotoxizitätstests lagen zwischen 6,0 und 20,2%. Die Versuche wurden alle mit den 4 Effektor-Target-Verhältnissen 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 durchgeführt.

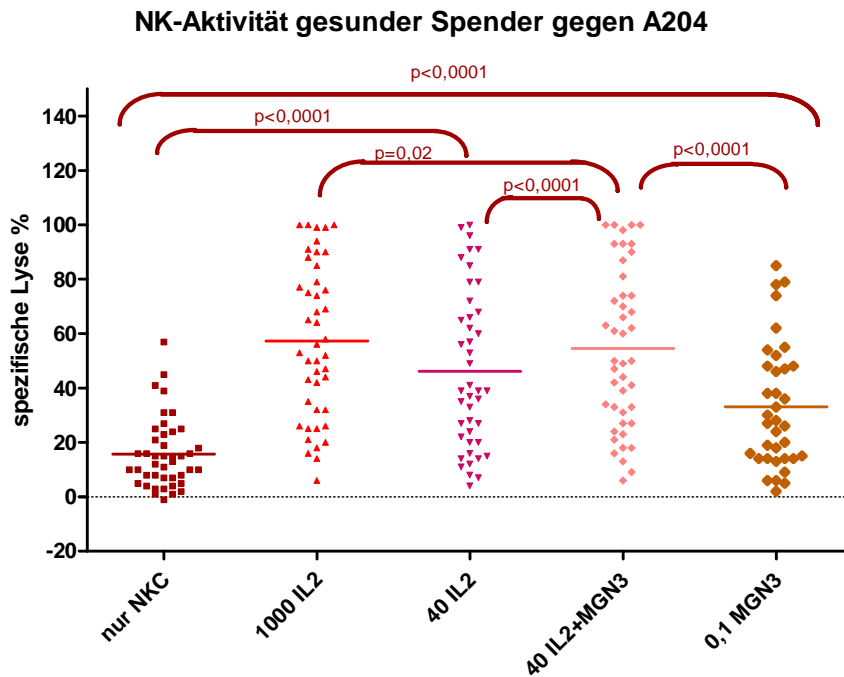


Abbildung 4.3: Darstellung der NK-Zell-Aktivität 11 gesunder Spender gegen A204, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse. Zusammenfassung aller E:T-Verhältnisse.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests von NK-Zellen gesunder Spender, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse, gegen A204 - Mittelwerte und Standardabweichungen.

E:T		20:1	10:1	5:1	2,5:1
NKC	Mean	27	18	13	6
	SD	16	11	8	5
1000 U/ml IL2	Mean	86	67	50	27
	SD	20	21	21	13
40 U/ml IL2	Mean	74	53	35	19
	SD	25	26	21	13
40 U/ml IL2 + 0,1 mg/dl MGN3	Mean	86	63	42	26
	SD	22	24	17	13
0,1 mg/dl MGN3	Mean	54	34	22	10
	SD	25	17	12	6

4 Ergebnisse

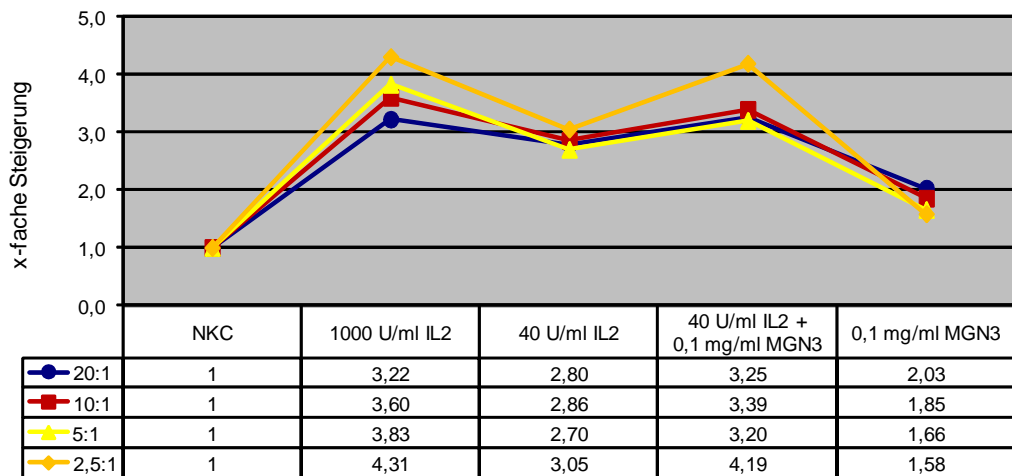


Abbildung 4.4: Darstellung der x-fachen Steigerung der Zytotoxizität stimulierter NK-Zellen gegen A204. Als Ausgangswert dienen die Werte aus den Zytotoxizitätstest der unstimulierten NK-Zellen.

Auch hier sind in den Schaubildern 4.3, 4.4 und der Tabelle 4.2 deutliche Unterschiede der zytotoxischen Potentiale zwischen stimulierten NK-Zellen und angereicherten NK-Zellen sichtbar. Die höchsten Lyseraten wurden wiederum in der Fraktion mit 1000 U/ml IL-2 stimulierten Zellen erreicht. Signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten NK-Zellen sind sowohl bei Zugabe von 40 U/ml IL-2 als auch bei Biobran sichtbar. Außerdem unterscheiden sich die zytotoxischen Potentiale dieser Zellen signifikant von denen, die mit einer Kombination von beiden stimuliert wurden. Diese Werte erreichen auch hier nahezu die Werte der mit 1000 U/ml IL-2 stimulierten Zellen. Nicht einheitlich zu beobachten ist der Trend, dass kleine E:T-Verhältnisse zu größeren Unterschieden der zytotoxischen Potentiale führen, wie das bei den Zytotoxizitätstests gegen K562 der Fall ist. Allerdings war auch hier das Killing oftmals schon bei unstimulierten NK-Zellen so hoch, dass eine weitere Steigerung nicht möglich war.

4 Ergebnisse

4.1.2.3 Zytotoxische Aktivität gegen RH30

In die Auswertung einbezogen wurden 15 gesunde freiwillige Spender. Die Spontanlyse-raten der Zytotoxizitätstests lagen zwischen 9,8 und 24,2%. Die Versuche wurden alle mit den 4 Effektor-Target-Verhältnissen 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 durchgeführt.

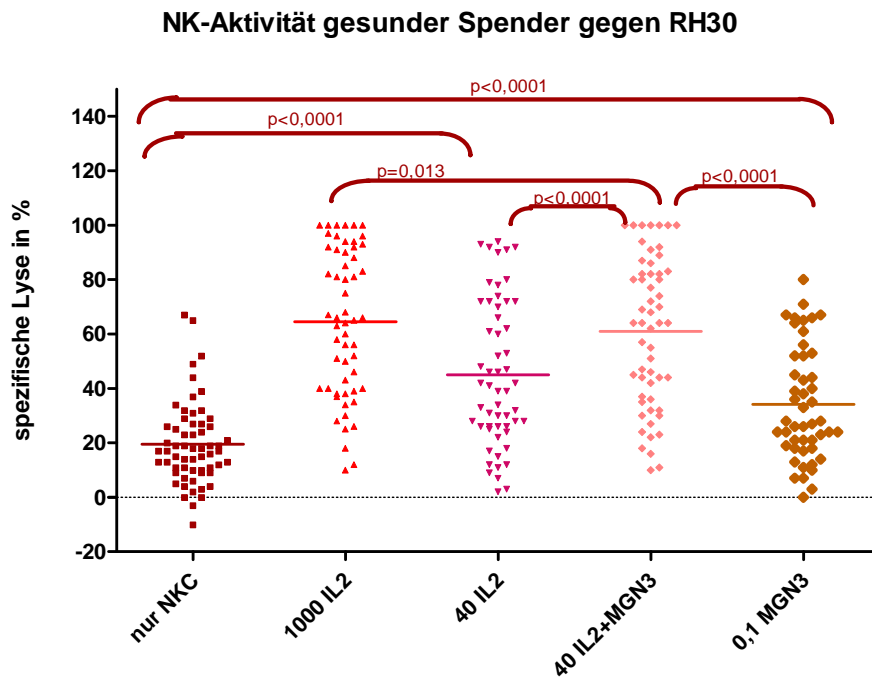


Abbildung 4.5: Darstellung der NK-Zell-Aktivität 15 gesunder Spender gegen RH30, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse. Zusammenfassung aller E:T-Verhältnisse.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests von NK-Zellen gesunder Spender, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse, gegen RH30 - Mittelwerte und Standardabweichungen.

E:T		20:1	10:1	5:1	2,5:1
NKC	Mean	33	22	15	8
	SD	18	12	9	7
1000 U/ml IL2	Mean	94	78	53	32
	SD	8	16	13	13
40 U/ml IL2	Mean	74	52	35	18
	SD	20	20	16	11
40 U/ml IL2 + 0,1 mg/dl MGN3	Mean	92	75	50	27
	SD	10	15	13	11
0,1 mg/dl MGN3	Mean	55	38	23	11
	SD	16	15	8	9

4 Ergebnisse

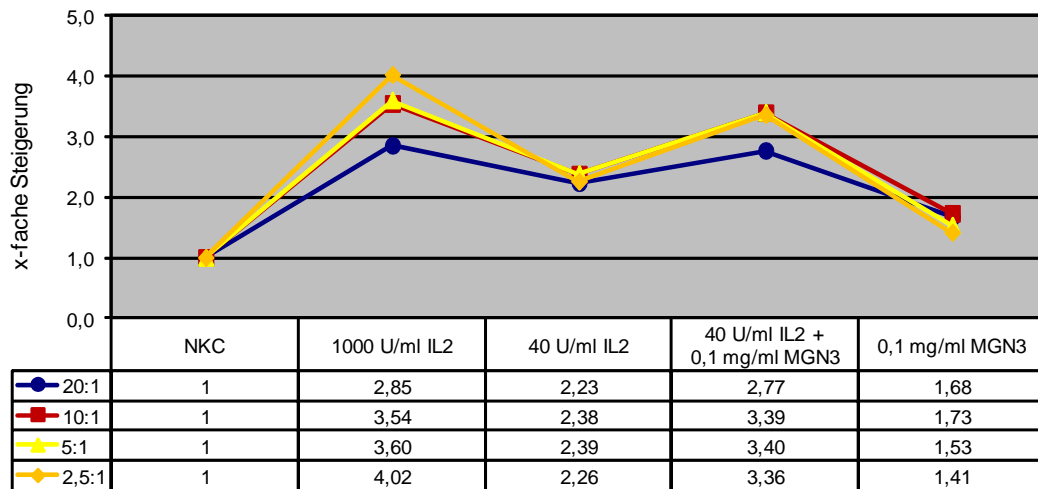


Abbildung 4.6: Darstellung der x-fachen Steigerung der Zytotoxizität stimulierter NK-Zellen gegen RH30. Als Ausgangswert dienen die Werte aus den Zytotoxizitätstest der unstimulierten NK-Zellen.

Aus den Schaubildern 4.5, 4.6 und der Tabelle 4.3 sind auch hier signifikante Unterschiede der zytotoxischen Potentiale zwischen unstimulierten und stimulierten NK-Zellen gegen RH30 ersichtlich. Ebenso erreichten die mit 1000 U/ml IL-2 stimulierten Zellen die höchsten Lyseraten und signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten NK-Zellen sind sowohl bei Zugabe von 40 U/ml IL-2 als auch bei Biobran erkenntlich. Ein deutlicher Summationseffekt bei Stimulation der NK-Zellen mit beiden Substanzen tritt ebenfalls auf. Ähnlich wie bei den Ergebnissen gegen K562 geht aus Abbildung 4.6 hervor, dass eine höhere Steigerung bei kleineren E:T-Verhältnissen erreicht werden kann, da bei einem Verhältnis von 20:1 bereits maximal mögliche Lyseraten erzielt wurden.

4 Ergebnisse

4.1.2.4 Zytotoxische Aktivität gegen RD

In die Auswertung einbezogen wurden 15 gesunde freiwillige Spender. Die Spontanlyse-raten der Zytotoxizitätstests lagen zwischen 6,2 und 43%. Die Versuche wurden alle mit den 4 Effektor-Target-Verhältnissen 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 durchgeführt.

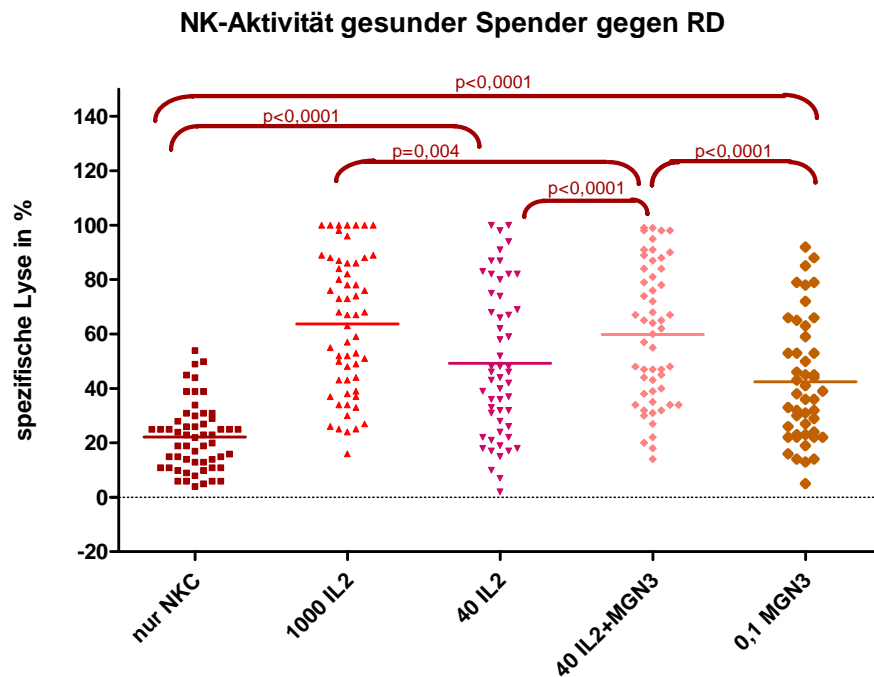


Abbildung 4.7: Darstellung der NK-Zell-Aktivität 15 gesunder Spender gegen RD, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse. Zusammenfassung aller E:T-Verhältnisse.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests von NK-Zellen gesunder Spender, angegeben in Prozent der spezifischen Lyse, gegen RD - Mittelwerte und Standardabweichungen.

E:T		20:1	10:1	5:1	2,5:1
NKC	Mean	35	24	16	11
	SD	12	9	7	4
1000 U/ml IL2	Mean	91	74	54	33
	SD	13	15	11	10
40 U/ml IL2	Mean	78	56	39	21
	SD	22	20	16	12
40 U/ml IL2 + 0,1 mg/dl MGN3	Mean	86	70	51	29
	SD	14	18	13	9
0,1 mg/dl MGN3	Mean	65	45	28	20
	SD	20	14	10	7

4 Ergebnisse

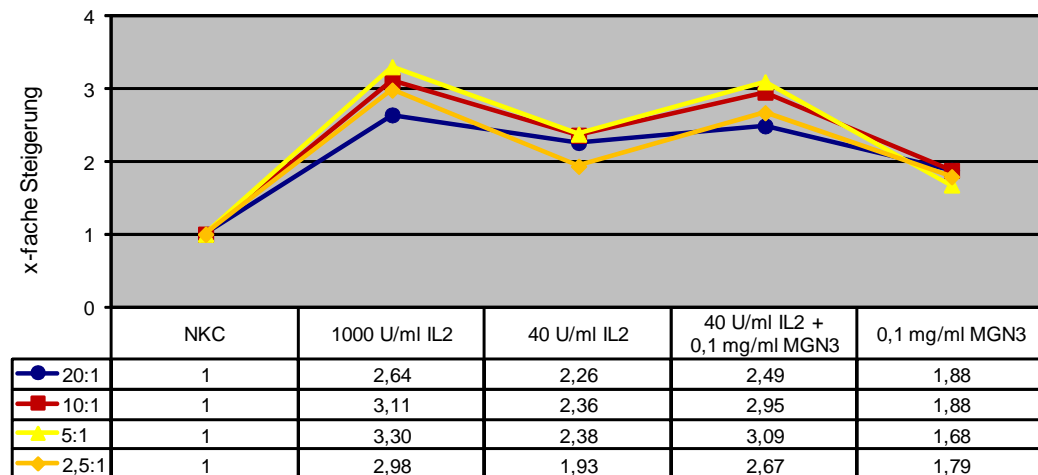


Abbildung 4.8: Darstellung der x-fachen Steigerung der Zytotoxizität stimulierter NK-Zellen gegen RD. Als Ausgangswert dienen die Werte aus den Zytotoxizitätstest der unstimulierten NK-Zellen.

Wie bereits in den vorhergegangenen Versuchsreihen unterscheiden sich die zytotoxischen Potentiale von reinen NK-Zellen und stimulierten NK-Zellen auch gegen RD deutlich, sichtbar anhand der Schaubilder 4.7 und 4.8 sowie der Tabelle 4.4. Die höchsten Lyseraten wurden in der Fraktion mit 1000 U/ml IL-2 stimulierten Zellen erreicht. Eine signifikante Steigerung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen durch Biobran, sowie ein Summationseffekt bei zusätzlicher Stimulation mit IL-2 konnte beobachtet werden. Auch hier reichen die Werte fast an die Ergebnisse der mit 1000 U/ml IL-2 stimulierten NK-Zellen heran. Bei dieser Versuchsreihe nicht so eindeutig sichtbar wie bei den anderen ist jedoch der Trend, dass niedrigere E:T-Verhältnisse eine höhere Steigerung der zytotoxischen Potentiale ermöglichen.

4.1.3 FACS-Analysen

Um mögliche Ursachen und Einflussfaktoren der Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität durch IL-2 und MGN-3 herauszufinden, wurden die Zellen einzelner Spender einer FACS-Analyse unterzogen. Dabei wurden die Zellen mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten AK inkubiert, die mit einer möglichen Steigerung bzw. Hemmung der NK-Zellaktivität einhergehen. Das genaue Schema ist Abschnitt 3.4 zu entnehmen.

Untersucht wurden unbehandelte Zellen sowie mit IL-2, MGN-3 und einer Kombination aus beiden Reagenzien stimulierte Zellen. Ausgewertet wurden sowohl die relative Anzahl an Zellen, die für das entsprechende Antigen positiv waren, als auch, mit Hilfe

4 Ergebnisse

der Fluoreszenzintensität, die Expressionsdichte der Antigene auf den einzelnen Zellen. Signifikante Unterschiede waren nur in wenigen ausgesuchten Fällen zu beobachten, v.a. bei CD25, CD69 und NKG2A/CD94.

4.1.3.1 CD25

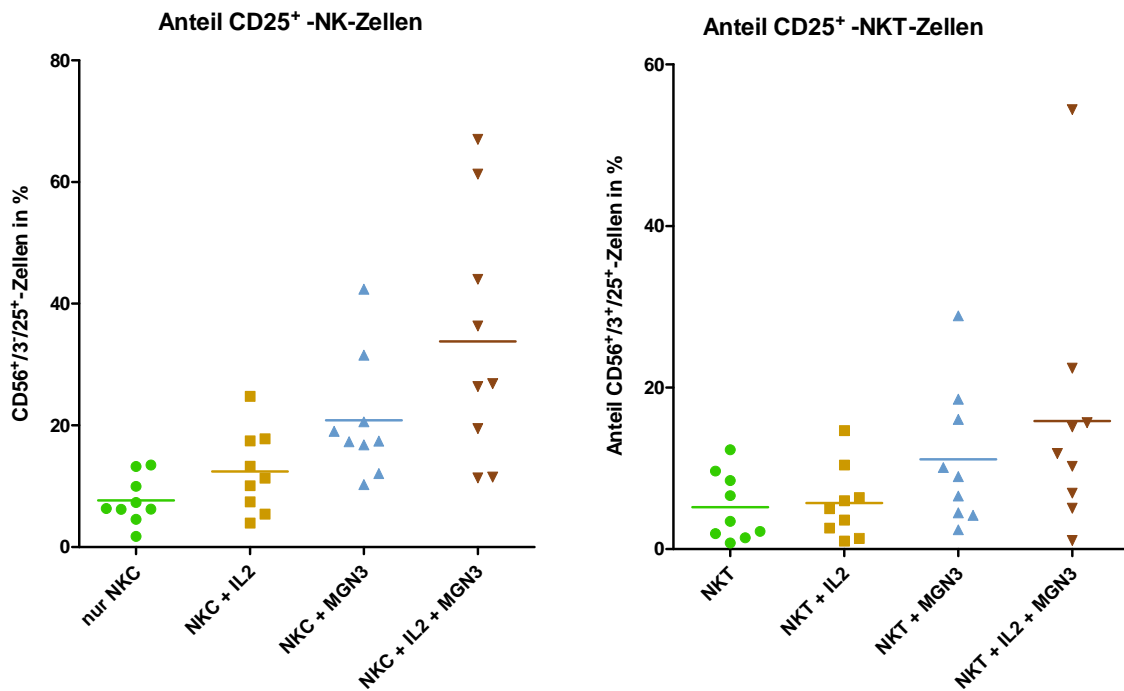


Abbildung 4.9: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 9 gesunden Spendern. Anteil der CD25⁺-NK- und NKT-Zellen, angegeben in Prozent aller gatedeten Zellen.

Tabelle 4.5: P-Werte der FACS-Analysen der CD25⁺-Zellen insgesamt, sowie der CD25⁺-NK- und NKT-Zellen im Vergleich. Verwendet wurden unstimulierte, mit IL-2, MGN-3 und einer Kombination aus beiden Substanzen stimulierte Zellen.

Zellen	ohne vs. IL-2	ohne vs. MGN3	ohne vs. IL-2+MGN-3	IL-2 vs. IL-2+MGN-3	MGN-3 vs. IL-2+MGN-3
CD25 ⁺	0,0439	0,0021	0,0055	0,0051	0,0815
CD56 ⁺ /CD3 ⁻ /CD25 ⁺	0,0536	0,0023	0,0033	0,003	0,0655
CD56 ⁺ /CD3 ⁺ /CD25 ⁺	0,6073	0,0141	0,0533	0,0342	0,2097

4 Ergebnisse

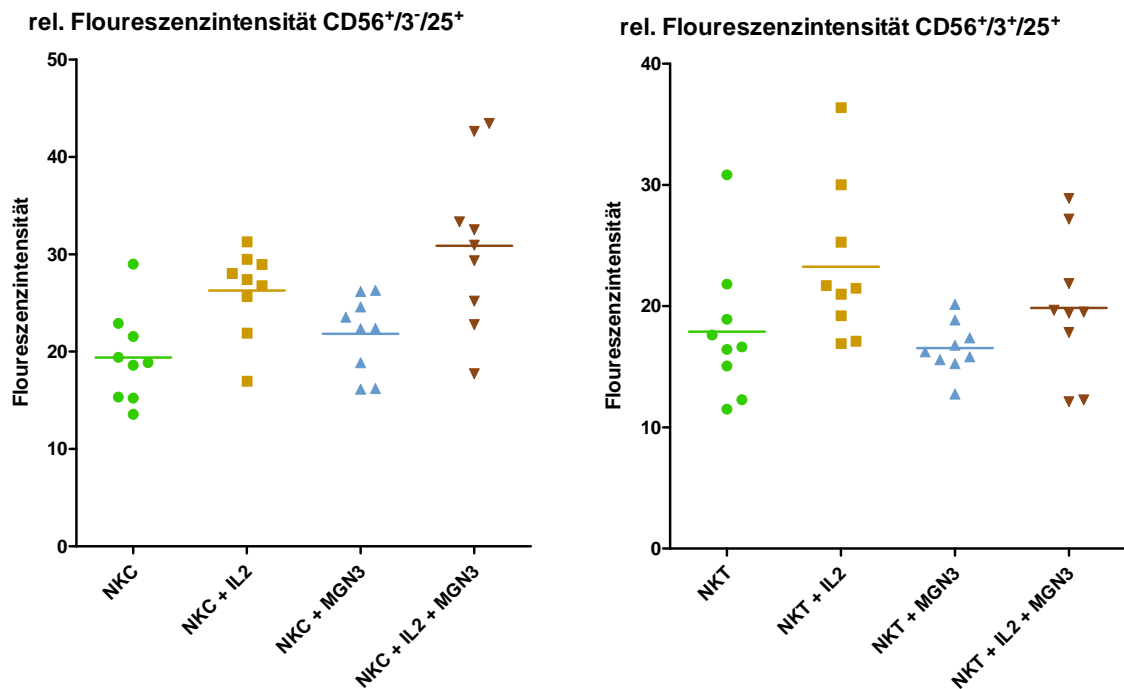


Abbildung 4.10: Rel. Fluoreszenzintensitäten der CD25⁺-NK- und NKT-Zellen aus den FACS-Analysen von 9 gesunden Spendern.

Tabelle 4.6: P-Werte der rel. Fluoreszenzintensitäten von CD25⁺-NK- und NKT-Zellen im Vergleich

Zellen	ohne vs. IL-2	ohne vs. MGN3	ohne vs. IL-2+MGN-3	IL-2 vs. IL-2+MGN-3	MGN-3 vs. IL-2+MGN-3
CD56 ⁺ /CD3 ⁻ /CD25 ⁺	0,0032	0,1849	0,0075	0,0338	0,0017
CD56 ⁺ /CD3 ⁺ /CD25 ⁺	0,1032	0,5210	0,5081	0,0550	0,0323

Bei **CD25** handelt es sich um die α -Kette des IL-2-Rezeptors. Dieses Oberflächenmolekül wird von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert. Es ist eine deutliche Steigerung von CD25⁺-Zellen durch IL-2 von 6,6% auf 10,1%, durch Biobran auf 17,2% und durch die Kombination beider auf 26,2% sichtbar. Wie man der Abbildung 4.9 entnehmen kann, war diese bei NK-Zellen ausgeprägter als bei NKT-Zellen. Hier stieg der Anteil der CD25 exprimierenden Zellen von 7,7% (NKT: 5,2%) auf 12,4% (NKT: 5,7%), durch IL-2 Zugabe auf 20,8% (NKT: 11,1%), unter Biobran-Einfluss und auf 33,80% (NKT: 15,9%) bei Stimulation mit beiden Substanzen. Sowohl CD25⁺-Zellen insgesamt, als auch CD25⁺-NK- und NKT-Zellen einzeln betrachtet, ließen sich durch Biobran-Stimulation somit signifikant steigern und durch zusätzliche Inkubation mit IL-2 war ein Trend zu noch höheren Werten zu sichtbar (vgl. Tabelle 4.5). Die Expressionsdichte der CD25-Rezeptoren an der Zelloberfläche der einzelnen Zellen ließ sich nicht in dem

4 Ergebnisse

gleichen Maße steigern, wie die Zellanzahl. In beiden Fällen ist durch IL-2 eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität sichtbar, bei NK-Zellen von 19,4 auf 26,3 und bei NKT-Zellen von 17,9 auf 23,3. MGN-3 alleine hatte jedoch keinen sichtbaren Effekt auf die Expressionsdichte. Durch Stimulation mit beiden Substanzen konnte die CD25-Expression bei NK-Zellen jedoch noch einmal signifikant gesteigert werden.

4.1.3.2 CD69

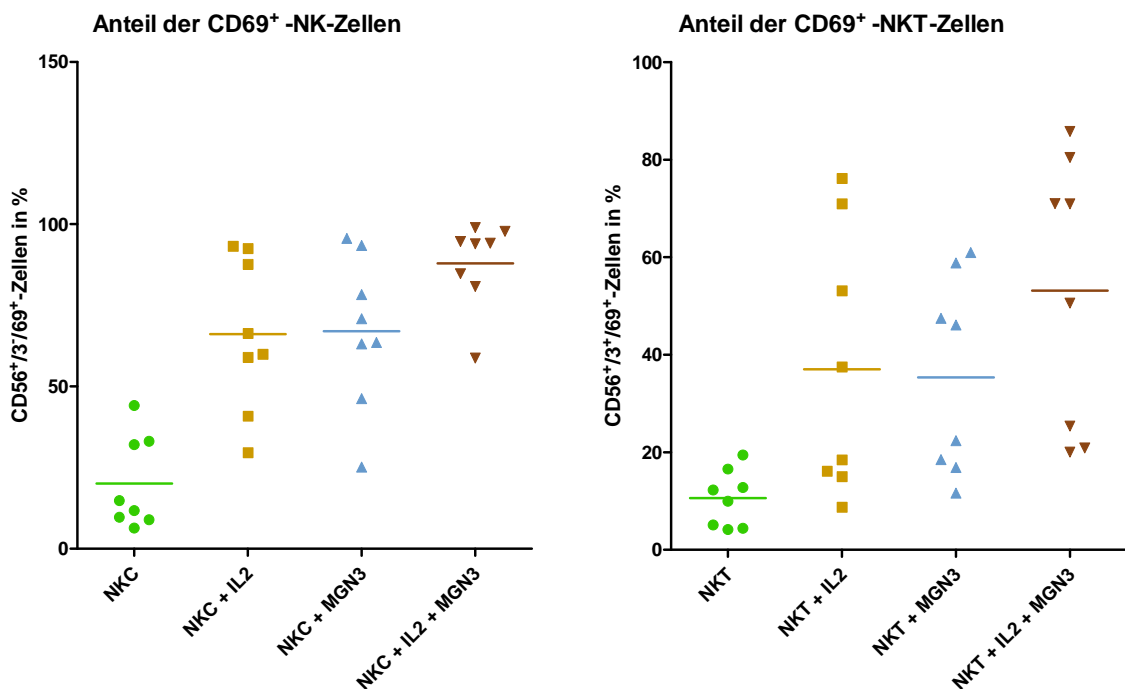


Abbildung 4.11: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 8 gesunden Spendern. Anteil der CD69⁺-NK- und NKT-Zellen, angegeben in Prozent aller gateden Zellen.

Tabelle 4.7: P-Werte der FACS-Analysen der CD69⁺-Zellen insgesamt, sowie der CD69⁺-NK- und NKT-Zellen im Vergleich.

Zellen	ohne vs. IL-2	ohne vs. MGN3	ohne vs. IL-2+MGN-3	IL-2 vs. IL-2+MGN-3	MGN-3 vs. IL-2+MGN-3
CD69 ⁺	0,0022	0,0023	< 0,0001	0,0094	0,0003
CD56 ⁺ /CD3 ⁻ /CD69 ⁺	0,0009	0,0014	< 0,0001	0,0068	0,0020
CD56 ⁺ /CD3 ⁺ /CD69 ⁺	0,0148	0,0072	0,0018	0,0198	0,0036

4 Ergebnisse

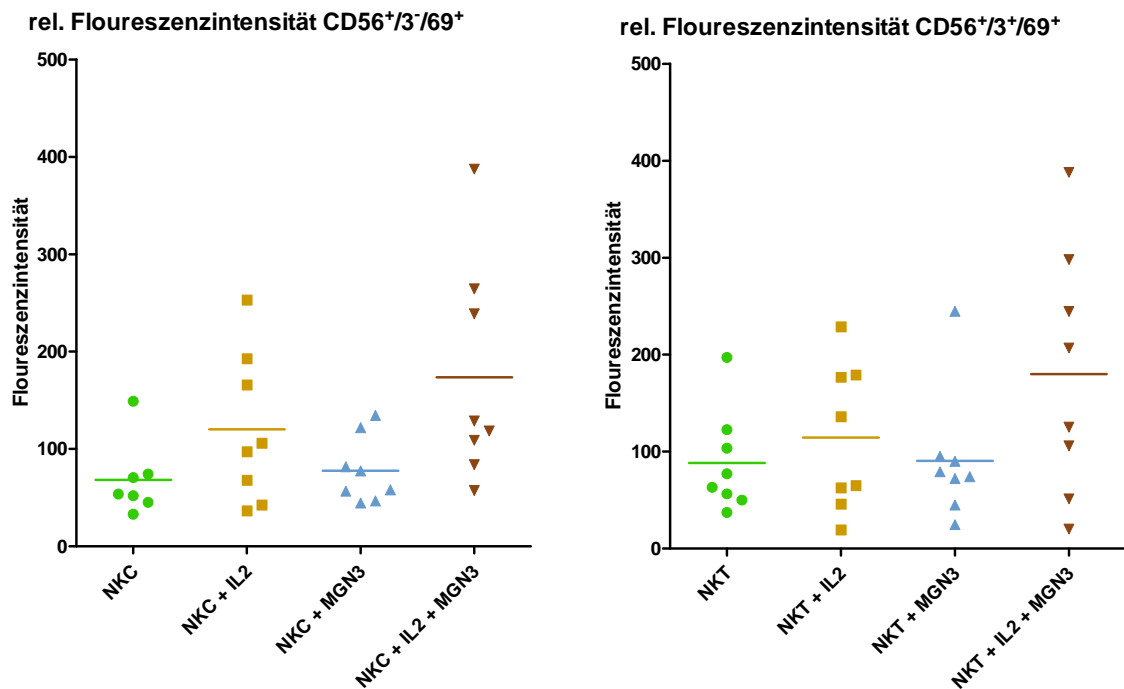


Abbildung 4.12: Rel. Fluoreszenzintensitäten der CD69⁺-NK- und NKT-Zellen aus den FACS-Analysen von 8 gesunden Spendern.

Tabelle 4.8: P-Werte der rel. Fluoreszenzintensitäten von CD69⁺-NK- und NKT-Zellen im Vergleich

Zellen	ohne vs. IL-2	ohne vs. MGN3	ohne vs. IL-2+MGN-3	IL-2 vs. IL-2+MGN-3
CD56 ⁺ /CD3 ⁻ /CD69 ⁺	0,0550	0,3019	0,0303	0,0704
CD56 ⁺ /CD3 ⁺ /CD69 ⁺	0,0435	0,1089	0,0108	0,0290

CD69 ist ein unbekanntes frühes Aktivierungsantigen, das von aktivierten T- und B-Zellen, sowie aktivierten Makrophagen und NK-Zellen exprimiert wird. Aus Abbildung 4.11 und Tabelle 4.7 sind signifikante Steigerungen der CD69⁺-Zellen insgesamt, sowie der CD69⁺-NK- und NKT-Zellen ausnahmslos bei allen Probanden durch Zugabe von IL-2, MGN-3 und deren Kombination sichtbar. Generell war die Anzahl an positiven CD69 NKT-Zellen geringer als die der NK-Zellen, jedoch war bei beiden sowohl durch IL-2 als auch durch MGN-3 eine dreifache Steigerung zu beobachten. Diese konnte durch kombinierte Inkubation zusätzlich auf Werte von durchschnittlich 88% für NK-Zellen und 56% für NKT-Zellen gesteigert werden. Auch bei der Fluoreszenzintensität ist ein deutlicher Anstieg bei allen Probanden zu höheren Werten unter IL-2 sichtbar (NK: von 68,4 auf 120,3; NKT: von 83,5 auf 114,2). Durch Biobran alleine nahm die Expressionsdichte nur minimal zu (NK: 77,8; NKT: 90,6). Bei Kombination trat ein Summationseffekt auf

4 Ergebnisse

und die Werte steigerten sich bei allen Probanden auf Durchschnittswerte von 173,5 bei NK-Zellen und 180 bei NKT-Zellen.

4.1.3.3 NKG2A/CD94

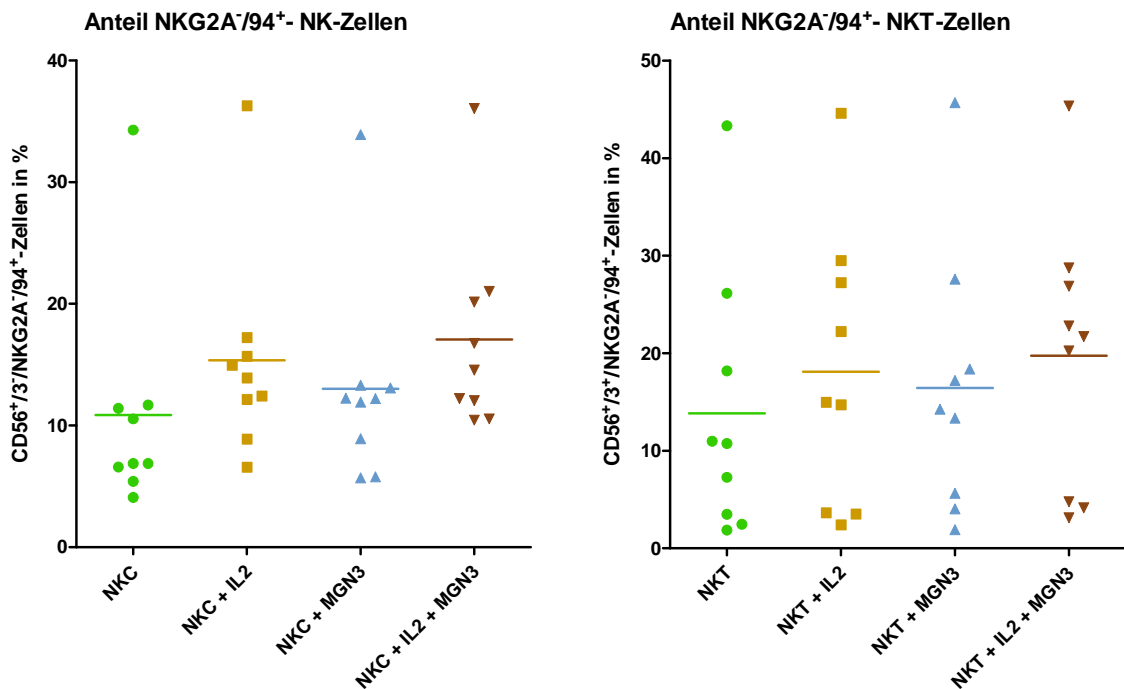


Abbildung 4.13: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 9 gesunden Spendern. Anteil der NKG2A⁻/94⁺-NK- und NKT-Zellen, angegeben in Prozent aller gegateten Zellen.

Tabelle 4.9: P-Werte der FACS-Analysen der NKG2A⁺/94⁻-Zellen insgesamt, sowie der NKG2A⁺/94⁻-NK- und NKT-Zellen im Vergleich.

Zellen	ohne vs. IL-2	ohne vs. MGN3	ohne vs. IL-2+MGN-3	IL-2 vs. IL-2+MGN-3	MGN-3 vs. IL-2+MGN-3
NKG2A ⁻ /CD94 ⁺	0,0198	0,1311	0,0086	0,0056	0,0029
CD56 ⁺ /CD3 ⁻ /NKG2A ⁻ /CD94 ⁺	0,0035	0,0457	0,0033	0,0404	0,0021
CD56 ⁺ /CD3 ⁺ /NKG2A ⁻ /CD94 ⁺	0,0239	0,0131	0,0083	0,1176	0,0293

4 Ergebnisse

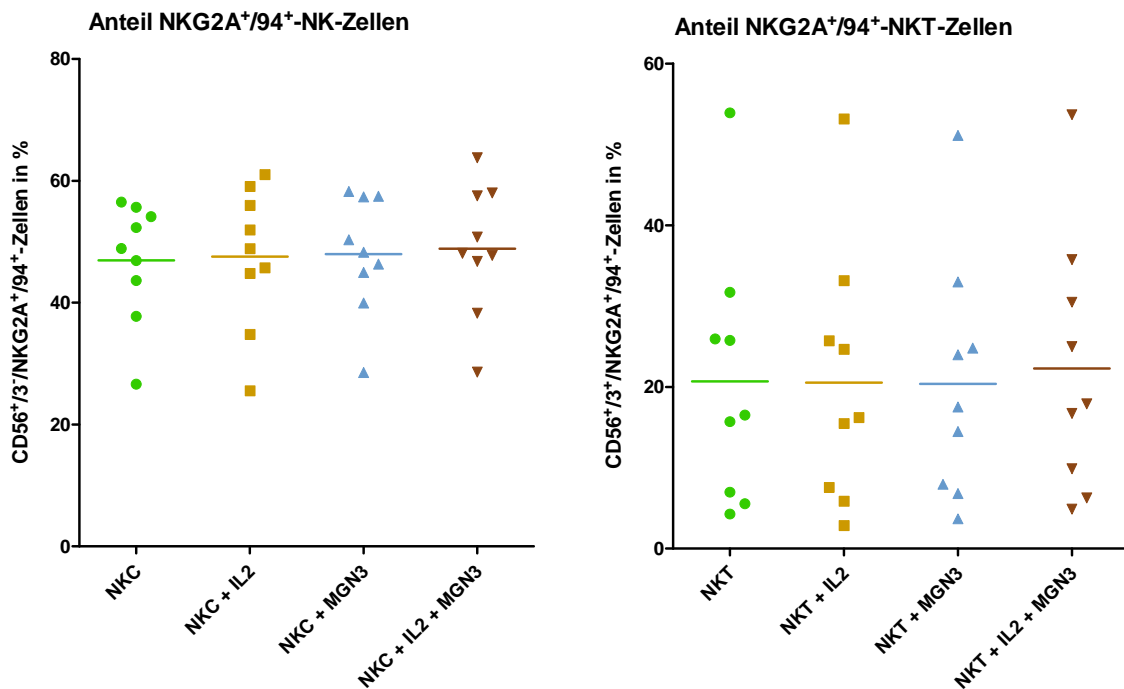


Abbildung 4.14: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 9 gesunden Spendern. Anteil der $\text{NKG2A}^+/\text{94}^+$ -NK- und NKT-Zellen, angegeben in Prozent aller gatedeten Zellen.

Das Heterodimer *NKG2A/CD94* gehört zu den inhibierenden Rezeptoren, wobei CD94 auf NK-Zellen konstitutiv exprimiert wird. Wie man der Abbildung 4.14 entnehmen kann, hat weder IL-2 noch MGN-3 einen Einfluss auf den relativen Anteil $\text{NKG2A}^+/\text{94}^+$ -Zellen. Es lässt sich lediglich durch die Kombination eine minimale Steigerung bei einem Großteil der Probanden sehen. Jedoch ließen sich sowohl unter IL-2 als auch unter MGN-3 Einfluss vermehrt $\text{NKG2A}^-/\text{94}^+$ -Zellen detektieren, wobei ausnahmslos alle Probanden unter IL-2 Stimulation sowohl mehr NK- als auch NKT-Zellen mit diesem Expressionsmuster aufwiesen. Der Mittelwert insgesamt stieg von 12,1% auf 15,7% durch IL-2 Stimulation, wobei er mit einem p von 0,0198 statistisch signifikant ist. Unter MGN-3 Einfluss war der Anteil $\text{NKG2A}^-/\text{94}^+$ -Zellen etwas niedriger (im Mittel auf 14%). Durch Kombination von IL-2 und MGN-3 ließ sich ihre Anzahl jedoch bei allen Probanden auf höhere Werte als unter alleiniger IL-2-Stimulation steigern (Mittelwert: 17,8%, p im Vergleich zu unstimulierten Zellen: 0,0086). Hinsichtlich der Expressionsdichte der Moleküle pro Zelle ist weder für NKG2A noch für CD94 ein Trend in eine Richtung sichtbar. Betrachtet man die Mittelwerte, so fällt auf, dass NKG2A durch IL-2 alleine und IL-2 in Verbindung mit MGN-3 minimal mehr exprimiert wurde (Mittelwerte NK/NKT: ohne IL-2: 88,06/145,0, mit IL-2: 92,20/153,0, mit MGN-3: 87,81/145,3, mit IL-2 und MGN-3: 91,9/156,2).

4 Ergebnisse

4.1.3.4 KIR-Rezeptoren, CD 56, CD16, NKG2D, CD226

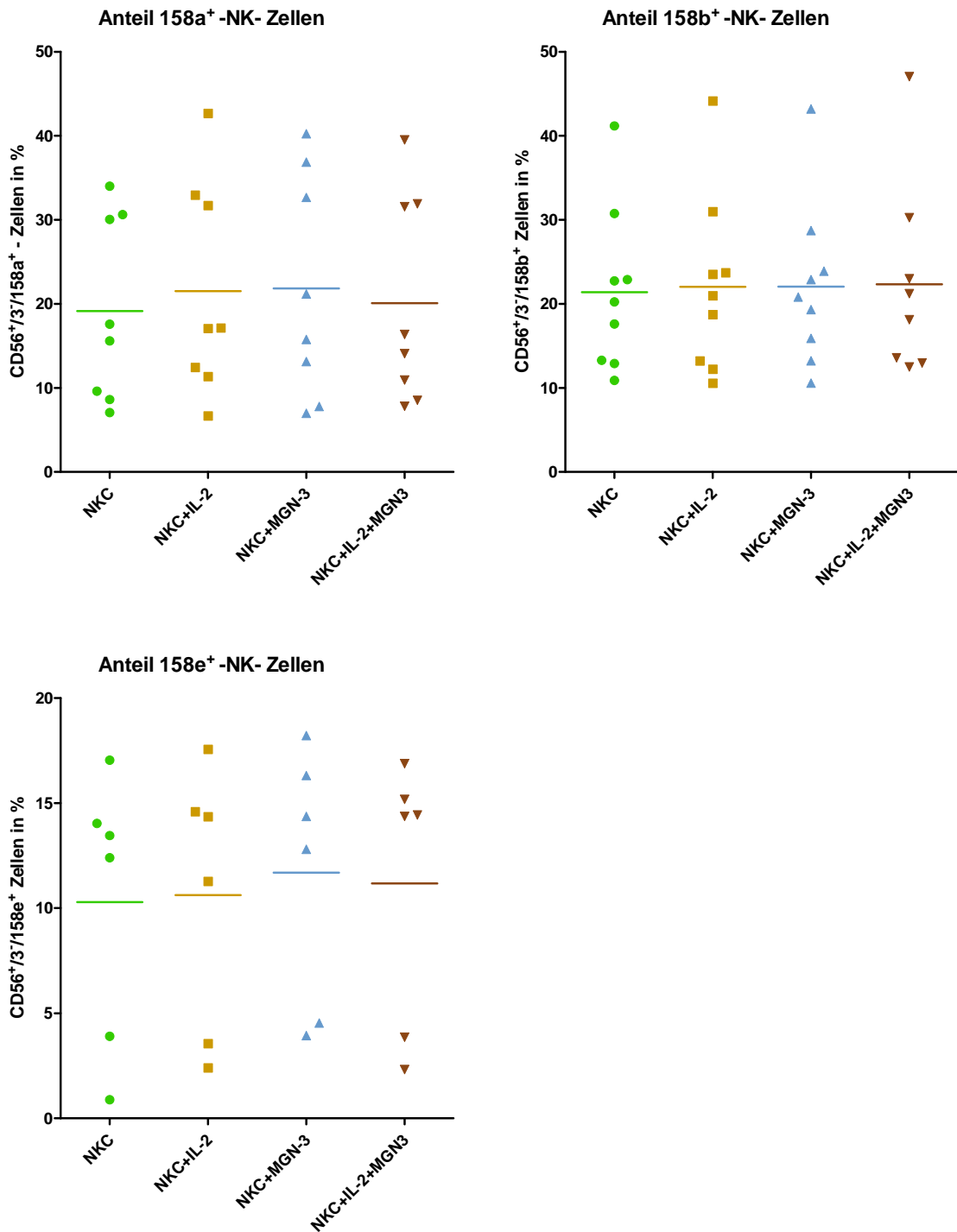


Abbildung 4.15: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von gesunden Spendern. Anteil der CD158a⁺/b⁺/bzw. e⁺-NK-Zellen, angegeben in Prozent aller gatedeten Zellen.

4 Ergebnisse

Die **KIR-Rezeptoren** lassen sich in aktivierende und inhibierende Rezeptoren unterteilen. Die hier dargestellten Rezeptoren 158a, 158b und 158e gehören mehrheitlich zu den inhibierenden Rezeptoren und haben als Liganden verschiedene HLA-Klasse-I-Moleküle. Fehlen diese Moleküle auf potentiellen Targetzellen können die Rezeptoren nicht binden und es wird folglich kein inhibitorisches Signal generiert. Die Unterschiede im Expressionsmuster der NK-Zellen im Hinblick auf diese drei KIRs unterlagen durch IL-2 und MGN-3 keinen relevanten Veränderungen.

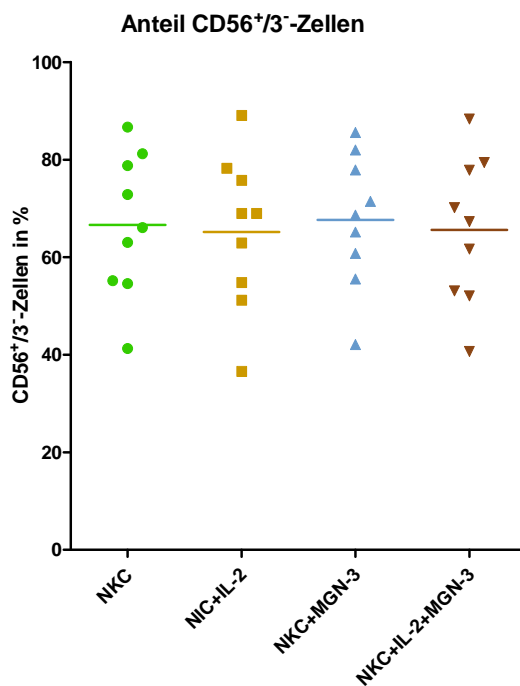


Abbildung 4.16: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 9 gesunden Spendern. Anteil der CD56⁺/3⁻-Zellen, angegeben in Prozent aller getageten Zellen.

CD56 ist ein Adhäsionsglykoprotein, welches von NK-Zellen, NKT-Zellen und einer Subpopulation von T-Zellen exprimiert wird. Es konnte weder durch IL-2, noch durch Biobran eine erhöhte Anzahl von Zellen beobachtet werden, die dieses Antigen exprimieren. Genauso wenig veränderte sich die Anzahl derjenigen Zellen, die für CD3 positiv und CD56 negativ waren.

4 Ergebnisse

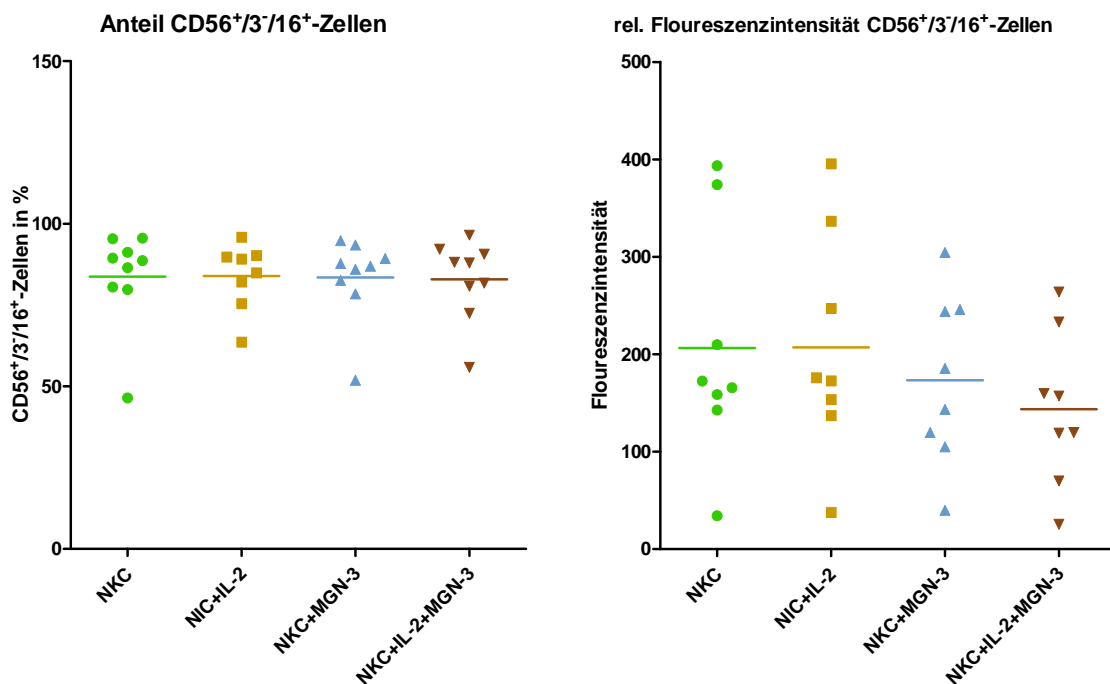


Abbildung 4.17: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 9 bzw 8 gesunden Spendern. Anteil der CD56⁺/3⁻/16⁺-Zellen, angegeben in Prozent aller gatedeten und der rel. Fluoreszenzintensitäten.

CD16 ist Bestandteil des niedrigaffinen Fc-Rezeptors FcγRIII, vermittelt Phagozytose und ADCC und wird von Neutrophilen, NK-Zellen und Makrophagen exprimiert. NK-Zellen, die dieses Antigen exprimieren, wurden weder durch IL-2 noch durch MGN-3 verstärkt gebildet. Die Expressionsdichte pro Zelle blieb unter Einfluss von IL-2 bei CD56⁺/3⁻-Zellen nahezu gleich (Mittelwert ohne Stimulation: 206, mit IL-2: 202), verringerte sich bei 6 der 8 Probanden durch Biobran deutlich (Mittelwert 173) und sank durch Kombination beider Substanzen noch einmal deutlich ab (Mittelwert 144, Rückgang allerdings nur bei 5 der 8 Probanden, bei 7 war die Expressionsdichte jedoch niedriger als bei unstimulierten NK-Zellen). Sogenannte CD56⁺⁺(bright)-Zellen, die den CD56-Rezeptor in sehr hoher Anzahl exprimieren, jedoch negativ für CD16 waren, wiesen bei den einzelnen Probanden keinen einheitlichen Trend auf, teilweise stieg, teilweise sank ihre Anzahl unter IL-2 und MGN-3 Einfluss. Die Mittelwerte sind deshalb wenig aussagekräftig, da sie zu sehr von Schwankungen der einzelnen Probanden abhängig sind.

4 Ergebnisse

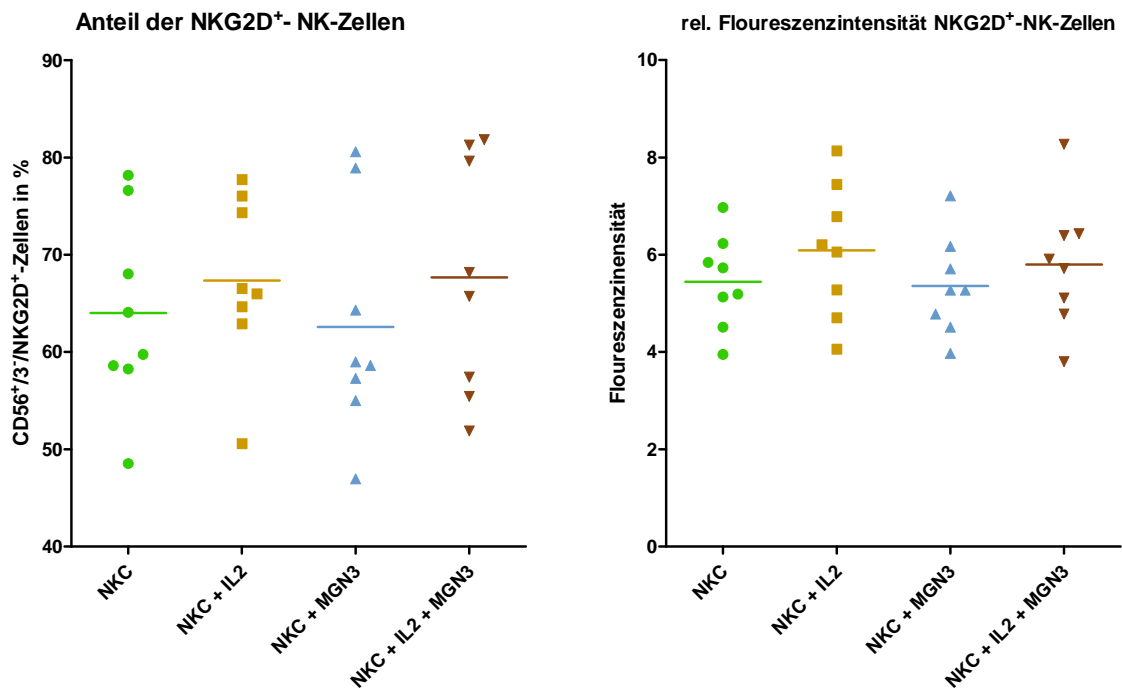


Abbildung 4.18: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 8 gesunden Spendern. Anteil, angegeben in Prozent aller gatedeten Zellen, und rel. Fluoreszenzintensität der NKG2D⁺-NK-Zellen.

Bei *NKG2D* handelt es sich um ein aktivierendes Homodimer, das konstitutiv auf NK-Zellen exprimiert wird. Innerhalb der NK-Zell-Population war bei 5 der 8 Probanden eine leichte Steigerung der NKG2D exprimierenden Zellen nach IL-2 Inkubation zu verzeichnen, jedoch ohne statistische Signifikanz (der Mittelwert stieg von 64% auf 67,4%). Unter MGN-3 Stimulation wurden, mit zwei Ausnahmen, bei allen Probanden weniger NKG2D⁺-Zellen exprimiert als unter IL-2 (Mittelwert 52,6%). Durch kombinierte Stimulation mit beiden Substanzen wurde bei 6 der 8 Probanden eine höhere Anzahl NKG2D⁺-Zellen detektiert als ohne Stimulation (im Mittel 67,7%). Die Population der NKT-Zellen wurde weder durch IL-2 noch durch MGN-3 in ihrer Expression von NKG2D beeinflusst. Die geringe Fluoreszenzintensität lässt generell auf eine geringe Expressionsdichte dieses Rezeptors auf den einzelnen Zellen schließen und wird durch Stimulation nicht beeinflusst.

4 Ergebnisse

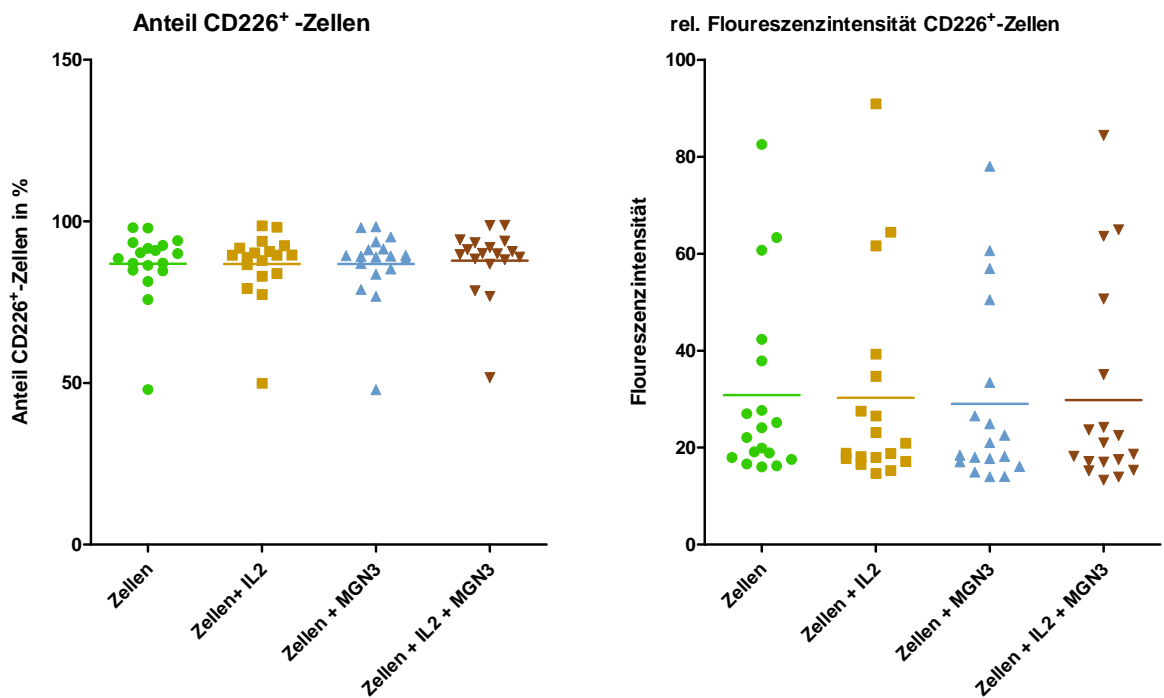


Abbildung 4.19: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 9 gesunden Spendern. Anteil, angegeben in Prozent aller gegateten Zellen und rel. Fluoreszenzintensität der CD226⁺-NK- und NKT-Zellen.

CD226 (DNAM-1) ist ein Adhäsionsglykoprotein, welches auf fast allen NK-Zellen, sowie CD4- und CD-8 positiven Zellen exprimiert wird und an die Liganden CD112 und CD155 bindet, die auf vielen Tumorzellen exprimiert werden. Da es auch schon bei unstimulierten Zellen konstitutiv exprimiert wird, ließ sich ihre Anzahl nicht mehr steigern. Auch die Fluoreszenzintensität blieb durch IL-2 und MGN-3 unberührt.

4 Ergebnisse

4.1.3.5 CD122, CD132, IL-15R α

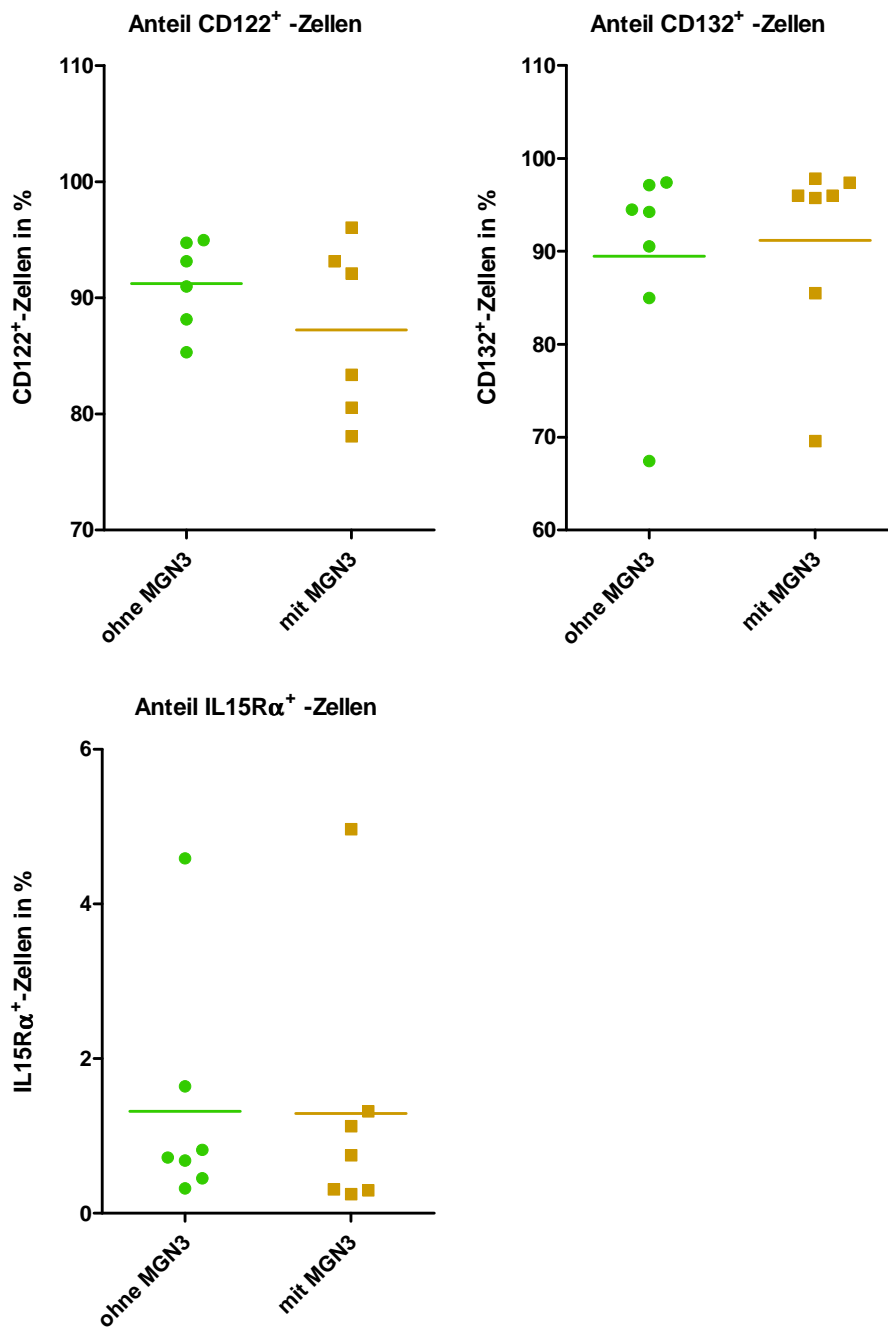


Abbildung 4.20: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 6 gesunden Spendern. Anteil der CD122⁺-, CD132⁺- und IL15R α ⁺-Zellen, angegeben in Prozent aller gateden Zellen.

4 Ergebnisse

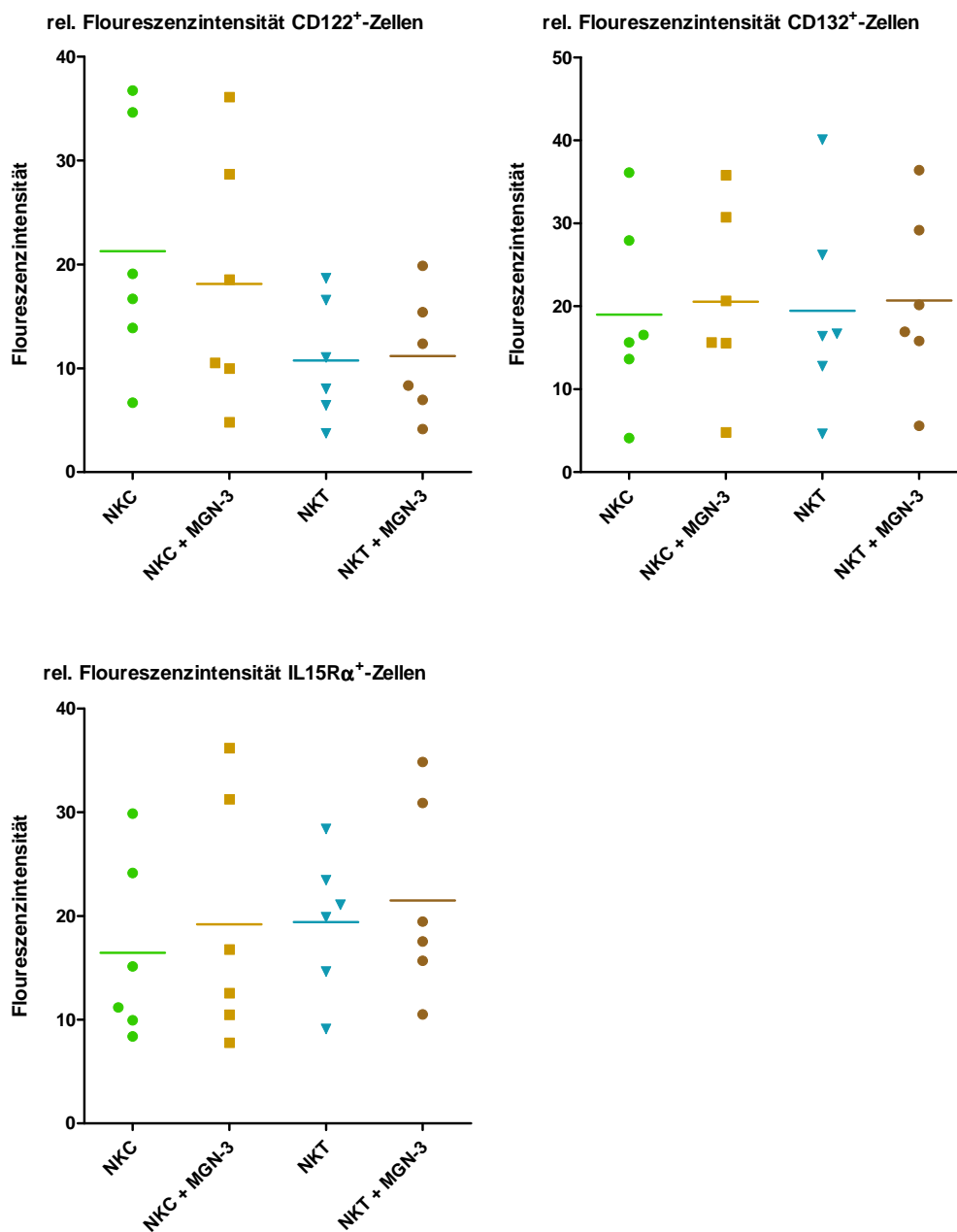


Abbildung 4.21: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 6 gesunden Spendern. Rel. Fluoreszenzintensität der CD122⁺-, CD132⁺- und IL15Rα⁺-NK- und NKT-Zellen.

Bei **CD122** und **CD132** handelt es sich um die β - und γ -Kette des IL-2 Rezeptors, die zusammen mit CD25, der α -Kette, einen stabilen heterotrimeren Komplex bilden. Ruhende T-Zellen und NK-Zellen exprimieren nur die β - und γ -Kette des Rezeptors und haben eine geringe bis mittlere Affinität zu IL-2. Nach Antigenerkennung bzw. Aktivierung wird auch die α -Kette exprimiert und der Rezeptor bindet IL-2 mit hoher Affinität. Der IL-15-Rezeptor hat die beiden Untereinheiten CD122 und 132 mit dem IL-2 Rezeptor gemeinsam und seine dritte Komponente ist das **IL-15R α** -Protein. CD132 ist außer-

4 Ergebnisse

dem Untereinheit für den IL-4, IL-7 und den IL-9 Rezeptor. In unseren Untersuchungen konnten durch Biobran nur minimale Veränderungen beobachtet werden. CD122⁺-Zellen wurden durch Biobran Stimulation eher etwas weniger exprimiert und auch die Expressionsdichte auf NK-Zellen ging leicht zurück. Die Anzahl CD132⁺-Zellen stieg tendenziell leicht an, die Fluoreszenzintensität änderte sich kaum. Der Anteil IL-15R α ⁺-Zellen blieb auch unter Biobran-Einfluss gering, die Fluoreszenzintensität stieg jedoch etwas an.

4.1.4 Zytokinaktivitätsmessung

Bei drei der Probanden wurden Zytokinaktivitätsmessungen für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen und Schaubildern 4.22, 4.23 und 4.24 dargestellt. Da es sich lediglich um drei Probanden handelt, können aus den Ergebnissen keine allgemeingültigen Schlussfolgerungen gezogen werden.

Die Werte differieren teilweise von Proband zu Proband, es lassen sich jedoch auch gemeinsame Tendenzen erkennen. **IL-2** steigt bei Spender 1 und 2 unter IL-2-Stimulation stark an. Durch zusätzliche Stimulation mit MGN-3 ist bei Spender 2 ein erneuter Anstieg sichtbar, wohingegen die IL-2-Aktivität bei Spender 3 leicht abnimmt, jedoch immer noch weit über dem Ausgangsniveau liegt. Unter alleiniger MGN-3 Stimulation ist eine deutlich höhere IL-2 Aktivität nur bei Spender 3 zu beobachten.

Für das Zytokin **IL-4** weisen alle 3 Spender gleiche Tendenzen auf: durch IL-2 und MGN-3 alleine ist ein starker Aktivitätsanstieg erkennbar, der sich durch kombinierte Stimulation nochmals deutlich steigern lässt. Einzige Ausnahme ist Spender 3, bei dem die höchste Aktivitätsrate unter alleiniger MGN-3 Stimulation zu beobachten ist.

IL-10 nimmt sowohl durch Stimulation der Zellen mit IL-2 als auch durch Kombination mit MGN-3 nur minimal zu, jedoch ist bei den Spendern 2 und 3 durch MGN-3 alleine eine Aktivitätssteigerung zu verzeichnen.

IL-12 lässt sich bei allen 3 Spendern durch IL-2 leicht steigern, bei Spender 1 und 2 durch Zusatz von MGN-3 noch einmal minimal. Unter MGN-3 alleine ist lediglich bei Spender 3 eine erhebliche Aktivitätssteigerung von IL-12 sichtbar.

Die Aktivitätsänderungen von **IL-15** und **GM-CSF** verlaufen bei den Spendern 1 und 2 ähnlich: durch IL-2 und Kombination mit MGN-3 ist in etwa dieselbe Aktivitätssteigerung zu verzeichnen, die Werte bei alleiniger MGN-3 Stimulation fallen wesentlich niedriger aus, jedoch höher als bei unstimulierten Zellen. Einzig bei Spender 3 ist durch kombinierte Stimulation eine deutlich höhere Aktivität als nur durch IL-2 zu sehen und die stärkste Aktivitätszunahme ist durch MGN-3 alleine zu beobachten.

Den einzigen gemeinsamen Trend der **IFN- γ** Aktivität zeigen alle 3 Spender durch eine

4 Ergebnisse

starke Aktivitätssteigerung unter IL-2 Einfluss. Durch kombinierte Stimulation steigt die Aktivität der Spender 2 und 3 nochmals an, während sie bei Spender 3 abnimmt, um hier unter alleiniger MGN-3 Stimulation die höchsten Werte zu erreichen.

Für das Zytokin **TNF- α** lässt sich ebenfalls nur schwer ein einheitlicher Trend beschreiben. Für Spender 2 und 3 sind durch IL-2 sowie durch Kombination mit MGN-3 jeweils Aktivitätssteigerungen zu sehen, die durch MGN-3 alleine noch einmal deutlich zunehmen.

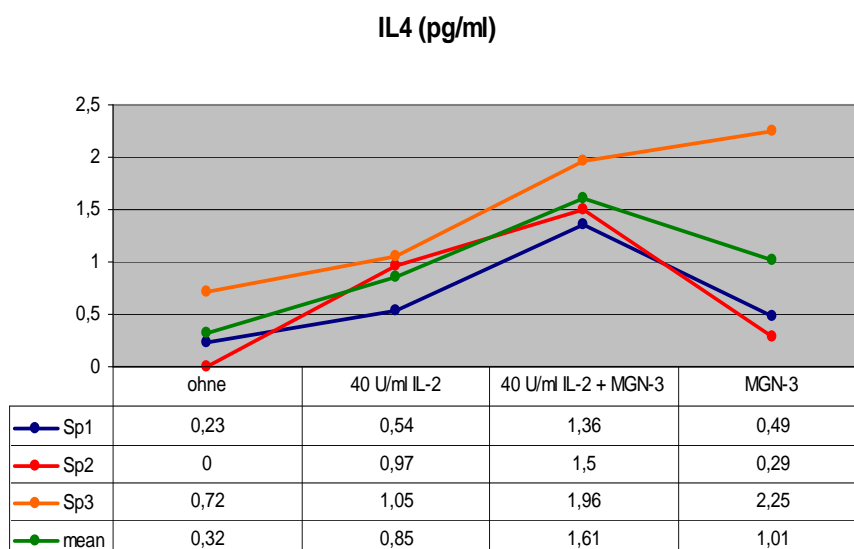
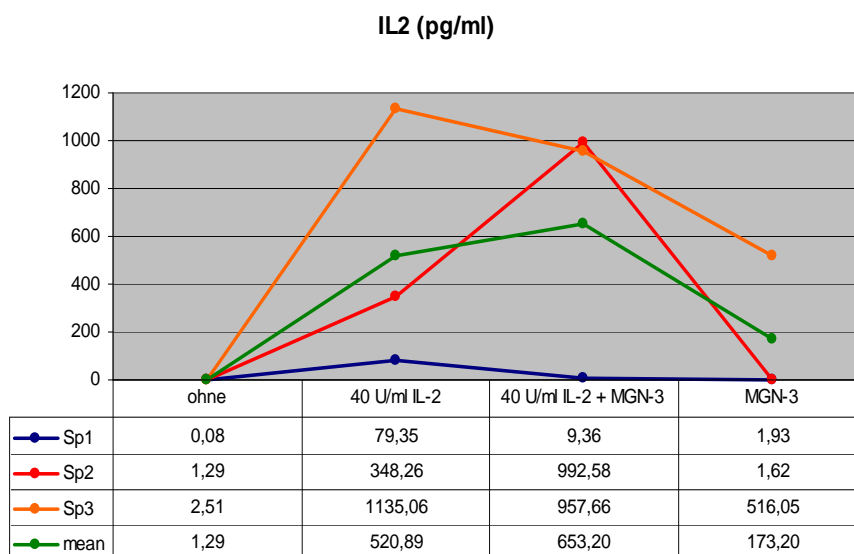
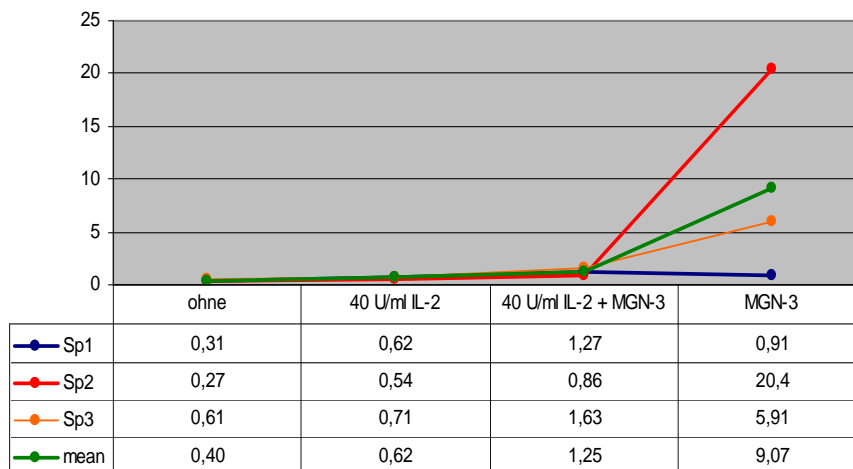


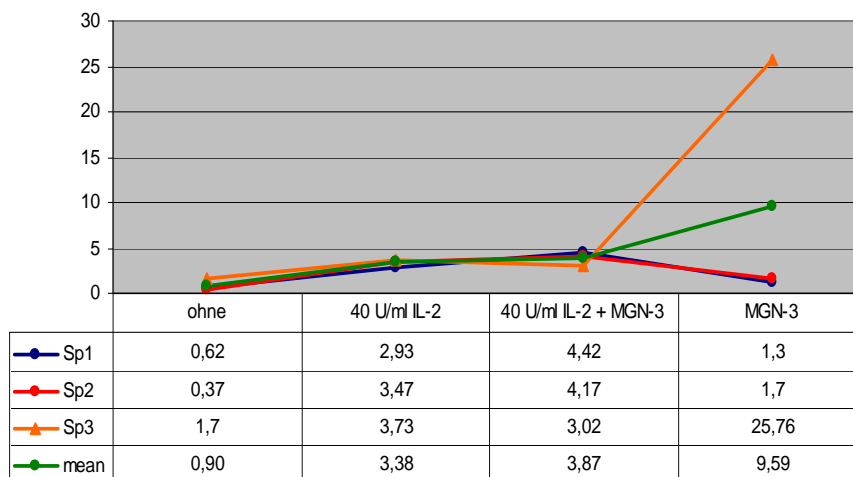
Abbildung 4.22: Zytokinaktivitätsmessungen für IL-2 und IL-4

4 Ergebnisse

IL10 (pg/ml)



IL12 (pg/ml)



IL15 (pg/ml)

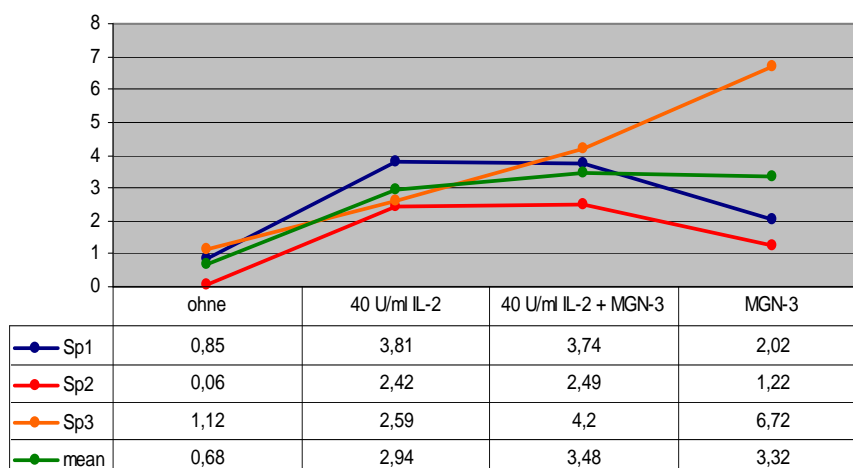
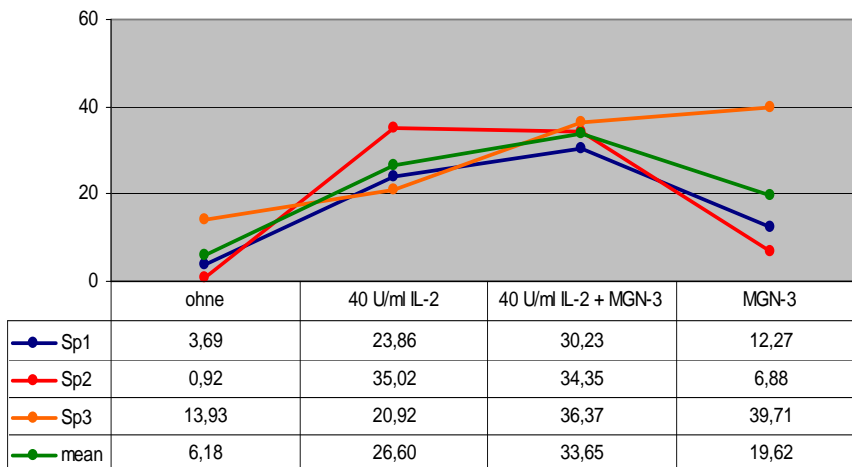


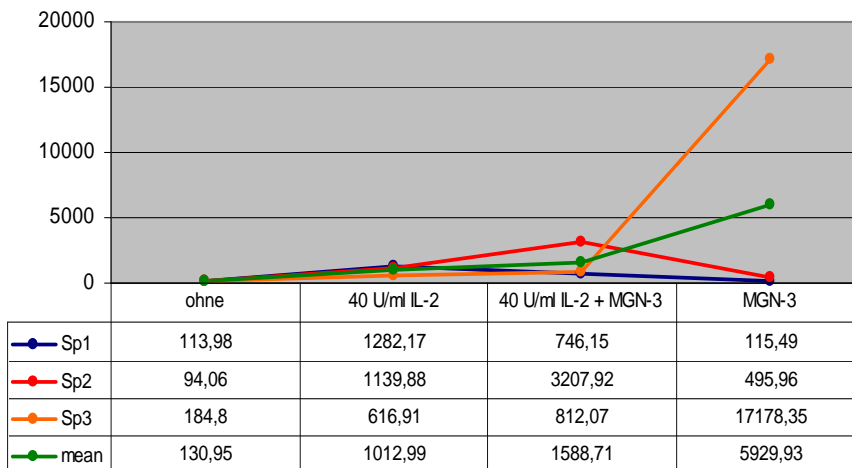
Abbildung 4.23: Zytokinaktivitätsmessungen für IL-10, IL-12 und IL-15

4 Ergebnisse

GM-CSF (pg/ml)



IFN- γ (pg/ml)



TNF- α (pg/ml)

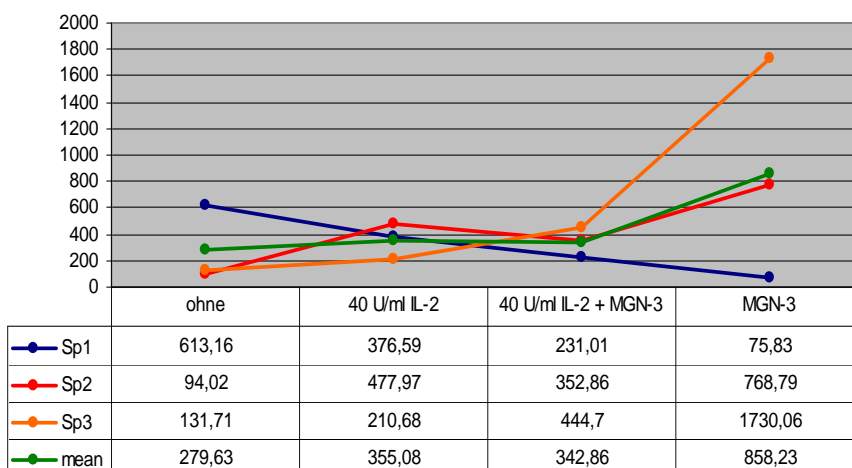


Abbildung 4.24: Zytokinaktivitätsmessungen für GM-CSF, IFN- γ , und TNF- α

4.2 In-vivo Versuchsreihe

Um Herauszufinden, ob die in-vitro erzielten Wirkungen von Biobran auch in-vivo funktionieren, testeten wir das Nahrungsergänzungspräparat an zehn freiwilligen gesunden Versuchspersonen. Für diese Anwendungsbeobachtung wurde ein Prüfplan erstellt und von der Ethikkommission genehmigt. Die Probanden nahmen Biobran über einen Zeitraum von zwei Wochen drei mal täglich ein. Die NK-Zellaktivität wurde mit Hilfe von Zytotoxizitätstests vor, nach einer Woche und nach 2 Wochen Einnahme von Biobran, sowie zwei Wochen nach Absetzen bestimmt. Die Tests wurden gegen K562, A204 und cALL-Blasten durchgeführt. Desweiteren wurde versucht herauszufinden wodurch die gesteigerte NK-Zell-Aktivität durch Biobran zustande kam. Hierfür wurden erneut FACS-Analysen durchgeführt und das Serum der freiwilligen Spender wurde auf verschiedene Zytokine und ihre Konzentrationen untersucht.

4.2.1 Zytotoxizitätstests

In den nachfolgenden Schaubildern und Tabellen sind die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätstests von 10 freiwilligen gesunden Spendern vor, nach einer und nach zwei Wochen Einnahme von Biobran, sowie zwei Wochen nach Absetzen dargestellt. Dabei beziehen sich die ersten beiden Schaubilder auf unstimulierte NK-Zellen, die beiden anderen auf NK-Zellen, die über Nacht mit 40 U/ml IL-2 inkubiert wurden. Das jeweils erste Schaubild stellt anhand eines Scatterplots die einzelnen Werte der spezifischen Lysen der einzelnen Versuche dar, sowie Mittelwerte und Standardabweichungen. Der große Streubereich kommt durch die zusammenfassende Darstellung aller vier angewandten E:T-Verhältnisse zustande (20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1). Das zweite Schaubild verdeutlicht die lineare Steigerung der NK-Zell-Aktivität durch den Effekt von Biobran.

4 Ergebnisse

4.2.1.1 Zytotoxische Aktivität gegen K562

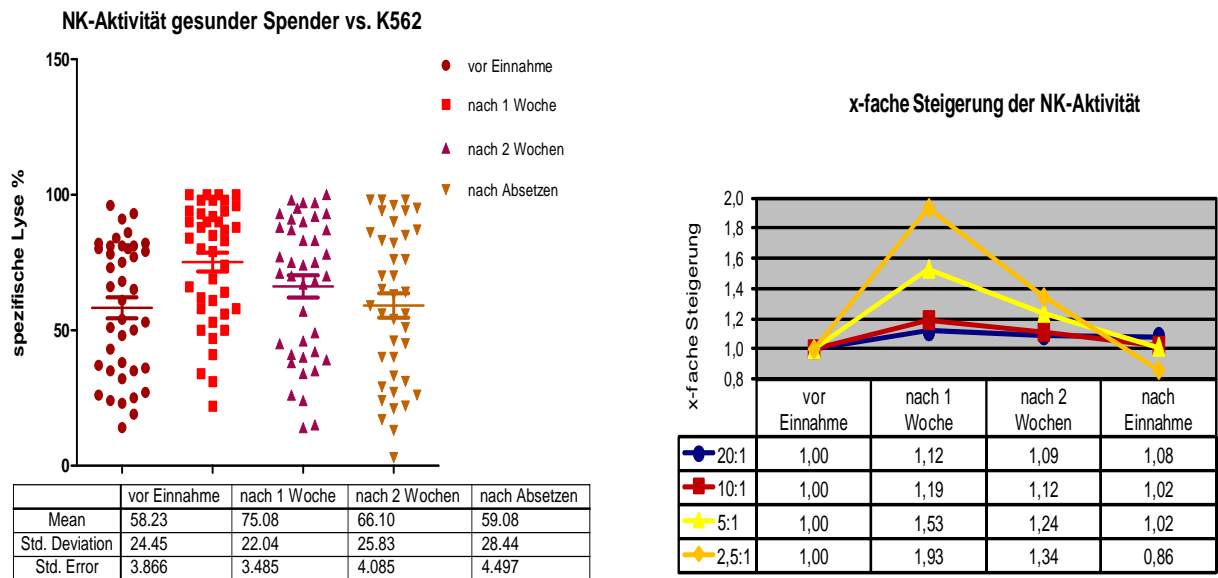


Abbildung 4.25: Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 10 gesunder freiwilliger Spender gegen K562.

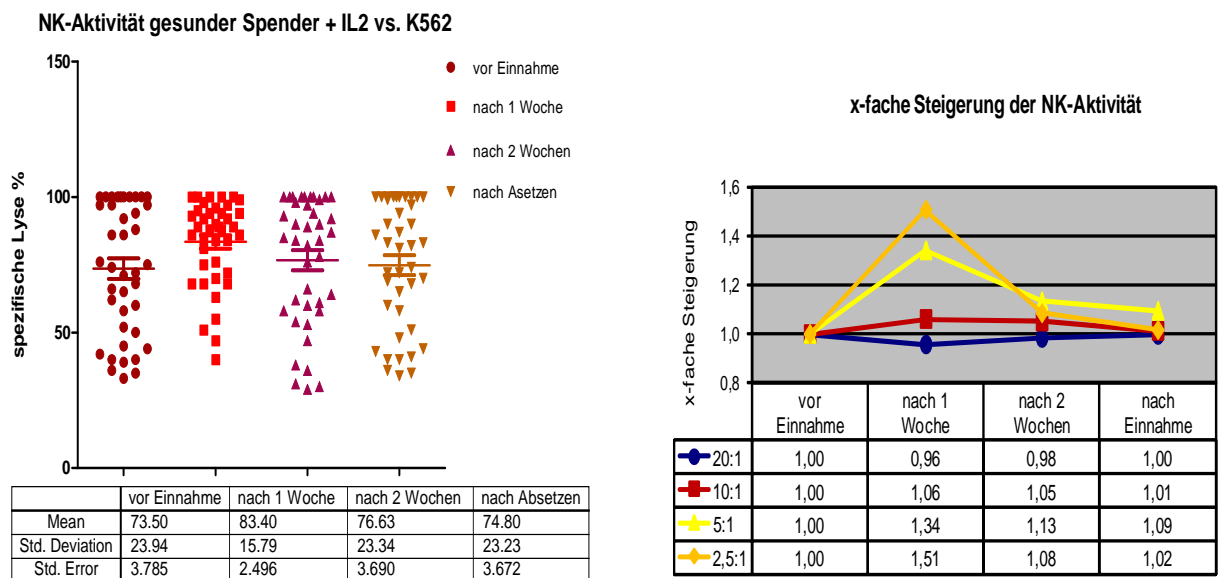


Abbildung 4.26: Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 10 gesunder freiwilliger Spender gegen K562, die eine Nacht mit 40 U/ml IL-2 inkubiert wurden.

Gegen K562 ergaben sich signifikante Unterschiede ohne IL-2 Stimulation beim Vergleich der Werte vor Biobran-Einnahme und nach einer Woche ($p < 0,0001$), sowie nach zwei Wochen ($p = 0,0004$). Zwei Wochen nachdem Biobran abgesetzt wurde unterschieden sich die Werte nicht mehr signifikant von denjenigen vor der Einnahme ($p = 0,6142$).

4 Ergebnisse

In der Versuchsreihe der mit IL-2 inkubierten NK-Zellen sind ebenfalls signifikante Unterschiede beim Vergleich der Werte vor Biobran-Einnahme und nach einer Woche sichtbar ($p=0,0002$). Nach der zweiten Woche ist zwar immernoch ein Trend hin zu erhöhter NK-Zell-Aktivität zu sehen, eine statistische Signifikanz besteht allerdings nicht mehr ($p=0,0874$). Zwei Wochen nachdem Biobran abgesetzt wurde unterscheiden sich die Werte ebenfalls nicht mehr signifikant von denjenigen vor Einnahme ($p=0,3200$). Betrachtet man die E:T-Verhältnisse einzeln, so fällt auf, dass die Unterschiede der NK-Zell-Aktivität umso größer wurden, je kleiner die E:T-Verhältnisse waren. Dies kann damit zusammenhängen, dass bei vielen Probanden bei hohen E:T-Verhältnissen bereits vor Beginn der Einnahme von Biobran nahezu 100 %ige Lyseraten erreicht wurden, die sich somit kaum steigern ließen.

Vergleicht man die Werte der nur durch Biobran stimulierten NK-Zellen mit denen nach zusätzlicher IL-2 Stimulation, so ist durch IL-2 ausnahmslos noch einmal eine zusätzliche Steigerung von im Mittel um das 1,2fache zu beobachten. Diese Steigerung ist bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 kaum sichtbar, bei kleineren E:T-Verhältnissen steigt sie jedoch auf das bis zu 2,7fache des Vergleichswertes an. Setzt man die Werte der Spender vor jeglicher Biobran-Einnahme und Stimulation als Bezugswerte auf 1 fest, ist durch Stimulation durch Biobran in-vivo und IL-2 in-vitro im Durchschnitt sogar eine Steigerung um das 1,32fache sichtbar .

4.2.1.2 Zytotoxische Aktivität gegen A204

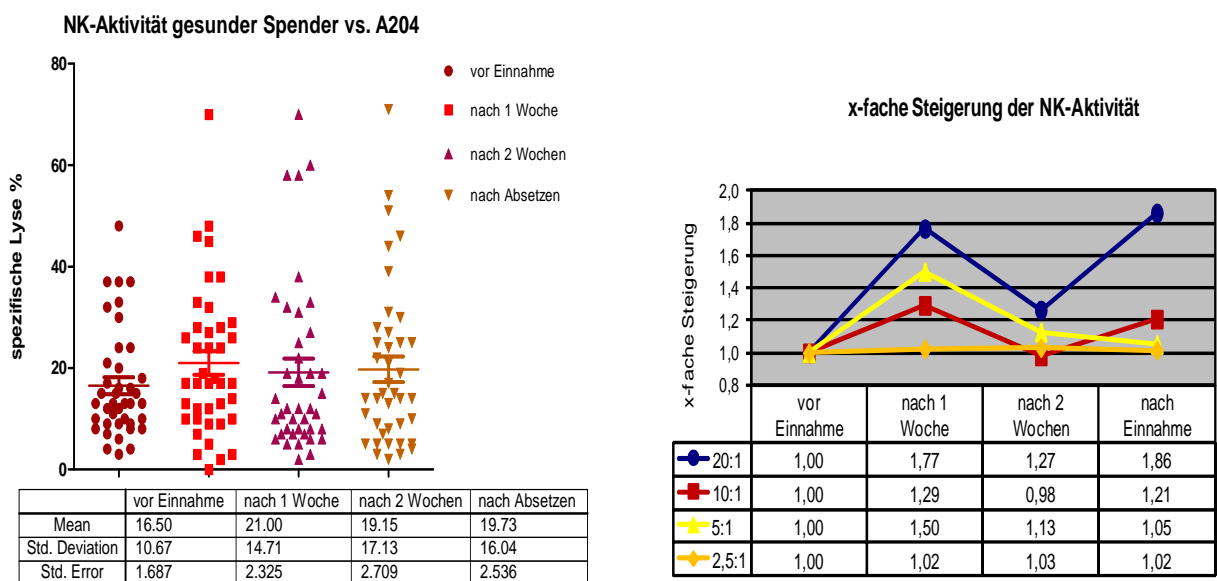


Abbildung 4.27: Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 10 gesunder freiwilliger Spender gegen A204.

4 Ergebnisse

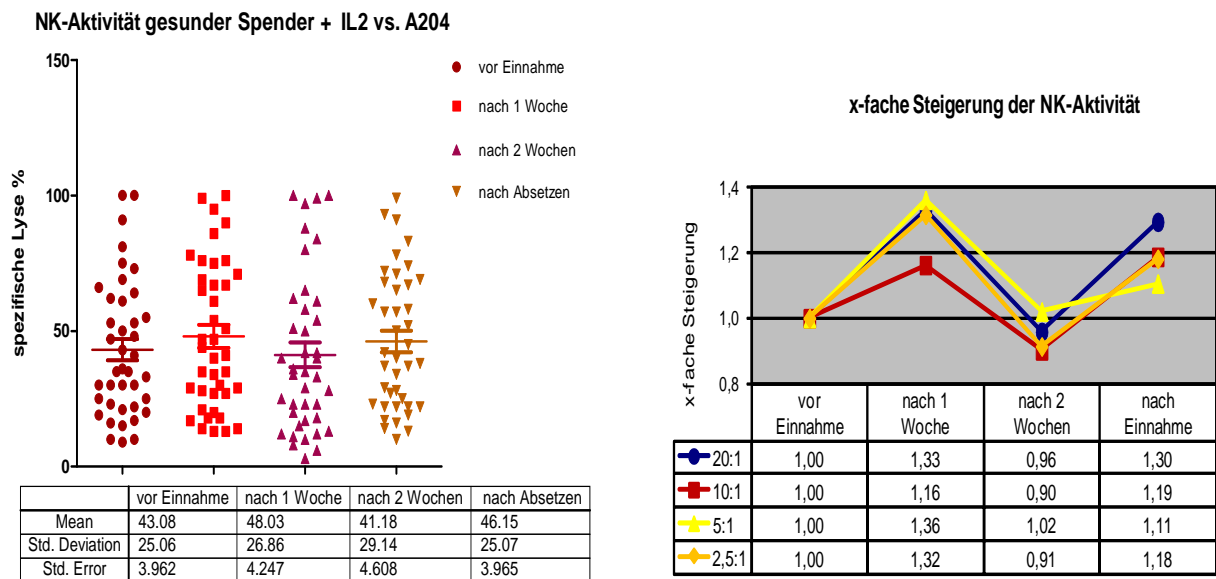


Abbildung 4.28: Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 10 gesunder freiwilliger Spender gegen A204, die eine Nacht mit 40 U/ml IL-2 inkubiert wurden.

Ein signifikanter Unterschied bei unstimulierten NK-Zellen ergab sich gegen A204 nur beim Vergleich der Werte vor der Einnahme von Biobran und nach einer Woche ($p < 0,0153$). Nach zwei Wochen ist zwar immer noch ein Trend in Richtung höherer Lyseraten als vor Einnahme sichtbar, allerdings ist er bei einem p-Wert von 0,0734 nicht statistisch signifikant. Auch der Mittelwert zwei Wochen nach Absetzen unterscheidet sich nur unwesentlich von dem zu Beginn der Untersuchung.

In der Versuchsreihe der mit IL-2 inkubierten NK-Zellen ergaben sich für keinen Zeitpunkt signifikante Unterschiede, und auch ein Trend in eine Richtung ist nicht feststellbar. So kann dem zweiten Schaubild aus Abbildung 4.28 entnommen werden, dass die Lyseraten zwar nach einer Woche und nach Absetzen ansteigen, nach zwei Wochen Biobran-Einnahme im Schnitt jedoch niedriger waren als zu Beginn.

Auch bei Betrachtung der einzelnen E:T-Verhältnisse fällt nicht wie bei K562 auf, dass die Unterschiede bei kleineren Verhältnissen größer ausfallen. Im Gegenteil, in der Versuchsreihe der unstimulierten NK-Zellen waren die Unterschiede bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 größer als bei den kleineren Verhältnissen.

Die Steigerung durch IL-2 fiel bei A204 deutlicher aus als bei K562. Im Durchschnitt stieg die Lyserate durch zusätzliche IL-2 in-vitro Stimulation verglichen mit dem entsprechenden Wert ohne diese Inkubation um das 2,35fache an. Setzt man den Ausgangswert vor jeglicher Einnahme von Biobran als 1 und untersucht den Effekt durch den Einfluss von Biobran in-vivo plus zusätzlicher IL-2 in-vitro-Stimulation ergibt sich sogar eine Steigerung der Zytotoxizität um das 2,7fache. Diese höhere Steigerung verglichen mit K562

4 Ergebnisse

könnte an den schlechter lysierbaren und weniger NK-sensitiven Zellen liegen, so dass zu Beginn der Testreihe die Lyseraten nicht schon um 100% lagen. Hiermit ließe sich auch erklären, dass die hohen Steigerungsraten sich quer durch alle E:T-Verhältnisse ziehen.

4.2.1.3 Zytotoxische Aktivität gegen cALL-Blasten

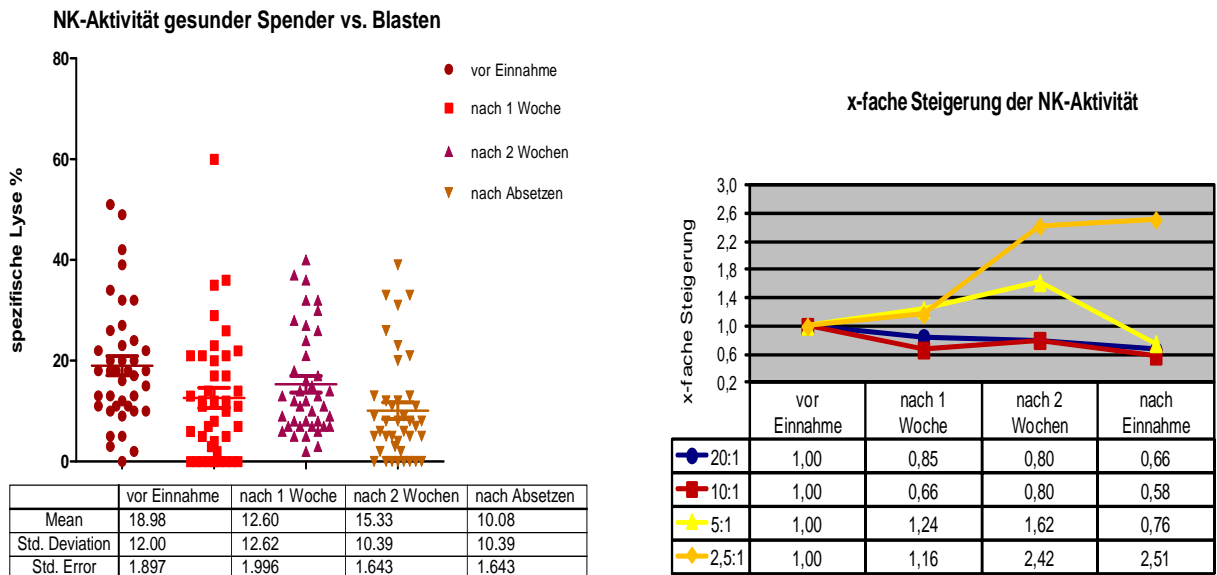


Abbildung 4.29: Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 10 gesunder freiwilliger Spender gegen cALL-Blasten.

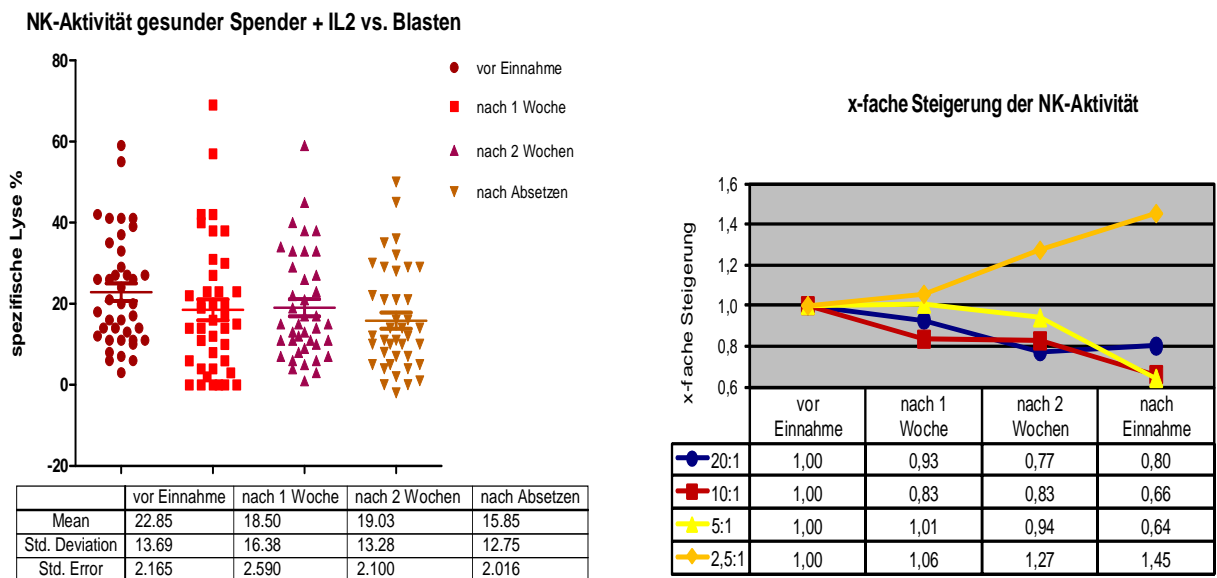


Abbildung 4.30: Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen 10 gesunder freiwilliger Spender gegen Blasten, die eine Nacht mit 40 U/ml IL-2 inkubiert wurden.

4 Ergebnisse

Signifikante Unterschiede bei unstimulierten NK-Zellen gegen Blasten ergaben sich beim Vergleich der Werte vor Biobran-Einnahme und nach einer Woche ($p=0,0129$), sowie nach Absetzen ($p=0,0001$), ein Trend zwischen den Werten vorher und nach zwei Wochen Biobran ist sichtbar ($p=0,0661$). Allerdings sind diese signifikanten Unterschiede nicht auf eine Steigerung der Lyseraten, sondern auf eine Abnahme derselben zurückzuführen.

In der Versuchsreihe der mit IL-2 inkubierten NK-Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, es ist auch bei Betrachtung der einzelnen E:T-Verhältnisse kein einheitlicher Trend sichtbar.

Ebenso wie bei den anderen beiden Zellreihen ist auch hier beim Vergleich der IL-2 stimulierten Zellen mit den entsprechenden Werten ohne Stimulation eine Steigerung der Lyserate auf im Durchschnitt das 1,37fache zu beobachten. Legt man jedoch immer den Anfangswert vor Biobran in-vivo Stimulation als Vergleichsbasis fest, so ist im Mittel keine zusätzliche Steigerung durch IL-2 in-vitro sichtbar.

4.2.2 FACS-Analysen

Parallel zu den Zytotoxizitätstests wurden die PBMCs der zehn Probanden FACS-Analysen unterzogen, um so eine mögliche Veränderung ihrer CD-Oberflächenmoleküle unter dem Einfluss von Biobran und IL-2 zu erkennen. Die PBMCs wurden dabei mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nach dem in Abschnitt 3.8 beschriebenen Schema inkubiert.

Bei der Auswertung war kein einheitlicher Trend einer Erhöhung oder Verminderung bestimmter CD-Oberflächenantigene festzustellen, der die entsprechenden Ergebnisse der Zytotoxizitätstests erklären würde, zumal auch die Zytotoxizitätstests nicht in eine einheitliche Richtung gingen.

4.2.2.1 CD25

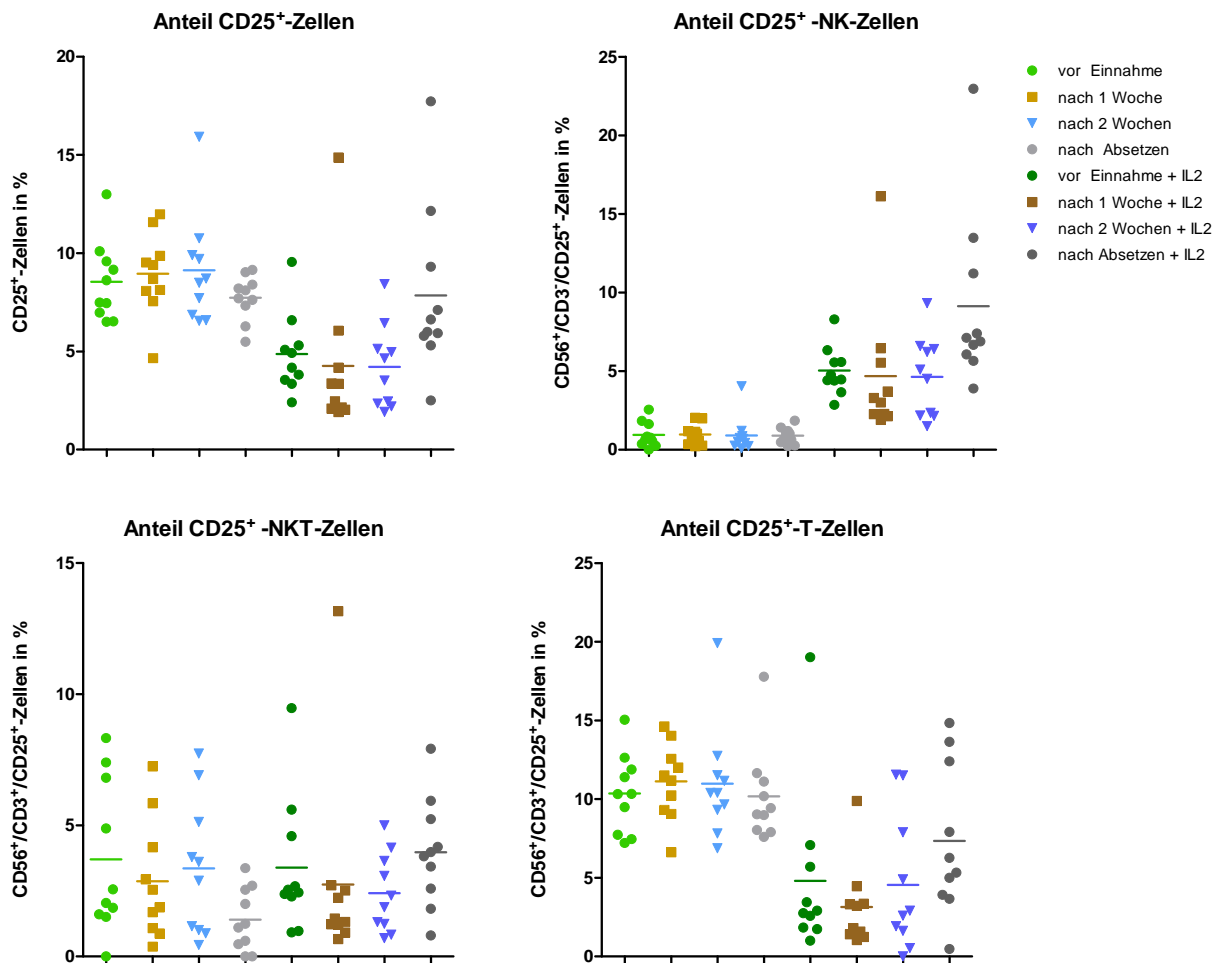


Abbildung 4.31: FACS-Analysen. Zusammenfassung der Ergebnisse von 10 gesunden Probanden. Anteil der CD25⁺-Zellen insgesamt sowie der CD25⁺-NK-, -NKT-, und -T-Zellen, angegeben in Prozent aller getageten Zellen.

CD25, die α -Kette des IL-2 Rezeptors, wird vor allem auf aktivierten T-Zellen, regulatorischen T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert. Bei Betrachtung der CD25⁺-Zellen insgesamt konnte durch die Einnahme von Biobran weder nach einer Woche, noch nach zwei Wochen eine deutliche Steigerung der Zellanzahl detektiert werden (Mittelwerte: 8,5%, 8,9%, 9,1%, 7,7%). Die Werte stiegen im Durchschnitt zwar minimal an, betrachtet man jedoch die einzelnen Probanden für sich, ist kein einheitlicher Trend sichtbar. Das gleiche gilt für die zusätzliche in-vitro Zugabe von IL-2 (Mittelwerte: 4,9%, 4,3%, 4,2%, 7,8%). Der hohe Wert nach Absetzen von Biobran kommt durch zwei Extremwerte zustande. Auffällig ist jedoch, dass nach IL-2-Inkubation im Schnitt weniger Zellen den CD25-Rezeptor exprimierten. Allerdings muss zwischen den einzelnen Zellpopulationen

4 Ergebnisse

unterschieden werden: während $CD25^+$ NK-Zellen durch die Zugabe von IL-2 zunahmen, blieb die relative Anzahl $CD25^+$ -NKT-Zellen gleich und die der T-Zellen, die jedoch nur zu einem sehr geringen Anteil in der Probe enthalten waren, nahm deutlich ab.

4.2.2.2 CD69

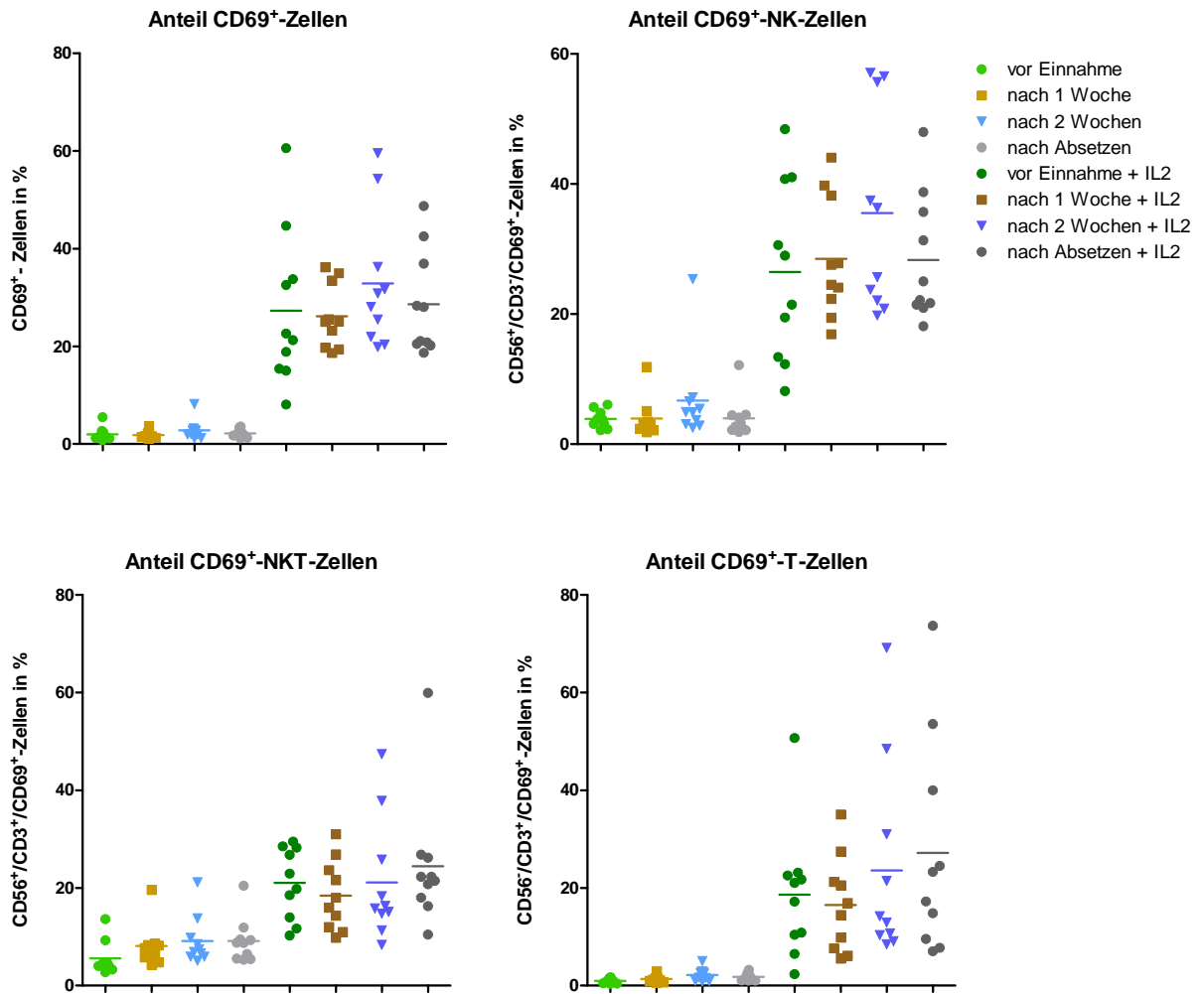


Abbildung 4.32: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 10 gesunden Probanden. Anteil der $CD69^+$ -Zellen insgesamt, sowie der $CD69^+$ - NK-, NKT- und T-Zellen, angegeben in Prozent aller gegateten Zellen.

4 Ergebnisse

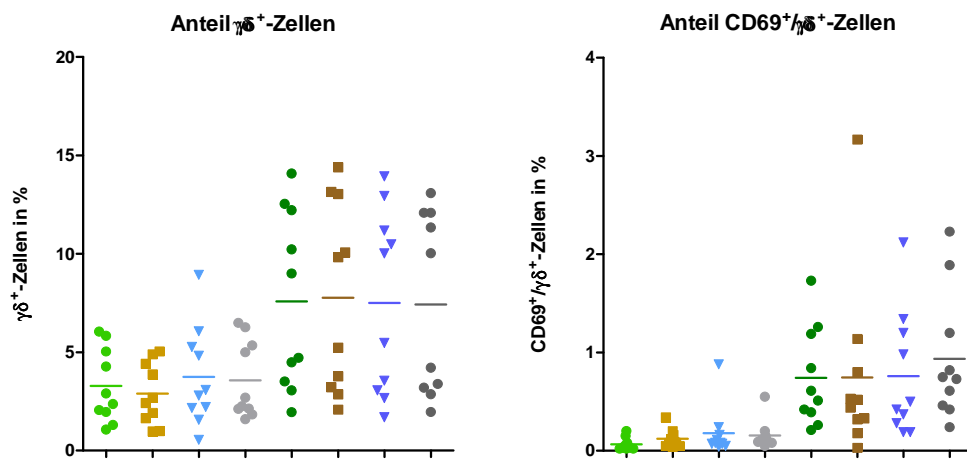


Abbildung 4.33: FACS-Analyse. Zusammenfassung der Ergebnisse von 10 gesunden Probanden. Anteil der $\gamma\delta^+$ -Zellen, angegeben in Prozent aller gateden Zellen.

Tabelle 4.10: Mittelwerte der rel. Anteile der $CD69^+$ - und $\gamma\delta^+$ -Zellen in Prozent

Zellen	vor Einnahme	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach Absetzen	vor Einnahme + IL-2	nach 1 Woche + IL-2	nach 2 Wochen + IL-2	nach Absetzen + IL-2
$CD69^+$	2	1,8	2,8	2,2	28,9	27,7	30,6	32,1
$CD69^+NK$	3,9	3,8	6,7	4	32,2	31,6	35,5	34,2
$CD69^+NKT$	5,6	8,1	9,1	9,1	20,9	20,1	19,9	28,4
$CD69^+T$	1	1,3	2,2	1,8	18,6	16,1	23,4	26,2
$\gamma\delta^+$	3,3	2,9	3,7	3,6	7,6	7,8	7,7	7,8
$CD69^+/\gamma\delta^+$	0,07	0,12	0,18	0,16	0,74	0,75	0,82	1,35

$CD69$ wird als frühes Aktivierungsantigen von aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert. Wie man der Tabelle 4.10 und den Schaubildern entnehmen kann, blieb die Anzahl der $CD69$ exprimierenden NK- und T-Zellen im Durchschnitt nach einer Woche Einnahme von Biobran fast unverändert, die der NKT-Zellen stieg an. Nach der zweiten Woche Biobran ist durchweg eine leichte Zunahme sichtbar und nach Absetzen sank die Anzahl wieder etwas ab, bzw. blieb gleich (NKT-Zellen). Bei in-vitro Zugabe von IL-2 ist bei allen aufgelisteten Zellpopulationen ein starker Anstieg der $CD69^+$ -Zellen zu sehen. Nach der zweiten Woche Biobran stieg die Anzahl $CD69$ exprimierender NK- und T-Zellen erneut etwas an, während sie bei NKT-Zellen annähernd stagnierte. Auch nach Absetzen differierten die Werte: während die Zahl $CD69^+$ -NK-Zellen nahezu unverändert blieb, bzw. leicht rückläufig war, stieg sie bei NKT- und T-Zellen erneut an.

4 Ergebnisse

Die $\gamma\delta$ -Zellen ließen sich durch Biobran kaum beeinflussen, ihre Anzahl nahm durch Stimulation mit IL-2 jedoch deutlich zu.

4.2.2.3 NKG2A/CD94

Nach einer Woche Biobran war bei 8 der 10 Probanden eine leichte Abnahme der NKG2A⁺/94⁺-Zellen zu sehen. Der Mittelwert sank von 8% auf 6,5%. Nach zwei Wochen stiegen die Werte, mit einer Ausnahme, wieder auf höhere Werte an (9%) und sanken nach Absetzen wieder leicht ab (7,8%). Bei Betrachtung der einzelnen Zellpopulationen ist es schwierig einen gemeinsamen Nenner zu finden. Ungefähr die Hälfte aller NK-Zellen war positiv für NKG2A und CD94 und unterlag durch Biobran keinen Schwankungen. NKT-, und besonders T-Zellen, exprimierten dieses Heterodimer kaum. Es ist deshalb schwierig die Ergebnisse zu bewerten, da wenige Ausreißer, bei insgesamt wenigen Zellen, große Schwankungen hervorrufen. Auch bei NKG2A⁻/94⁺-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede durch Biobran beobachtet werden.

4.2.2.4 KIR-Rezeptoren

Bei den KIR-Rezeptoren CD158a, CD158b und CD158e ist kaum eine Veränderung durch Biobran sichtbar. CD158a⁺/3⁻-Zellen ließen sich bei 7 der 10 Probanden nach einer Woche Biobran-Einnahme etwas weniger detektieren. Nach zwei Wochen nahm die Zahl dieser Zellen jedoch bei 8 der 10 Probanden höhere Werte an als zu Beginn und nach Absetzen pendelten sich die Werte wieder auf dem Ausgangsniveau ein (Durchschnittswerte: vor Biobran: 2,8%, nach einer Woche Biobran: 2,2%, nach 2 Wochen Biobran: 3,3% und nach Absetzen: 2,8%). Der Rezeptor CD158b war nach einer Woche Einnahme von Biobran bei 6 von 10 Probanden auf mehr NK-Zellen nachzuweisen als zuvor. Berechnet man jedoch den Mittelwert, ist eine leichte Abnahme von 3,4% auf 3,1% zu verzeichnen. Nach der zweiten Woche Biobran exprimierten, mit einer Ausnahme, alle Probanden verstärkt CD158b⁺/3⁻-Zellen (Durchschnitt: 3,9% der Zellen). Nach Absetzen sank dieser Wert im Mittel wieder auf 3,4% ab. Untersucht man die Probanden einzeln, steigt die Anzahl der CD158b exprimierenden Zellen bei 6 Probanden, während sie nur bei vieren fällt. Auch bei CD158e sind von Proband zu Proband sehr unterschiedliche Tendenzen sichtbar, allerdings nahm auch hier im Durchschnitt die Zahl der für diesen Rezeptor positiven Zellen nach einer Woche leicht ab (von 2,6% vor Biobran auf 2,1% nach einer Woche). Nach zwei Wochen ist eine minimale Zunahme auf 2,8% sichtbar und nach Absetzen eine erneute Abnahme auf 2,3%.

Betrachtet man also zusammenfassend die Mittelwerte, ist nach einer Woche Biobran-Einnahme bei allen drei KIRs eine leichte Abnahme, nach zwei Wochen eine Zunahme

4 Ergebnisse

über das Ausgangsniveau und nach Absetzen wieder ein Rückgang dieser Zellen sichtbar. Bei den CD3⁺-Zellen, die KIR-Rezeptoren exprimieren, handelt es sich um NKT-Zellen. Für CD158a⁺/3⁺- und CD158b⁺/3⁺-Zellen lässt sich der oben beschriebene Trend fortsetzen. Im Durchschnitt sinken die Werte nach einer Woche leicht ab, steigen nach zwei Wochen über das Ausgangsniveau und sinken nach Absetzen wieder. CD158b⁺/3⁺-Zellen werden im Schnitt bereits nach einer Woche verstärkt gebildet und nehmen nach zwei Wochen nochmal zu, bevor sie nach Absetzen von Biobran wieder sinken. Allerdings sind auch dies nur die Mittelwerte und die Zu-/bzw. Abnahmen sind bei jedem Probanden sehr individuell.

4.2.2.5 CD56

CD56 ist eine Isoform des Nervenzell-Adhäsionsmoleküls und wird im peripheren Blut von NK-Zellen sowie einer kleinen Anzahl CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen exprimiert. Sein Referenzbereich liegt bei 5-15% der normalen peripheren Lymphozyten. Bei unseren Untersuchungen zur Expression dieses Moleküls stellten sich durch Biobran nur leichte Veränderungen ein. So konnte nach zweiwöchiger Einnahme bei 8 der 10 Probanden eine Erhöhung der CD56⁺/3⁻- Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Die Mittelwerte weisen mit einem p von 0,0401 statistische Signifikanz auf. Nach der ersten Woche war allerdings zunächst ein leichter Rückgang zu beobachten (Mittelwerte: 10,5% vs. 9%), ebenso sank ihre Zahl nach Absetzen von Biobran (Mittelwert: 10,7%). Bei den CD56⁺/3⁺- Zellen ist kaum ein Trend unter Biobran auszumachen. Ihre Zellzahl sinkt, mit einer Ausnahme, bei allen Probanden nach einer Woche leicht ab und steigt nach zwei Wochen bei allen bis auf zweien wieder auf Werte ähnlich dem Ausgangsniveau an. Die CD56⁻/3⁺- Zellen nahmen bei unseren Versuchen einen Anteil von 56,23% bis 86,94% der PBMCs an, durch Biobran konnten keine einheitlichen Schwankungen beobachtet werden.

4.2.2.6 CD16

CD16 ist ein Zelloberflächenmolekül, welches auf Neutrophilen, Monozyten und NK-Zellen exprimiert wird und als niedrigaffiner IgG-Rezeptor fungiert. Auf NK-Zellen ist CD16 verstärkt auf der Subpopulation der CD56(dim)-Zellen exprimiert, welche hauptsächlich für die natürliche Zytotoxizität verantwortlich sind. Mit den Mittelwerten 89,3% vor Beginn der Einnahme von Biobran, 87,7% nach einer Woche, 90,6% nach zwei Wochen und 87,3% nach Absetzen von Biobran sind für CD56⁺/3⁻/16⁺-Zellen keine nennenswerten Unterschiede zu beobachten, genauso wenig wie für die Population der CD56⁺/3⁻/16⁻-Zellen.

Die Subpopulation der CD56⁺⁺(bright) Zellen hat die Eigenschaft, auf Aktivierung durch

4 Ergebnisse

Monozyten, verstärkt durch Zytokinsekretion zu reagieren. Ihre natürliche Zytotoxizität ist weniger ausgeprägt und sie exprimieren wenig bis kein CD16 auf ihrer Zelloberfläche. Während sich nach einer Woche Biobran keine Veränderung der prozentualen Anzahl dieser Zellen bemerkbar machte, konnte bei 8 der 10 Probanden nach zwei Wochen ein leichter Rückgang verzeichnet werden (Mittelwert sank von 9,3% zu Beginn und nach einer Woche auf 7,4% nach zwei Wochen). Nach Absetzen stiegen die Werte wieder auf 10,2% an. Klammert man einen Ausreißer aus, so sinkt dieser Wert auf 8,8%.

4.2.2.7 NKG2D

NKG2D ist ein aktivierendes Homodimer, welches konstitutiv auf NK-Zellen exprimiert wird. Die Anzahl der NK-Zellen wurde deshalb durch die Einnahme von Biobran kaum beeinflusst (Mittelwerte: vorher 92,7%, nach einer Woche 89,3%, nach zwei Wochen 93% und nach Absetzen 87,8%). Bei 7 der 10 Probanden war nach einer Woche eine geringere Anzahl NKG2D⁺-Zellen zu beobachten. Nach zwei Wochen stieg die Anzahl dieser Zellen bei 7 Probanden jedoch wieder auf höhere Werte als zu Beginn, bei 9 Probanden auf höhere Werte als nach einer Woche Biobran-Einnahme. Bei den NKT-Zellen wurden die Probanden, bei denen zu Beginn nur verhältnismäßig wenige NKG2D⁺-Zellen detektiert wurden, gesondert ausgewertet. Bei allen war eine Steigerung der NKG2D⁺-Zellen unter Biobran-Einfluss erkennbar (von 68,5%/18,2% vor Biobran auf 80%/78,6% nach einer Woche, auf 78,5%/71% nach zwei Wochen, auf 79,5%/74,6% nach Absetzen von Biobran). Vier der Probanden exprimierten vor der Einnahme von Biobran nur eine geringe Anzahl NKG2D⁺-T-Zellen (13,2%). Hierbei handelte es sich um dieselben vier Probanden, die auch nur wenige NKG2D⁺- NKT- Zellen exprimierten. Nach einer Woche stieg die Zahl der NKG2D⁺- T-Zellen dieser Probanden auf im Durchschnitt 30,5% und stagnierte bei den weiteren Untersuchungen auf diesem Niveau. Auch innerhalb der anderen Gruppe ist bei 4 der 6 Probanden eine leichte Zunahme der NKG2D⁺Zellen zu beobachten, der sich im weiteren Verlauf kaum ändert.

4.2.2.8 CD226

Das Antigen CD226 wird auf NK-Zellen, sowie CD4⁺- und CD8⁺-Zellen konstitutiv exprimiert. Es ließ sich somit weder durch Biobran-Einnahme, noch durch Stimulation mit IL-2 in-vitro, eine zusätzliche Steigerung der Anzahl der CD226⁺-NK-, NKT- und T-Zellen erzielen. Betrachtet man jedoch alle Zellen, also auch die CD56⁻/3⁻-Zellen, so ist durch IL-2 eine deutliche Steigerung erkennbar, allerdings unabhängig von der Biobran-Einnahme.

4.2.2.9 NKp44/46/30

Diese drei Rezeptoren gehören zur Familie der Natural Cytotoxicity Receptors (NCR). Sie werden nur auf NK-Zellen exprimiert. Während NKp30 und NKp46 unabhängig vom Aktivierungszustand einer Zellen exprimiert werden, ist der NKp44-Rezeptor ein Marker für die Aktivierung einer NK-Zelle. Die Expression auf den NK-Zellen schwankt von Individuum zu Individuum sehr stark. Im vorliegenden Versuch wurde NKp44 praktisch zu keinem Zeitpunkt exprimiert, auch nicht unter Biobran-Einfluss. Die Anzahl NKp46⁺-Zellen sank nach einer Woche Biobran bei 7 Probanden ab, stagnierte bei zweien und stieg bei einem Probanden leicht an. Im Mittel sank sie von 10,7% auf 9%. Ähnlich verhielt es sich für NKp30: bei denselben 7 Probanden fiel die Anzahl der NKp30⁺-Zellen ab, bei den anderen drei Probanden stieg sie leicht an. Der Mittelwert sank insgesamt von 8,9% auf 7%. Nach der zweiten Woche Biobran-Einnahme stiegen die Werte, mit einer Ausnahme, sowohl für NKp46⁺-Zellen (Mittel: 12,2%) als auch für NKp30⁺-Zellen (Mittel: 10,8%) wieder an, allerdings erreichten nur 7 Probanden höhere Werte als zu Beginn. Nach Absetzen sank die Anzahl an positiven Zellen wieder leicht ab. Bei Betrachtung der einzelnen Probanden lässt sich jedoch kein einheitlicher Trend beobachten. Derselbe Trend ist auch für NKp46⁺/NKp30⁺-Zellen zu sehen.

4.2.3 Zytokinaktivitätsmessung

Bei allen Probanden wurde bei jeder der vier Blutentnahmen zusätzlich eine Zytokinaktivitätsmessung durchgeführt. Die Serumröhrchen wurden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur Messung, nach dem in Abschnitt 3.5 beschriebenen Schema, eingefroren. Der Zytokinaktivitätstest wurde für die Zytokine IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α durchgeführt.

4.2.3.1 IL-2

IL-2 wurde schon in der Einleitung ausführlich beschrieben. In diesem Versuch konnte eine eindeutige Aktivitätssteigerung von IL-2 unter Biobran nur bei 2 Spendern detektiert werden. Die maximale Aktivität wurde bei beiden nach zwei Wochen Einnahme von Biobran gemessen. Bei den restlichen Spendern konnte keine nennenswerte Aktivität beobachtet werden.

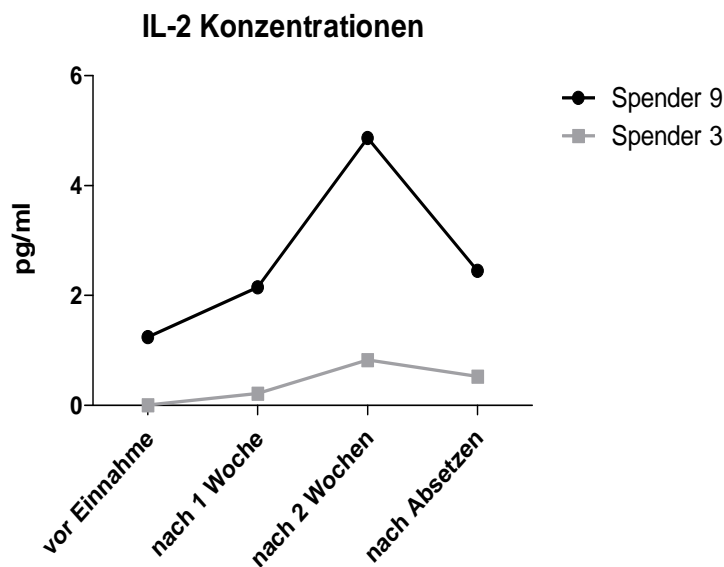


Abbildung 4.34: IL-2 Aktivität im Serum zweier gesunder, freiwilliger Spender. Es ist eine deutliche Steigerung der IL-2 Konzentration unter Biobran sichtbar, die nach Absetzen wieder abklingt.

4.2.3.2 TNF- α

TNF- α ist ein Zytokin, das von Makrophagen sezerniert wird und dessen Freisetzung durch LPS-tragende Pathogene stimuliert wird. Es induziert in Endothelzellen die schnelle Freisetzung von Granula, die man als Weibel-Palade-Körperchen bezeichnet und die P-Selektin enthalten. Die Ausschüttung von TNF- α durch Makrophagen induziert lokal schützende Effekte, bei systemischer Freisetzung kann es jedoch schädliche Wirkung haben und zum Schock führen. Allgemein sorgt TNF- α bei Blutgefäßen für einen gesteigerten Blutfluss, eine erhöhte Durchlässigkeit für Flüssigkeiten, Proteine und Zellen sowie eine stärkere Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten. Desweiteren gehört TNF- α zu den endogenen Pyrogenen und ist somit in der Lage Fieber auszulösen. Es stimuliert zusammen mit IL-1 und IL-6 Hepatozyten zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen und es regt das Endothel des Knochenmarks dazu an, neutrophile Zellen freizusetzen.

Im Versuch war TNF- α bei allen Probanden nachweisbar, eine kontinuierliche Zunahme der Aktivität konnte wiederum nur bei Spender 3 und 9 mit Maximalwerten nach Absetzen von Biobran beobachtet werden. Bei den übrigen Probanden schwankte die Aktivität sehr stark, sodass keine Kontinuität erkannt werden konnte. Fasst man alle Spender zusammen, ist eine Steigerung sichtbar, die jedoch hauptsächlich auf den hohen Werten von Spender 3 und 9 basiert.

4 Ergebnisse

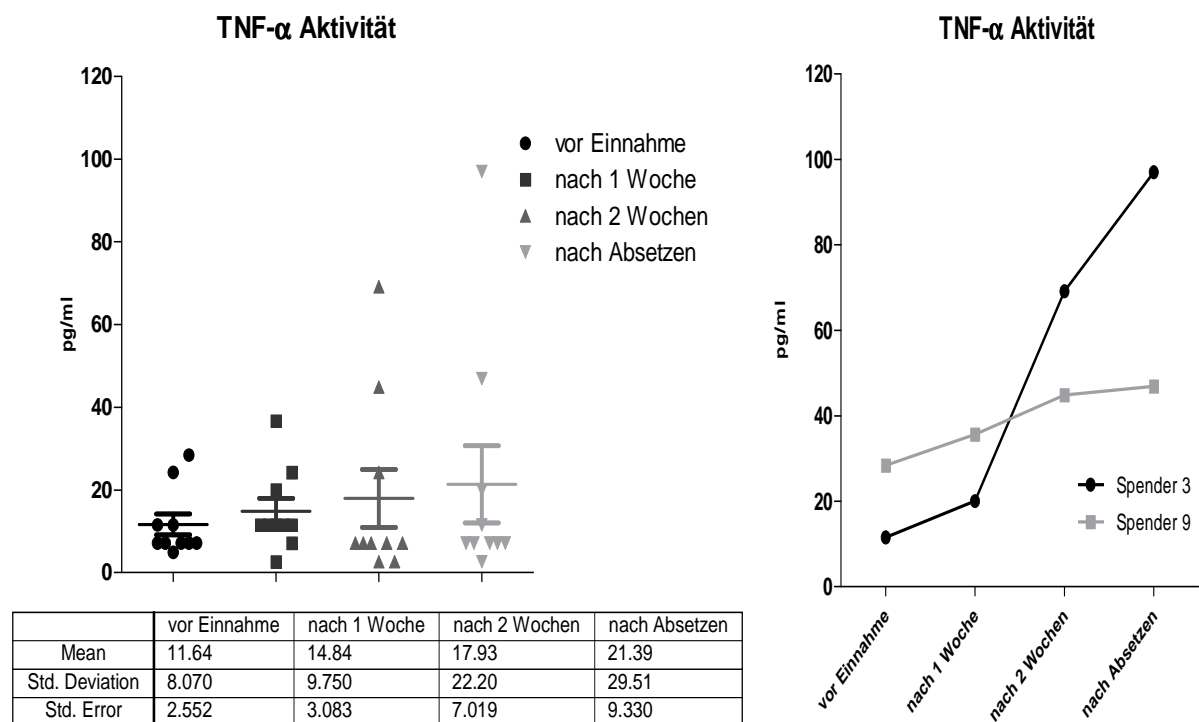


Abbildung 4.35: TNF- α Aktivität im Serum gesunder, freiwilliger Spender. Im ersten Schaubild sind die Werte aller 10 Spender dargestellt, im zweiten Schaubild nur die von Spender 3 und 9. Bei ihnen ist über die 4 Wochen eine kontinuierliche Zunahme zu beobachten, auch noch nach Absetzen von Biobran.

4.2.3.3 IFN- γ

Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) werden gebildet, wenn Zellen mit Viren infiziert werden. Allerdings wird IFN- γ nicht direkt durch eine Virusinfektion induziert, sondern es entsteht später und besitzt eine wichtige Funktion bei der induzierten Reaktion auf intrazelluläre Pathogene.

Interferone tragen über verschiedene Mechanismen zur Abwehr von Virusinfektionen bei. Sie erzeugen in nicht infizierten Zellen eine Resistenz gegenüber der Virenreplikation. Zudem verstärken sie die zelluläre Immunantwort, indem sie die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen induzieren und dadurch die Resistenz dieser Zellen gegenüber NK-Zellen erhöhen. Bei virusbefallenen Zellen hat das den Vorteil, dass diese dadurch für die Abtötung durch zytotoxische CD8-T-Zellen empfindlicher werden. Desweiteren aktivieren Interferone NK-Zellen.

IFN- γ kann auch in großer Menge durch NK-Zellen hervorgerufen werden, wenn diese durch IL-12 und TNF- α stimuliert werden. Dies ist für die Eindämmung einiger Infektionen von entscheidender Bedeutung, bevor T-Zellen zur Zytokinproduktion angeregt werden.

4 Ergebnisse

IFN- γ Aktivität war bei allen Probanden nachweisbar. Bei den Spendern 7 und 9 war nach zwei Wochen das Maximum erreicht, bei Spender 1 war der höchste Wert bereits nach einer Woche sichtbar und hielt sich auch nach der zweiten Woche auf dem gleichen Niveau. Bei den Spendern 6, 8 und 10 kam es bereits nach einer Woche Biobran zum Maximalwert, der nach der zweiten Woche schon nicht mehr erreicht wurde. Bei den restlichen Probanden war entweder keine oder eine schwankende Aktivität nachweisbar. Im Folgenden Schaubild ist zunächst eine Zusammenfassung aller Proben gezeigt, dann beispielhaft die IFN- γ Aktivität von Spender 9.

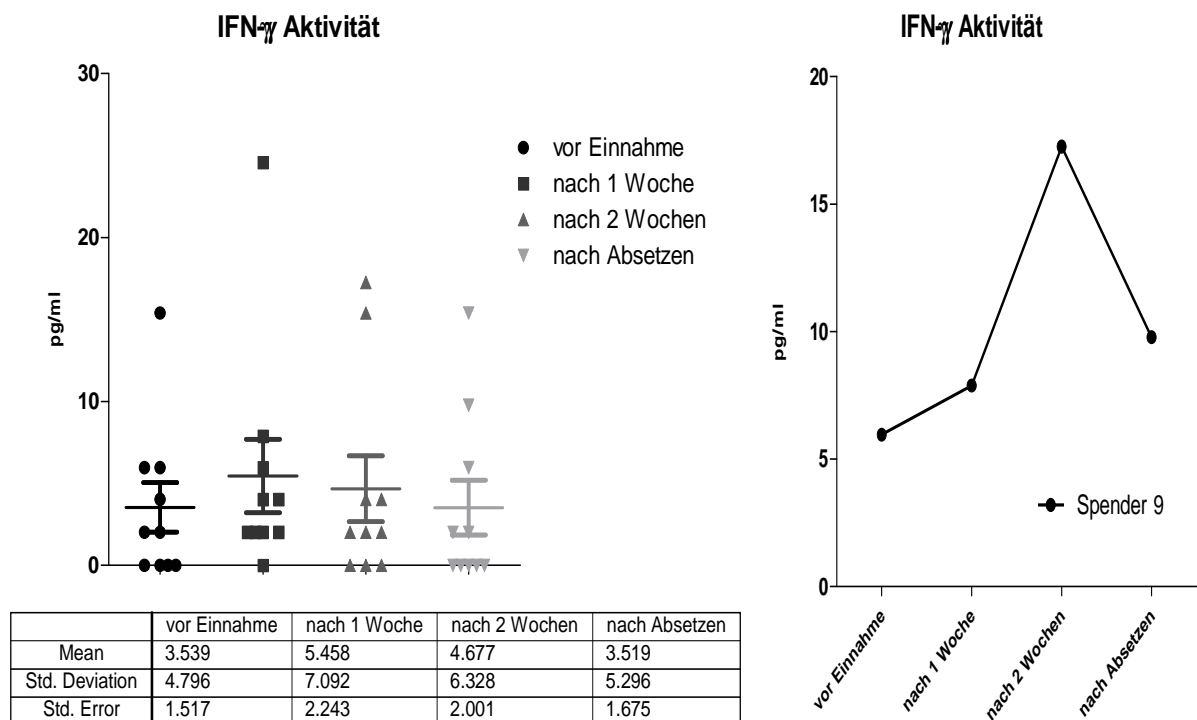


Abbildung 4.36: IFN- γ Aktivität im Serum gesunder, freiwilliger Spender, vor Biobran-Einnahme, nach einer Woche, nach zwei Wochen und zwei Wochen nach Absetzen von Biobran. Im ersten Schaubild sind die Werte aller 10 Spender dargestellt, im zweiten Schaubild nur die von Spender 9. Nur bei ihm konnte eine Zunahme durch Biobran und erneute Abnahme der IFN- γ Konzentration nach Absetzen beobachtet werden.

4.2.3.4 IL-5, IL-10, IL-12, GM-CSF

Bei diesen Zytokinen konnte tendenziell weniger Aktivität gemessen werden. Auch hier stechen die Probanden 3 und 9 hervor, bei denen Aktivitätssteigerung und -abnahme am deutlichsten hervortreten: Bei Proband 9 ist bei allen Zytokinen eine deutliche Steigerung der Aktivität nach zwei Wochen Biobran Einnahme sichtbar. Mit Ausnahme von GM-CSF ist dies auch bei Proband 3 der Fall. Bei allen anderen Spendern ist entweder

4 Ergebnisse

keine oder kaum Aktivität beobachtet worden oder keine klare Linie sichtbar.

Im Folgenden ist noch einmal ein Überblick der Zytokinaktivitäten der Spender 3 und 9 gegeben:

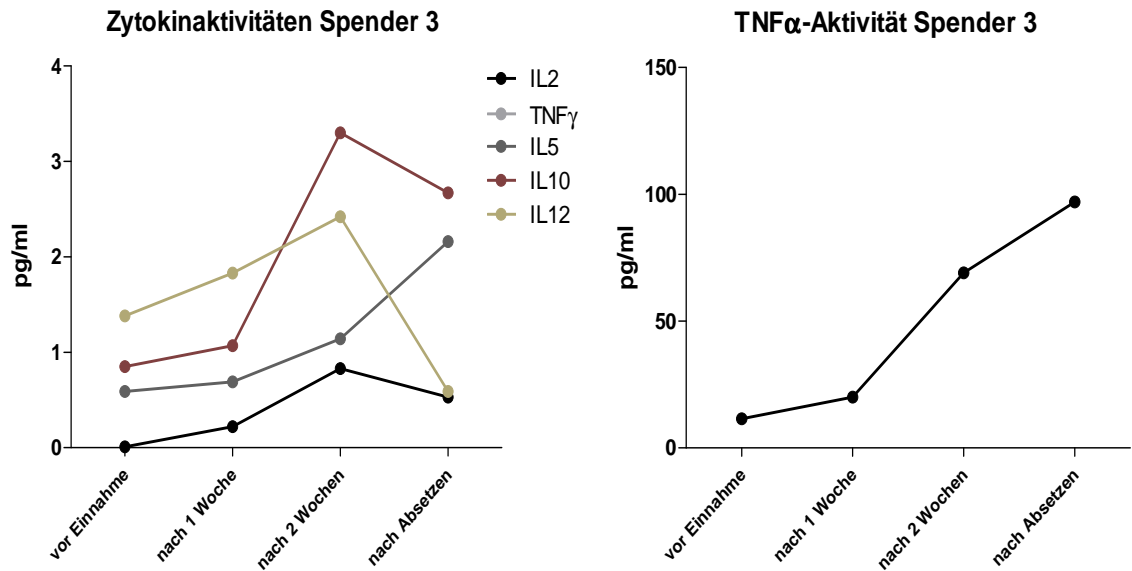


Abbildung 4.37: Zytokinaktivitäten Spender 3

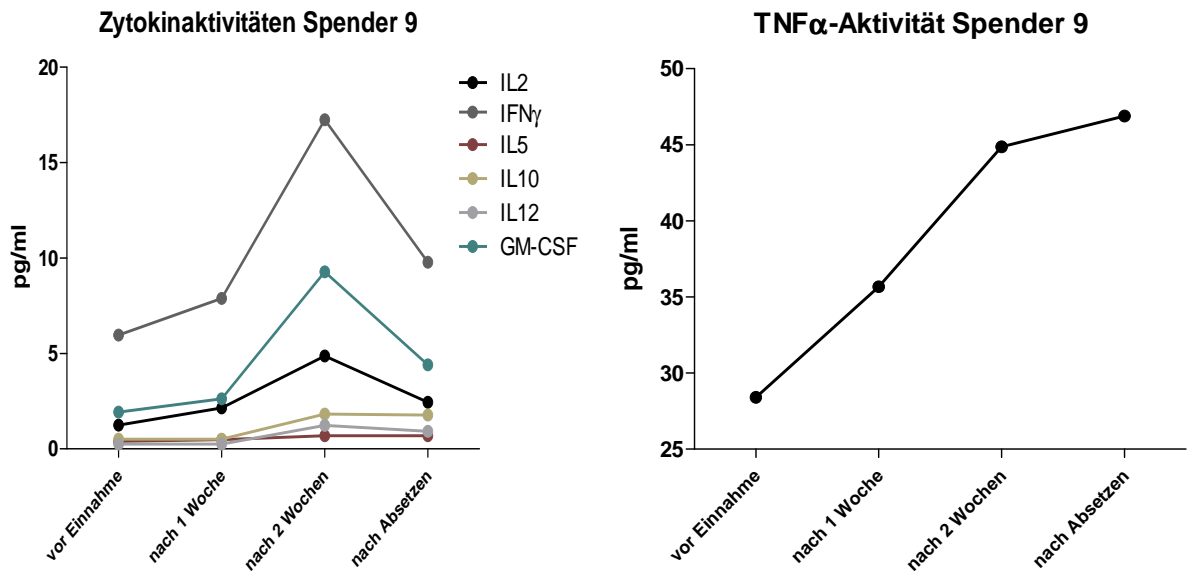


Abbildung 4.38: Zytokinaktivitäten Spender 9

5 Diskussion

NK-Zellen nehmen eine wichtige Funktion zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem ein. Viele Studien haben gezeigt, dass ihnen eine Schlüsselrolle in der natürlichen Abwehr gegen Tumorzellen [69] und Viren [5], sowie bei der Stammzelltransplantation zukommt. Viele weitere Funktionen, wie z.B. die Bekämpfung von Parasiten, HIV, Asthma oder auch von Autoimmunität werden angenommen, konnten aber bislang noch nicht eindeutig aufgeklärt werden [112]. Dieses vielseitige Spektrum der NK-Zellen hat in der Wissenschaft großes Interesse geweckt, vor allem im Hinblick auf ihre mögliche Funktion in der Krebsbekämpfung.

Maligne Erkrankungen stellen in den Industrieländern nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. In Deutschland erkranken jedes Jahr rund 420.000 Menschen an Krebs. Die traditionelle Krebsbehandlung besteht aus den drei Säulen von Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie. Trotz der großen Fortschritte in diesen Bereichen, sowie der Verbesserung der Maßnahmen zur Tumorfrüherkennung und mitbedingt durch die steigende Lebenserwartung, steigt die Anzahl an Krebsneuerkrankungen. Ebenso konnte für eine Lebenszeitverlängerung tumor Erkrankter Patienten im fortgeschrittenen Stadium bislang kein großer Erfolg verbucht werden. Durch klarere Einsichten und Forschung im Bereich der Tumormunologie und Mikrobiologie und ein besseres Verständnis der immunologischen Mechanismen beim Kampf des Immunsystems gegen entartete Zellen, hat sich in den letzten Jahren die Immuntherapie als weitere Säule der Krebstherapie etabliert. Hierbei gibt es verschiedene Ansatzpunkte, von zellulärer Immuntherapie mit LAKs, TILs und dendritischen Zellen, über Zytokintherapien bis hin zu monoklonalen Antikörpern.

Betrachtet man die Immuntherapie mit Hilfe von Zytokinen fällt schnell auf, dass diese bei höherer Dosierung mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen verbunden ist. IL-2 ist beispielsweise für die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms sowie des malignen Melanoms zugelassen. Während niedrige Dosen relativ gut vertragen werden bzw. nur leichte Nebenwirkungen hervorrufen [70], können bei höherer Dosierung unerwünschte Wirkungen auftreten. Diese umfassen beispielsweise Übelkeit, Durchfall, Erbrechen, Fieber, Vascular Leak Syndrome, Hypotonie, Tachykardie, Dyspnoe und vieles mehr [21]. In einigen Studien kam es sogar zu therapiebedingten Todesfällen [94]. Es wäre somit

wünschenswert Ansätze zu finden, die die Wirkung von IL-2 oder anderen Zytokinen verstärken oder selbst stimulierend auf das Immunsystem wirken, ohne eine Potenzierung der Nebenwirkungen zu entfalten. Hier setzt die Forschung an Nahrungsergänzungspräparaten an, die dem Körper auf natürliche Weise helfen sollen, das Immunsystem gegen entartete Zellen zu stärken. In der vorliegenden Arbeit beschäftigten wir uns mit dem Nahrungsergänzungspräparat Biobran/MGN-3. Erste Forschungen dazu fanden Ende der 80er/ Anfang der 90er Jahre in Asien durch Ghoneum, Maeda und Ninomiya statt. Das Präparat soll einen immunmodulatorischen Effekt haben und der Fokus der Forschung liegt vor hauptsächlich im Bereich der Stimulierung und Aktivierung von NK-Zellen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde in-vitro die Wirkung von Biobran gegenüber CD56⁺-Zellen mit Hilfe des BATDA-Release-Assay getestet. Die Zellen stammten von freiwilligen gesunden Spendern, als Targetzellen dienten die vier Tumorzelllinien K562, A204, RH30 und RD. In einem weiteren Schritt wurden die NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. So sollten eventuelle Veränderungen der Oberflächenmoleküle Rückschlüsse auf den möglichen Wirkmechanismus von Biobran geben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von Biobran in-vivo an 10 gesunden freiwilligen Probanden untersucht. Dabei wurde Biobran über einen Zeitraum von zwei Wochen drei mal täglich eingenommen und Blutentnahmen zur Untersuchung der Zellen fanden vor der Einnahme, nach einer Woche, nach zwei Wochen sowie zwei Wochen nachdem Biobran schon abgesetzt war, statt. Untersucht wurde wieder die Zytotoxizität der NK-Zellen im Hinblick auf die Lysierbarkeit verschiedener Targetzellen. Zur Anwendung kamen K562, A204 und cALL Blasten. Des Weiteren wurden die PBMCs der Probanden ebenfalls einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen, sowie ihr Serum auf Zytokinaktivität untersucht.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Zellanreicherung mit MACS

Die Anreicherung von Lymphozytensubpopulationen durch den Einsatz von magnetisch markierten Antikörpern ist inzwischen ein etabliertes Standardverfahren, bei dem eine Reinheit der Zellen von bis zu 99% erreicht werden kann [73, 26]. Die Vitalität, das Proliferationsverhalten und die Funktionsfähigkeit werden durch die Markierung und Separation nicht beeinflusst [71]. Bei dieser Methode wurden nicht reine NK-Zellen, sondern auch NKT und CD56⁺- T-Zellen mit angereichert. Auf eine weitere Depletion wurde absichtlich verzichtet, um auch diese Zellen durchflusszytometrisch auf Veränderungen ihrer Oberflächenantigene durch IL-2 und Biobran zu untersuchen.

5.1.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein einfaches und schnelles Verfahren zur immunologischen und morphologischen Phänotypisierung von mononukleären Zellen und erlaubt die Untersuchung einer großen Zellzahl auf verschiedene Oberflächenantigene in kurzer Zeit. Schwierigkeiten ergaben sich bei der Auswertung einzelner Antigene, da diese zum Teil nicht sehr stark exprimiert wurden. Da jedoch auch immer für das jeweilige Molekül negative Zellen in der Probe vorhanden waren, konnte in allen Fällen eine Abgrenzung zwischen negativen und positiven Zellen getroffen werden. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich, wenn eine Probe generell wenige Zellen enthielt und somit einzelne Extremwerte großen Einfluss auf die Mittelwerte der Auswertung hatten. Diese mussten in der Auswertung teilweise ausgeklammert werden.

5.1.3 Zytotoxizitätstest

Als Alternative zu dem weit verbreiteten ⁵¹Chromfreisetzungstest wurde ein nichtradioaktiver BATDA-Release-Assay verwendet, wie er von Blomberg et al. beschrieben wurde und inzwischen etabliert ist [7]. Die Qualität der Messergebnisse des BATDA-Release-Assay wird wie beim Chromfreisetzungstest auch durch die spontane Freisetzung von TDA bzw. Chrom beeinträchtigt. Ist der Unterschied zwischen Spontan- und Maximallyse zu gering, müssen Tests wiederholt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Diese Spontanlyserate ist zunächst abhängig vom Zustand der Zellen, kann aber auch Targetzell-spezifisch variieren. Sie kann jedoch durch einen schonenden Umgang mit den Zellen bei vielen Zelllinien unter 30% gehalten werden. Dieser Wert konnte bei den meisten der durchgeführten Versuche unterschritten werden. Zudem kann man tote Zellen beim Zählen in der Neubauerkammer identifizieren. Bei den wenigen Versuchen, bei denen sie in hoher Zahl vorlagen, wurde einfach ein zusätzlicher Waschschrift vorgenommen. Ein weiteres Maß für die Beurteilung eines Zytotoxizitätstest stellt die - in Abhängigkeit vom eingesetzten Effektor/Target-Verhältnis - absinkende Lyserate dar. Das einzige Problem, das sich bei vielen Tests vor allem bei in-vitro Stimulation einstellte, war die oftmals höhere Lyserate bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 als bei der Maximallyse. In diesen Fällen wurde der höchste Wert als Maximallyse festgelegt und alle anderen Werte entsprechend umgerechnet.

5.2 Einfluss von Biobran und IL-2 auf die Zytotoxizität von NK-Zellen

In-vitro Stimulation

Nach Anreicherung der CD56⁺-Zellen von gesunden freiwilligen Spendern wurde deren Funktionalität gegenüber den vier Zellreihen K562, A204, RD und RH30 überprüft. Getestet wurde eine mögliche Stimulierbarkeit der Zytotoxizität der NK-Zellen durch IL-2, Biobran und eine Kombination aus beidem. Bei allen Ansätzen war ein signifikanter Unterschied der stimulierten Zellen im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen sichtbar. Die höchsten Lyseraten wurden in allen Versuchen bei 1000 U/ml IL-2 erreicht. Ein Summationseffekt bei kombinierter Inkubation der NK-Zellen mit 40 U/ml IL-2 und Biobran zeigte sich ebenfalls durchgehend bei allen Versuchsreihen. Als problematisch erwies sich lediglich die teilweise schon sehr hohe Aktivität der unstimulierten NK-Zellen, mit Lyseraten von bis zu 100%, sodass theoretisch eine Steigerung gar nicht mehr möglich war. Hierdurch lässt sich evtl. erklären, dass die Unterschiede der Zytotoxizität stimulierter NK-Zellen im Gegensatz zu nicht-stimulierten Zellen bei niedrigen E:T-Verhältnissen eindeutiger ausfielen. Allerdings war dies nur bei K562 und RH30 der Fall, bei den anderen beiden Zellreihen ließ sich dieser Trend nicht eindeutig beobachten.

Bei Betrachtung der einzelnen Probanden waren große individuelle Unterschiede der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den Targetzellen sichtbar. In unseren Untersuchungen konnte dabei kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen HLA-Typen der Spender und den Tumorzelllinien und einer damit einhergehenden NK-Alloreaktivität bzw. Inhibition festgestellt werden. In der Literatur wird dies zum Teil kontrovers diskutiert. Viele Studien weisen darauf hin, dass ein KIR-Liganden Mismatch zwischen Spender und Empfänger bei Stammzelltransplantation zu einem verbesserten Outcome führt [65, 116]. In einer Studie aus Minnesota konnte diesbezüglich jedoch kein Unterschied festgestellt werden [19].

In-vivo Stimulation

Die Zytotoxizitätstests der zweiten Versuchsreihe, bei denen eine in-vivo Stimulation der NK-Zellen durch Einnahme von Biobran stattfand, fielen weniger eindeutig aus, als die der reinen in-vitro Versuchsreihe. Als Targetzellen kamen K562, A204 und cALL-Blasten zum Einsatz. Eine kontinuierliche Steigerung der Lyseraten im Laufe der Anwendung von Biobran konnte nur beim Test gegen K562 beobachtet werden, mit Maximalwerten nach einer Woche Einnahme von Biobran. Schon die Rhabdomyosarkomzelllinie A204 erwies sich als widerstandsfähiger gegenüber den Effektorzellen und durch Biobran weniger be-

5 Diskussion

einflussbar. Die Blasten waren noch widerstandsfähiger und ließen sich von Anfang an nur sehr schwer lysieren. Diese geringe Aktivität der NK-Zellen lässt sich wahrscheinlich auf eine Interaktion ihrer KIR-Rezeptoren mit den HLA-Molekülen der Blasten und einer damit einhergehenden Hemmung der Aktivität zurückführen. Auch durch Biobran war kein steigernder Effekt sichtbar, die Zytotoxizität der NK-Zellen war nach Biobran-Einnahme sogar teilweise schlechter.

Bei allen Zellreihen durchgehend zu beobachten war eine statistisch signifikante Steigerung der spezifischen Lyse durch zusätzliche in-vitro Stimulation mit 40 U/ml IL-2. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisherigen Forschungsergebnissen, die in der Literatur veröffentlicht wurden. Allerdings konnte nicht beobachtet werden, dass eine längere Stimulation mit Biobran (2 Wochen) die NK-Zellen für die Effekte von IL-2 sensibler machte. Die Lyseraten fielen unter zusätzlicher IL-2 Stimulation durchweg höher aus. Der Faktor um den sich die Lyseraten nach zwei Wochen im Vergleich zu einer Woche steigern ließen, war jedoch nicht höher, als derjenige ohne IL-2 Stimulation.

Die Beobachtungen dieser Versuche im Hinblick auf IL-2 decken sich mit den bisher in der Literatur beschriebenen: IL-2 war 1965 das erste Interleukin das entdeckt wurde [37, 50]. Zehn Jahre später beschrieb Morgan ein Glykoprotein, das in der Lage war T-Lymphozyten aus menschlichem Knochenmark in-vitro wachsen zu lassen [75]. IL-2 wurde als TCGF (T-cell growth factor) bekannt [99] und Anfang der 80er Jahre konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass bei Inkubation von PBMCs oder Lymphozyten mit IL-2 Zellen generiert werden können, die in der Lage sind frische gen-identische oder allogene Tumorzellen zu lysieren [67, 118]. Diese Zellen wurden LAK Zellen genannt (Lymphokin-aktivierte Killerzellen) und können durch Inkubation von Lymphozyten mit rekombinantem gereinigtem IL-2 sehr effektiv angereichert werden [91]. Biron bestätigte in einem seiner Versuche, dass IL-2 in der Lage ist NK-Zellen zu Proliferation und Expansion zu bewegen [6]. Durch diese viel versprechenden Ergebnisse an Tiermodellen und die seit 1983 mögliche gentechnische Herstellung von IL-2, testeten Rosenberg et al. IL-2 seit 1984 auch in klinischen Studien am Menschen, sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit autologen LAK-Zellen. Die Ergebnisse sind unterschiedlich, die besten zeigten sich jedoch mit einer Effektivität von 15-30% beim Nierenzellkarzinom und beim malignen Melanom. Durch die Kombinationstherapie mit LAK konnte jedoch kein nennenswerter zusätzlicher Erfolg erzielt werden [92, 94]. Heute kommt eine Immunmonotherapie mit IL-2 gemäß den AWMF-Leitlinien beim fortgeschrittenen malignen Melanom mit palliativer Indikation oder kombiniert mit Zytostatika als Chemoimmuntherapie zum Einsatz [25]. Umstritten ist die Anwendung von IL-2 beim metastasierten Nierenzellkarzinom: Langzeitremissionen wurden bei hoch dosierter intravenöser Gabe

5 Diskussion

zwar gelegentlich beobachtet, gegenüber IFN konnte in einer Metaanalyse jedoch kein sicherer positiver Effekt beobachtet werden. Auf Grund der starken Nebenwirkungen kommt IL-2 in dieser Form in Deutschland praktisch nicht zum Einsatz. Für niedrig dosierte subkutane IL-2 Injektion konnte bisher keine Wirksamkeit nachgewiesen werden. Einzig in Kombination mit IFN und 5-Floururacil wird IL-2 empfohlen (Empfehlungsgrad A) [2].

Biobran wurde das erste Mal 1992 in Japan von Hiroaki Maeda entwickelt. Die Studienlage ist deshalb noch nicht besonders ausgeprägt und Studien wurden bislang hauptsächlich in Asien und hier zu einem Großteil von den Entdeckern und Vermarktern von Biobran durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich zu einem Großteil mit den bis jetzt bereits vorhandenen. So konnte von Ghoneum et al. in verschiedenen Studien in-vivo [30] und in-vitro [34] gezeigt werden, dass durch Biobran sowohl die Aktivität von NK-Zellen auf das bis zu fünffache, als auch parallel dazu die Ausschüttung von INF γ und TNF α gesteigert werden kann: 24 Personen wurden über 2 Monate oral mit verschiedenen Konzentrationen Biobran behandelt (15, 30, 45 mg/kg/Tag). Nach einer Woche, einem Monat und zwei Monaten wurde die NK-Zell Aktivität mit Hilfe des Chrom Release Assay gegen K562 getestet und mit der Ausgangsaktivität verglichen. Die Behandlung mit Biobran führte durchgehend zu einer Steigerung der Aktivität, die umso höher ausfiel, je niedriger die E:T-Verhältnisse waren. Dies deckt sich soweit mit den Beobachtungen der in-vivo Tests dieser Arbeit gegen K562. Das Erreichen signifikanter Steigerungsraten war bei Ghoneum abhängig von der eingenommenen Biobran-Konzentration. Bei Gabe von 15 mg/kg/Tag konnte eine Steigerung auf das doppelte gemessen werden, wohingegen bei Konzentrationen von 30 mg/kg/Tag schon nach einer Woche eine dreifach erhöhte Aktivität gemessen wurde. Mit fortlaufender Behandlung nahm die Aktivität der NK-Zellen weiter zu, bis auf das fünffache zum Ende des Behandlungszeitraumes. Nach Absetzen der Biobran-Einnahme sanken die Werte innerhalb eines Monats wieder auf das Ausgangsniveau ab. Diese Ergebnisse lassen sich nur teilweise mit unseren in Einklang bringen. Eine Steigerung der Zytotoxizität der NK-Zellen kann bestätigt werden. Allerdings fielen die Lyseraten nach der zweiten Woche Einnahme von Biobran geringer aus als nach der ersten Woche, lagen jedoch über dem Ausgangsniveau. Dies könnte an einem Gewöhnungseffekt liegen, wie er bei Biological Response Modifiern häufiger vorkommen kann [104]. Es widerspricht jedoch Untersuchungen von Ghoneum, denen zufolge dieser Effekt bei Biobran bisher nicht zu beobachten war [28]. Außerdem muss auf die nur sehr geringe Probandenanzahl, die fehlende Messung von Serumspiegeln und die verhältnismäßig kurze Einnahmedauer in dieser Arbeit hingewiesen werden, sodass sich aus unseren in-vivo Stimulationsversuchen keine allgemeingültigen Aussagen ableiten

5 Diskussion

lassen. Weiterhin lag keine Kontrolle vor, wie genau und gewissenhaft die Versuchspersonen Biobran einnahmen und auch alltägliche Dinge, wie Stress oder Infektionen haben einen erheblichen Einfluss auf unser Immunsystem. Untersuchungen zum Mechanismus der erhöhten Zytotoxizität ergaben bei Ghoneum keine Veränderung der Anzahl der NK-Zellen jedoch eine vierfach erhöhte Bindungskapazität an Tumorzellen. Experimente mit PBMC-Kulturen, die 16 Stunden bei Konzentrationen zwischen 25-100 mg/ml mit Biobran inkubiert wurden, zeigten dosisabhängig eine 1,3 bis 1,5 fache Erhöhung der NK-Zellaktivität, sowie eine signifikante Steigerung der INF- Produktion auf 340-580 pg/ml [30, 34]. Dies kann sowohl durch unsere in-vitro Versuchsreihe als auch durch einige weitere Studien bestätigt werden [34, 31, 46]. In seiner Studie 2000 beobachtete Ghoneum einen synergistischen Effekt auf die Aktivität von PBMCs bei kombinierter Gabe von Biobran mit IL-2. Keine zusätzliche Aktivitätssteigerung trat jedoch bei Anwendung angereicherter NK-Zellen auf, da deren Aktivität bereits bei Anwendung einer der beiden Komponenten ihr Maximum erreicht hatte [34]. Diese Beobachtung lässt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen insofern in Einklang bringen, dass ein synergistischer Effekt bei Stimulation der NK-Zellen mit Biobran und IL-2 sichtbar war. Dieser war jedoch teilweise bei kleinen E:T-Verhältnissen ausgeprägter, da bei einem Verhältnis von 20:1 bereits unstimulierte NK-Zellen 100%ige Lyseraten erzielten.

In derselben Studie wurde versucht herauszufinden auf welchem Weg Biobran sowohl die NK-Zellaktivität als auch die Sekretion von Zytokinen anregt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass Biobran CD69, ein frühes Aktivierungs-Antigen, CD25, die α -Kette des IL-2 Rezeptors, und CD54, ein Adhäsionsmolekül, hochreguliert. Eine weitere Studie zeigte, dass durch Biobran parallel zur Steigerung der Aktivität von PBMCs auch deren Granularität, Esterase-Aktivität und Konjugation an Antigene zunimmt [31]. Aber auch für B- und T-Zellen konnte eine Steigerung um 200 bis 250% nachgewiesen werden.

Vergleicht man die aktuelle Studienlage von Biobran mit anderen Biological Response Modifiern, die aus ähnlichen Komponenten aufgebaut sind, so sind auch hier ähnliche immunmodulatorische Wirkungen erzielt worden:

Eine Studie von Ogawa zu partiell hydrolysiertem Maishülsen Arabinoxylan (CHAX) bestätigt bei oraler Einnahme eine NK-Zellaktivitätssteigerung um fast das Doppelte, sowie einen Anstieg von IL-2 und IFN- γ bei gesunden Mäusen [79].

In einem 2000 veröffentlichten Paper gibt Ooi einen Überblick über den Stand der Forschung über immunstimulierende Polysaccharide der letzten Jahrzehnte [83]. Hierbei haben vor allem die β -Glukane Schizophyllan, Lentinan und das Protein-gebundenes Polysaccharid PSA (Krestin) immunmodulatorische und anti-tumoröse Wirkung gezeigt

und sie werden in Japan auch schon klinisch eingesetzt. In Studien konnte eine erhöhte in-vitro Aktivität von LAKs bei kombinierter Stimulation mit IL-2 und Lentinan im Vergleich zu alleiniger IL-2 Stimulation nachgewiesen werden [105]. Gleiches konnte auch in einer anderen Studie beobachtet werden, in der die in-vivo Anwendung von Lentinan oder Schizophyllan die in-vitro durch IL-2 ausgelöste Induktion von LAK Zellen verstärkte. Ebenso verstärkte sie die ähnlich induzierte Aktivierung von Killerzellen gegen einen weiten Bereich solider Tumoren bei Mäusen [56]. Der genaue Wirkmechanismus solcher Nahrungsergänzungspräparate ist bis heute nicht exakt aufgeklärt, man geht jedoch von vielen Einflussfaktoren aus: beispielsweise sind Polysaccharide mit β -1-3 Verbindungen effektiver als solche, die hauptsächlich β -1-6 Verbindungen enthalten. Glukanen mit hohem Molekulargewicht wird eine bessere Effektivität zugeschrieben und auch die Konformation spielt eine Rolle. Auf der anderen Seite hängt viel vom Empfängerorganismus ab, z.B. Abstammung, Tumortyp, Dosierung, zeitlich Einnahme usw. Es bleibt weiterhin schwierig bei dieser Fülle verschiedener Polysaccharide und Einflussfaktoren genau zu sagen welche Komponente welchen Effekt hervorruft.

In einer Studie von Badr 2008 [3] wurde die Wirkung von Biobran auf das Ehrlich Sarkom bei Mäusen untersucht. Ergebnisse zeigen, dass der Tumor durch intraperitoneale und durch intratumorale Gabe von Biobran signifikant an Volumen und Gewicht verlor, die Apoptoserate von Tumorzellen auf das 1,8fache anstieg und erhöhte Zytokinspiegel für TNF und IFN, sowie erniedrigte Zytokinspiegel für das immunsupprimierende Zytokin IL-10, gemessen wurden. Des Weiteren wurde bei gesunden Mäusen, denen Biobran über einen Zeitraum von 2 Wochen intramuskulär injiziert wurde, ein Anstieg der NK-Zell Aktivität auf das doppelte beobachtet. Ähnliche Ergebnisse konnte auch Ghoneum in einer weiteren Studie an Mäusen zeigen [31].

5.3 Einfluss von Biobran und IL-2 auf CD-Oberflächenantigene

Über durchflusszytometrische Analysen wurde versucht etwas über den Wirkmechanismus der erhöhten Zytotoxizität der durch Biobran und IL-2 stimulierten NK-Zellen herauszufinden. Es ist bekannt, dass IL-2 verschiedene immunmodulatorische Wirkungen hat und bei verschiedensten Zellpopulationen Proliferation und Expansion induziert. In diesen Untersuchungen konnte ein Einfluss durch IL-2 und Biobran vor allem auf die Oberflächenantigene CD69 und CD25 und in geringerem Ausmaß auch auf NKG2A⁻/94⁺-Zellen nachgewiesen werden.

CD25

Nach erfolgter in-vitro Stimulation konnten CD25⁺-Zellen unter dem Einfluss von Biobran in höheren Mengen als unter IL-2 detektiert werden und NK-Zellen sprachen besser an als NKT-Zellen. Hierbei ist anzunehmen, dass es sich durch Biobran um eine Neuexpression von vorher negativen Zellen handelt. Die Expressionsdichte pro Zelle konnte hingegen durch IL-2 wesentlich mehr gesteigert werden. Durchweg höchste Werte lieferte die Inkubation der Zellen durch IL-2 in Kombination mit Biobran.

Bei der in-vivo-Versuchsreihe konnte durch die zweiwöchige Biobran Einnahme keine Zunahme der CD25⁺-Zellen detektiert werden, weder bei Vergleich der unstimulierten Zellen untereinander noch der mit IL-2 in-vitro stimulierten Zellen. Die Anzahl der CD25⁺-NK-Zellen nahm durch die zusätzliche IL-2 Stimulation zu, die der NKT-Zellen blieb gleich und die der T-Zellen verringerte sich.

Der Einfluss von IL-2 auf die Expression CD25 positiver Zellen ist bekannt. In einer Studie 2001 konnte Dunne nachweisen, dass durch IL-2 die CD25-Expression auf NK-Zellen induziert wird und zur Bildung des hochaffinen Rezeptors IL-2R $\alpha\beta\gamma$ führt [22]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass CD25 auf PBMCs durch Stimulation von IL-2 in Kombination mit MGN-3 hochreguliert wird, und zwar höher als unter IL-2 alleine [34]. Dies galt für alle Lymphozyten, der Effekt war jedoch bei NK-Zellen ausgeprägter. Diese Ergebnisse fanden wir in dieser Arbeit, wie oben beschrieben, bestätigt. In einer früheren Studie 1988 wurde der Zusammenhang der Zytotoxizität der NK-Zellen und der Höhe der CD25 Expression untersucht. Man kam zu dem Ergebnis, dass die NK-Zell Aktivität bereits nach vier Stunden IL-2 Inkubation deutlich zunimmt und nach 18 Stunden ihr Maximum erreicht hat, wohingegen CD25 während dieser Zeit noch nicht auf der Mehrzahl der NK-Zellen exprimiert wird. Somit ist eine direkte Korrelation zwischen diesem Antigen und der NK-Zell-Zytotoxizität unwahrscheinlich [59].

CD69

Bei der in-vitro Stimulation stieg die Anzahl CD69⁺-Zellen sowohl unter IL-2 als auch unter Biobran auf ähnlich hohe Werte und konnte durch Kombination noch einmal enorm gesteigert werden. Die Rezeptordichte auf den einzelnen Zellen verhielt sich ähnlich wie bei CD25: eine leichte Steigerung unter IL-2, keine Veränderung durch Biobran und ein maximaler Anstieg durch kombinierte Stimulation.

Die Ergebnisse der in-vivo Stimulation fielen weniger eindeutig aus: nach einer bzw. zwei Wochen Einnahme von Biobran war ein leichter Anstieg der CD69 exprimierenden Zellen sichtbar, der nach Absetzen wieder rückläufig war. Durch zusätzliche in-vitro Stimulation

5 Diskussion

mit IL-2 stiegen die Werte sehr deutlich an, jedoch war nach der ersten bzw. zweiten Woche Biobran keine erneute deutliche Steigerung zu verzeichnen.

Die Induktion von CD69 durch IL-2 ist schon seit längerer Zeit bekannt: In der bereits oben zitierten Studie von Lanier 1988 konnte gezeigt werden, dass ruhende, unstimulierte NK-Zellen für CD69 praktisch negativ sind [59]. Durch Stimulation mit IL-2 konnte bereits nach wenigen Stunden auf der Mehrheit der NK-Zellen das CD69 Antigen detektiert werden, ebenso auf T-Zell-Subpopulationen. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität der NK-Zellen und der Höhe der CD69-Expression festgestellt werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass CD69 direkt in den lytischen Prozess mit eingebunden ist, da es auch auf einigen nicht-zytotoxischen Lymphozyten exprimiert wird. Dieser Theorie widerspricht jedoch eine neuere Studie von North et al aus dem Jahre 2007 [77]. Ihre Versuche untermauern die "2-Stufen-Hypothese" der NK-Zellaktivierung: diese besagt, dass zunächst ein unspezifischer Stimulus in Form von Zytokinen oder Tumorzellen erforderlich ist (Priming), bevor durch einen spezifischen Trigger die Zytotoxizität der NK-Zellen entfaltet werden kann. Für das "Priming" der NK-Zellen dienten Tumorzellen einer NK-resistenten ALL-Linie. Diese induzierten auf NK-Zellen die Hochregulierung des CD69-Rezeptors. Die so gepriemten NK-Zellen waren dann in der Lage, andere NK-resistente Zelllinien wie RAJI und Daudi-Zellen zu lysieren. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Tumor-induzierte NK-Zell-Aktivität nicht allein durch einen KIR-Mismatch zu erklären war, da sowohl passende, als auch unpassende KIR/HLA Kombinationen ähnliche Lyseergebnisse erzielten. Außerdem geht aus der Studie hervor, dass die NK-Zell-Zytotoxizität auf Tumorzellen beschränkt ist und z.B. PBMCs ausspart. Zudem ist ein Zell-Zell-Kontakt essentiell für den Prozess des Priming. Durch Zugabe von Brefeldin-A, welches die Hochregulierung des CD69-Rezeptors blockiert, konnte nur eine wesentlich niedrigere NK-Zell-Aktivität beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass der Bindung des CD69-Rezeptors an seinen Liganden eine Schlüsselrolle bei der Lyse von NK-resistenten Tumorzellen zukommt.

In einer Studie von Ghoneum konnte der Effekt von IL-2 und Biobran ebenso wie für CD25 auch für CD69 beobachtet werden [34].

NKG2A/94

Der Anteil NKG2A-/94+ Zellen erhöhte sich bei Stimulation sowohl mit IL-2, als auch leicht mit Biobran. Die Expressionsdichte auf den einzelnen Zellen änderte sich jedoch für keinen der beiden Rezeptoren. Der CD94 Rezeptor bildet mit verschiedenen Rezeptoren der NKG2-Familie inhibierende (NKG2A, B) bzw. aktivierende (NKG2C, E, H) Heterodimere. Da hier nur die Expression von NKG2A/94 in die FACS-Analysen einbezogen war,

5 Diskussion

kann keine Aussage getroffen werden, ob die Abnahme von NKG2A positiven Zellen evtl. mit einer parallel verstärkten Bildung eines der aktivierenden Heterodimere aus dieser Familie einhergeht. In der Literatur wird beschrieben, dass eine erhöhte NKG2A-Produktion die Zytokinproduktion von NK-Zellen verändern und so eine spätere Immunantwort beeinflussen kann. Zum Einfluss von IL-2 oder Polysacchariden auf NKG2A und CD94 ist bisher nichts bekannt.

NKG2D

Für das ebenfalls zur Familie der C-Typ-Lektin-Rezeptoren gehörende aktivierende Homodimer NKG2D konnten nur minimale Veränderungen durch IL-2 und Biobran festgestellt werden. In einer Studie an Mäusen wurde gezeigt, dass durch IL-2 keine verstärkte Expression auftritt und man kann somit davon ausgehen, dass dieses Zytokin keinen Einfluss auf die Regulation des NKG2D-Rezeptors hat [20].

KIR-Rezeptoren

Für die KIR-Rezeptoren CD158a, b und e konnten in diesen Untersuchungen weder durch IL-2 noch durch Biobran Veränderungen beobachtet werden. Während man bisher annahm, dass die KIR-Expression auf NK-Zellen stabil ist und nicht von Zytokinen reguliert wird, konnten neuere Studien dies nicht mehr belegen. In in-vitro Untersuchungen konnte durch IL-2 eine Steigerung der relativen Zellanzahl und der Fluoreszenzintensität für CD158⁺Zellen nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression hing dabei von der Inkubationszeit ab: während nach 24 Stunden noch keine/ bzw. kaum Veränderungen sichtbar waren, stiegen die Werte danach langsam an und hatten nach 72 Stunden ihr Maximum erreicht [97]. Dies könnte erklären, warum wir in unseren Versuchen keine ähnlichen Ergebnisse erzielen, da unsere Inkubationszeiten immer unter 24 Stunden lagen. Nicht geklärt ist die Frage, wie sich diese Steigerung vornehmlich inhibierender Rezeptoren durch IL-2 mit einer gleichzeitig erhöhten Zytotoxizität und Proliferation der NK-Zellen in Einklang bringen lässt. In einer anderen Studie konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Rezeptoren für 158a und b durch IL-2, nicht jedoch durch IL-4 und IFN- γ , hochreguliert werden. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen und der 158a und 158b Expression gezeigt werden [54]. Allerdings können KIRs, die von 158a/b erkannt werden sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren sein: CD158a reagiert mit KIR2DL1 (inhibierend) und KIR2DS1 (aktivierend), und CD158b reagiert mit KIR2DL2/3 (inhibierend) und KIR2DS3 (aktivierend). Die in der zitierten Studie verwendeten monoklonalen AK können jedoch nicht zwischen diesen Subgruppen unterscheiden und binden an beide Rezeptoren gleicher-

5 Diskussion

maßen, was es schwierig macht, die NK-Zell Regulation aufzuklären. Nicht geklärt ist weiterhin, ob zuerst die Steigerung der NK-Zell-Aktivität erfolgt und als Antwort darauf, um eine überschießende Aktivität zu verhindern und die Balance wiederherzustellen, evtl. erst die Hochregulation der KIRs. Diese Theorie würde eine Studie untermauern, bei der gezeigt werden konnte, dass mit einer Herunterregulation von KIRs die Zytotoxizität von NK-Zellen abnimmt [44].

CD16

Für den CD16 Rezeptor, der für die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität verantwortlich ist und den Fc-Teil von IgG erkennt, konnte keine Veränderung der Zellanzahl beobachtet werden. Die Expressionsdichte je Zelle nahm jedoch unter Biobran und der Kombination mit IL-2 deutlich ab. Dieser Zusammenhang deckt sich mit anderen Forschungsarbeiten: in verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass aktivierte NK-Zellen über eine Matrixmetallo-Proteinase in der Lage sind CD16 herunterzuregulieren [8, 40, 76].

CD 56/ CD226

Für die Rezeptoren CD56 und CD226 konnten weder durch IL-2 noch durch MGN-3 Veränderungen detektiert werden. In der Literatur ist eine Studie zu einem Fusionsprotein aus GM-CSF und IL-2 beschrieben, durch welches eine erhöhte Expression von CD226 beobachtet werden konnte [84].

CD122

Bei dem Rezeptor CD122 handelt es sich um die β -Kette des IL-2/bzw. IL-15 Rezeptors. Der Rezeptor CD132 repräsentiert die γ -Kette des IL-2 Rezeptors. Diese beiden wurden nur auf ihre Stimulierbarkeit durch MGN-3 in-vitro untersucht. Für beide konnten praktisch keine Veränderungen festgestellt werden, es ist eine minimale Zunahme des ersteren und eine Abnahme des zweiten sichtbar. Beide werden auf fast allen NK-Zellen und auch auf der Mehrheit der NKT-Zellen exprimiert. In einer bereits zitierten Studie von Dunne konnte gezeigt werden, dass der CD122-Rezeptor auf 99% der NK- und 75% der NKT-Zellen exprimiert wird [22]. Dies entspricht den hier gemachten Beobachtungen und erklärt auch, dass eine Steigerung der Anzahl der positiven Zellen kaum noch möglich ist. In einer schon älteren Studie von 1988 machten Forscher die Beobachtung, dass eine Polysaccharidfraktion aus *Thuja occidentales* L. (Lebensbaum) mitogen auf CD4⁺-T-Helferzellen wirkt und zu einer verstärkten Expression des IL-2-Rezeptors führt. Nicht beschrieben ist allerdings, welcher Anteil des Rezeptors hochreguliert wurde [36].

NKp30,44,46

Die Rezeptoren NKp30, 44 und 46 wurden nur nach in-vivo Stimulation getestet. Signifikanten Veränderungen durch Biobran ließen sich nicht feststellen. In einer Studie konnte Moretta zeigen, dass NKp46 und NKp30 von allen NK-Zellen exprimiert werden, unabhängig von ihrem Aktivierungsgrad, wohingegen NKp44 nur von aktivierten NK-Zellen exprimiert wird. Die Dichte der Rezeptoren ist sehr stabil und wird auch durch verschiedene Zytokine nicht beeinflusst [74]. Die Expressionsdichte der NKp46-Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen ist individuell sehr unterschiedlich. Individuen mit höherer Expression können Tumorzellen oftmals besser lysieren als andere. Allerdings trifft dies nicht auf alle Targetzellen zu, manche werden auch von NK-Zellen lysiert, die nur niedrige Level an NCR-Rezeptoren exprimieren [98].

5.4 Einfluss von Biobran und IL-2 auf die Aktivität verschiedener Zytokine

Um einen möglichen Einfluss von Biobran auf die Konzentration verschiedener Zytokine im Serum zu ermitteln, wurden Zytokinaktivitätsmessungen für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α durchgeführt. Messungen nach erfolgter in-vitro Stimulation der NK-Zellen fanden bei 3 Probanden statt. Die Trends sind nicht immer einheitlich. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnten individuell verschiedene Genpolymorphismen und eine entsprechend unterschiedlich hohe Aktivität der Zytokine sein. In der Literatur wird solch ein Zusammenhang kontrovers diskutiert [113]. Generell konnte in unseren Versuchen beobachtet werden, dass sowohl unter IL-2, als auch unter Biobran oftmals höhere Zytokinaktivitäten gemessen werden konnten, unabhängig davon, ob es sich um inhibierende oder aktivierende Zytokine handelte. Die Aktivitätszunahme war unter IL-2 meist ausgeprägter und durch kombinierte Stimulation niedriger oder gar nicht vorhanden.

Bei den mit Biobran in-vivo stimulierten Versuchen konnte eine deutliche Aktivitätssteigerung unter Biobran nur bei zwei Probanden detektiert werden. Bei diesen beiden stiegen die Konzentrationen der meisten Zytokine bis zur zweiten Woche auf ein Maximum an und nahmen nach Absetzen von Biobran wieder ab (wenige Ausnahmen). Einzig die Aktivität von TNF- α stieg auch nach Absetzen noch weiter stark an. Am deutlichsten waren die Steigerungsraten von IL-2, IFN- γ und TNF- α .

Ähnliche Beobachtungen konnten auch schon von Ghoneum et al. in verschiedenen Studien gemacht werden: in-vitro beobachtete er in einer Studie 1998 eine gesteiger-

te IFN-Konzentration durch Biobran, in einer anderen Studie erhöhte Konzentrationen von TNF- α und IL-6 [30, 35]. Nicht nur von Biobran, sondern auch von verschiedenen anderen Polysacchariden ist bekannt, dass sie oft indirekt, unter anderem durch erhöhte Zytokinsekretion, immunmodulatorischen Einfluss ausüben. So konnte in der bereits oben zitierten Studie von Ogawa zu partiell hydrolysiertem Maishülsen Arabinoxylan (CHAX) ein Anstieg von IL-2 und IFN- γ bei gesunden Mäusen gezeigt werden [79]. Eine andere Studie zeigte, dass Mäusen, denen AHCC gespritzt wurde, vermehrt CD8⁺-T-Zellen bilden, die verstärkt IFN- γ produzierten. Jedoch gibt es auch gegenteilige Beobachtungen: in einer Studie zu AHCC in-vivo konnte keine Aktivitätssteigerung der Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ durch die Einnahme von AHCC gemessen werden [107]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass noch viel Forschung nötig ist, um genaue Einblicke in die Wirkmechanismen solcher Substanzen zu erzielen.

5.5 Fazit

Schon seit langem wird intensiv an Polysacchariden und Biological Response Modifiern geforscht, ihrem Effekt auf unser Immunsystem und ihren antitumorösen Eigenschaften. Krebs stellt in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar und gängige Chemo- und Immuntherapien gehen oft mit starken Nebenwirkungen einher oder erzielen nicht die gewünschten therapeutischen Effekte. Deshalb sind natürliche Substanzen als Ergänzungstherapie zur Unterstützung und Verstärkung der Standardtherapien von wachsender Bedeutung. In Asien sind solche BRMs schon seit Jahren auch in der klinischen Anwendung. Bereits 1957 fanden erste Forschungsarbeiten statt, die den antitumorösen Effekt von höheren Basidiomyces demonstrierten [68]. In den folgenden Jahren wurden weitere Polysaccharidfraktionen aus den verschiedensten Pilzen isoliert und ihre Wirkung gegen unterschiedliche Krebsformen und ihre Stimulationsfähigkeit des Immunsystems untersucht. Dabei stellten sich besonders die folgenden sechs Polysaccharide als wirkungsvoll heraus: Lentinan, Schizophyllan, AHCC (active hexose correlated compound), Maitake D-Fraktion, Polysaccharid-K und Polysaccharid-P. Viele Studien konnten zeigen, dass die Polysaccharide ihre Wirkung vor allem indirekt über verschiedene Wege der Stimulierung des Immunsystems entfalten [114]. Dabei spielen verschiedene Faktoren wie Molekulargewicht, Verknüpfung, Konfiguration usw. eine entscheidende Rolle. Da es jedoch eine solche Fülle an Polysacchariden gibt, ist es schwer exakt herauszufinden welche Komponenten für welche Eigenschaften verantwortlich sind und welche Mechanismen sich hinter den immunmodulatorischen Wirkungen verbergen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine steigende Zytotoxizität von NK-Zellen durch in-vitro Stimulation mit Biobran gegen verschiedene Tumorzelllinien und in-vivo Stimulation

5 Diskussion

gegen K562 bestätigt werden. Eindeutig trat auch der Summationseffekt bei kombinierter Stimulation der NK-Zellen mit Biobran und IL-2 zu Tage. Dies könnte für die klinische Anwendung Konsequenzen haben: IL-2 wird bereits heute bei ausgesuchten Krebsleiden als Immuntherapie angewandt und könnte in Kombination mit Biobran verstärkte Wirkung zeigen und mögliche Nebenwirkungen reduzieren.

Die Wirkung einer in-vivo Stimulation durch Biobran fiel jedoch gegen die Rhabdomyosarkomzelllinie A204 und die leukämischen cALL Blasten weniger eindeutig aus. In diesen Fällen konnte keine eindeutige Aktivitätssteigerung der NK-Zellen nachgewiesen werden. Dies kann viele Gründe haben: auch in anderen Studien wurde schon beobachtet, dass jedes Individuum sehr unterschiedlich auf Biobran anspricht. Die NK-Zell-Aktivität unterliegt vielen Einflussfaktoren, wie Infekten, Stress, Tageszeit und auch die zeitliche und kontinuierliche Einnahme sind wichtige Faktoren. Des Weiteren spielt bei der Lyse von Blasten der HLA-Typ des Spenders und die damit verbundene Alloreaktivität der NK-Zellen eine Rolle.

Weitere Forschung ist nötig um den genauen Wirkmechanismus von Biobran herauszufinden. Die FACS-Analysen dieser Arbeit ergaben vor allem bei kombinierter Stimulation der NK-Zellen durch Biobran und IL-2 eine Zunahme der CD25- und CD69- exprimierenden Zellen, sowie eine Expressionszunahme dieser Rezeptoren auf den einzelnen Zellen. Unter alleinigem Biobran-Einfluss änderte sich die Rezeptordichte pro Zelle kaum, die Anzahl CD25 exprimierender Zellen lag deutlich über der von IL-2 stimulierten und die Anzahl CD69 exprimierenden Zellen war etwa gleich hoch.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es eine mögliche Zytotoxizitätssteigerung von NK-Zellen durch das Nahrungsergänzungspräparat Biobran/MGN-3 nachzuweisen.

Beim ersten Teil handelte es sich um in-vitro Versuche mit dem Blut freiwilliger, gesunder Spender. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation und MACS wurden die CD56⁺Zellen isoliert und anschließend über Nacht mit IL-2, MGN-3 und einer Kombination aus beidem stimuliert. Tags darauf wurde durch den BATDA-Release-Assay die zytotoxische Aktivität der CD56⁺-Zellen gegen die vier Targetzelllinien K562, A204, RH30 und RD gemessen. Die höchste Aktivität zeigte sich gegen die NK-Zell-sensitive Zelllinie K562. Durchgehend konnte jedoch eine deutliche Zunahme sowohl durch IL-2, als auch durch Biobran alleine beobachtet werden, die sich durch kombinierte Stimulation in den meisten Fällen noch einmal signifikant steigern ließ. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen FACS-Analysen unterzogen. Hier war eine deutliche Steigerung sowohl der Zellanzahl, als auch der Expressionsdichte für CD69 sichtbar. Die höchsten Werte wurden innerhalb der Zellpopulation erreicht, die mit IL-2 und MGN-3 gleichzeitig inkubiert wurde. Einen weiteren Effekt scheint Biobran auf die Expression von CD25 zu haben. Hier konnte durch Biobran alleine keine signifikante Steigerung erzielt werden. In Kombination mit IL-2 stiegen jedoch Anzahl und Expressionsdichte der CD25⁺-Zellen deutlich über das erreichte Niveau der nur mit IL-2 inkubierten Zellen an. In einem dritten Ansatz wurde das Serum dreier Spender auf Zytokinaktivitätssteigerungen unter IL-2 und MGN-3 untersucht. Für die meisten, sowohl inhibierenden als auch aktivierenden Zytokine, konnten unter IL-2 und MGN-3 Konzentrationssteigerungen beobachtet werden, wohingegen diese durch kombinierte Stimulation geringer ausfielen. Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Forschungsergebnissen: IL-2 ist schon lange für seine Eigenschaft bekannt, NK-Zellen zu Proliferation und Expansion anzuregen [6] sowie CD25 hoch zu regulieren [22]. Gemäß Studien von Ghoneum, erhöht die in-vitro Stimulation mit Biobran die Aktivität von NK-Zellen, von INF- γ und TNF- α und trägt in Kombination mit IL-2 zu einer nochmaligen Erhöhung von CD25 bei [34]. Einer neuen Studie von North et al. zufolge spielt CD69 eine Schlüsselrolle bei der Lyse NK-Zell-resistenter Tumorzellen [77].

Im zweiten Teil dieser Arbeit testeten wir die Stimulierbarkeit von NK-Zellen durch Biobran in-vivo an 10 freiwilligen, gesunden Versuchspersonen. Sie nahmen Biobran

6 Zusammenfassung

über einen Zeitraum von zwei Wochen dreimal täglich mit einer Gesamtdosis von 45 mg/kg/Tag ein. Als Kontrollwerte dienten Messungen vor Beginn der Einnahme von Biobran, weitere Messungen erfolgten nach einer Woche und nach zwei Wochen, sowie 2 Wochen nach Absetzen des Präparates. Wie auch bei den *in vitro* Versuchen wurden die CD56⁺-Zellen isoliert und ihre zytotoxische Aktivität durch den BATDA-Release-Assay untersucht. Ein Teil der Zellen wurde über Nacht zusätzlich mit IL-2 inkubiert und am darauf folgenden Tag wurden erneut Zytotoxizitätstests durchgeführt. Als Targetzellen kamen K562, A204 und cALL-Blasten zum Einsatz. Die höchsten Lyseraten wurden gegen K562 erzielt. Hier ist unter Biobran eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität sichtbar, mit einer maximalen Steigerung nach einer Woche. Durch IL-2 konnte zwar eine noch höhere Lysierbarkeit erzielt werden, jedoch ließ sich die Steigerungsrate durch vorherige Biobran-Einnahme nicht erhöhen. Gegen A204 und vor allem gegen die Blasten wurden deutlich schlechtere Lyseraten beobachtet. Während bei A204 durch Biobran noch ein Trend zu erhöhter zytotoxischer Aktivität der NK-Zellen sichtbar war, war dies bei den Blasten nicht der Fall. Sie erwiesen sich als sehr resistent. In der Durchflusszytometrie, die mit den isolierten PBMCs durchgeführt wurde, ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der untersuchten Rezeptoren. Die Zytokinaktivitätsmessungen fielen sehr unterschiedlich aus. Bei zwei Probanden waren Aktivitätssteigerungen fast aller gemessenen Zytokine sichtbar, wobei die Konzentrationen an TNF- α , IFN- γ und IL-2 am deutlichsten zunahmen. Für die *in-vivo* Anwendung von Biobran liegen bisher nur wenige Studien vor. Ghoneum bescheinigt der Stimulierung von NK-Zellen durch Biobran *in-vivo* ähnliche Ergebnisse wie *in-vitro*. Forschungen zur Wirkung von IL-2 haben schon soweit geführt, dass es in der Klinik gemäß AWMF-Leitlinien beim metastasierten malignen Melanom sowie dem Nierenzellkarzinom Anwendung findet. Um jedoch Nebenwirkungen zu vermindern und die Effektivität in Kombination mit anderen Therapeutika, wie z.B. auch Biobran, zu erhöhen, ist noch weitere Forschung nötig. Die bisherigen Studienergebnisse zu Biobran sind viel versprechend. Allerdings sind vor allem noch umfangreichere *in-vivo* Studien sowie Studien zum Wirkmechanismus nötig, um Biobran effektiv in der Praxis einzusetzen.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Todesursachenstatistik, Deutschland-2007	1
1.2	Missing-self und Induced-self Mechanismus von NK-Zellen	7
1.3	Strukturformel von Biobran	17
4.1	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen K562	41
4.2	x-fache Steigerung der NK-Zellaktivität gegen K562	42
4.3	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen A204	43
4.4	x-fache Steigerung der NK-Zellaktivität gegen A204	44
4.5	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen RH30	45
4.6	x-fache Steigerung der NK-Zellaktivität gegen RH30	46
4.7	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen RD	47
4.8	x-fache Steigerung der NK-Zellaktivität gegen RD	48
4.9	FACS-Analyse von CD25 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	49
4.10	FACS-Analyse der rel. Fluoreszenzintensität von CD25 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	50
4.11	FACS-Analyse von CD69 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	51
4.12	FACS-Analyse der rel. Fluoreszenzintensität von CD69 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	52
4.13	FACS-Analyse von NKG2A ⁻ /94 ⁺ für in-vitro stimulierte NK-Zellen	53
4.14	FACS-Analyse von NKG2A ⁺ /94 ⁺ für in-vitro stimulierte NK-Zellen	54
4.15	FACS-Analyse der KIR-Rezeptoren für in-vitro stimulierte NK-Zellen	55
4.16	FACS-Analyse der CD56 ⁺ /3 ⁻ -Zellen für in-vitro stimulierte NK-Zellen	56
4.17	FACS-Analyse der CD56 ⁺ /3 ⁻ /16 ⁺ -Zellen für in-vitro stimulierte NK-Zellen	57
4.18	FACS-Analyse der NKG2D ⁺ -NK-Zellen für in-vitro stimulierte NK-Zellen	58
4.19	FACS-Analyse der NKG2D ⁺ -Zellen für in-vitro stimulierte NK-Zellen	59
4.20	FACS-Analyse der CD122 ⁺ -, CD132 ⁺ - und IL15R α ⁺ -Zellen für in-vitro stimulierte NK-Zellen	60
4.21	FACS-Analyse der rel. Fluoreszenzintensitäten CD122 ⁺ -, CD132 ⁺ - und IL15R α ⁺ -Zellen für in-vitro stimulierte NK-Zellen	61

Abbildungsverzeichnis

4.22 Zytokinaktivitätsmessungen für IL-2 und IL-4 von in-vitro stimulierten NK-Zellen	63
4.23 Zytokinaktivitätsmessungen für IL-10, IL-12 und IL-15 von in-vitro stimulierten NK-Zellen	64
4.24 Zytokinaktivitätsmessungen für GM-CSF, IFN- γ , TNF- α von in-vitro stimulierte NK-Zellen	65
4.25 NK-Zellaktivität gegen K562 von mit Biobran in-vivo stimulierten NK-Zellen	67
4.26 NK-Zellaktivität gegen K562 von mit Biobran in-vivo und IL-2 in-vitro stimulierten NK-Zellen	67
4.27 NK-Zellaktivität gegen A204 von mit Biobran in-vivo stimulierten NK-Zellen	68
4.28 NK-Zellaktivität gegen A204 von mit Biobran in-vivo und IL-2 in-vitro stimulierten NK-Zellen	69
4.29 NK-Zellaktivität gegen cALL-Blasten von mit Biobran in-vivo stimulierten NK-Zellen	70
4.30 NK-Zellaktivität gegen cALL-Blasten von mit Biobran in-vivo und IL-2 in-vitro stimulierten NK-Zellen	70
4.31 FACS-Analysen der mit Biobran in-vivo und IL-2 in-vitro stimulierten CD25 ⁺ -NK-, NKT- und T-Zellen	72
4.32 FACS-Analyse der mit Biobran in-vivo und IL-2 in-vitro stimulierten CD69 ⁺ -NK-, NKT- und T-Zellen	73
4.33 FACS-Analyse der mit Biobran in-vivo und IL-2 in-vitro stimulierten $\gamma\delta^+$ -Zellen	74
4.34 IL-2 Aktivität im Serum zweier Spender nach Biobran Einnahme	79
4.35 TNF- α Aktivität im Serum gesunder Spender nach Biobran Einnahme . .	80
4.36 IFN- γ Aktivität im Serum gesunder Spender nach Biobran Einnahme . .	81
4.37 Zytokinaktivitäten Spender 3	82
4.38 Zytokinaktivitäten Spender 9	82

Tabellenverzeichnis

1.1	Liste der bekannten inhibierenden NK-Rezeptoren und ihrer Liganden . . .	9
1.2	Liste der bekannten aktivierenden NK-Rezeptoren und ihrer Liganden . . .	10
1.3	Adhäsionsmoleküle	11
1.4	Zytokine	13
1.5	CD-Oberflächenantigene	20
4.1	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen K562 - Mittelwerte und Standardabweichungen	41
4.2	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen A204 - Mittelwerte und Standardabweichungen	43
4.3	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen RH30 - Mittelwerte und Standardabweichungen	45
4.4	In-vitro stimulierte NK-Zellaktivität gegen RD - Mittelwerte und Standardabweichungen	47
4.5	p-Werte der FACS-Analysen von CD25 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	49
4.6	p-Werte der FACS-Analysen für die rel. Fluoreszenzintensitäten von CD25 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	50
4.7	p-Werte der FACS-Analysen von CD69 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	51
4.8	p-Werte der FACS-Analysen für die rel. Fluoreszenzintensitäten von CD69 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	52
4.9	p-Werte der FACS-Analysen von NKG2A/94 für in-vitro stimulierte NK-Zellen	53
4.10	Mittelwerte der rel. Anteile der CD69 ⁺ - und $\gamma\delta^+$ -Zellen in Prozent . . .	74

Literaturverzeichnis

- [1] ARASE, H. ; ARASE, N. ; SAITO, T.: Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. In: *J Exp Med* 181 (1995), Nr. 3, S. 1235–8
- [2] ATZPODIEN, J. ; KIRCHNER, H. ; JONAS, U. ; BERGMANN, L. ; SCHOTT, H. ; HEYNEMANN, H. ; FORNARA, P. ; LOENING, S. A. ; ROIGAS, J. ; MULLER, S. C. ; BODENSTEIN, H. ; POMER, S. ; METZNER, B. ; REBMANN, U. ; OBERNEDER, R. ; SIEBELS, M. ; WANDERT, T. ; PUCHBERGER, T. ; REITZ, M.: Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). In: *J Clin Oncol* 22 (2004), Nr. 7, S. 1188–94
- [3] BADR EL-DIN, N. K. ; NOAMAN, E. ; GHONEUM, M.: In vivo tumor inhibitory effects of nutritional rice bran supplement MGN-3/Biobran on Ehrlich carcinoma-bearing mice. In: *Nutr Cancer* 60 (2008), Nr. 2, S. 235–44
- [4] BIEGER, W. P.: NK-Zellen: Eine aktuelle $\frac{1}{4}$ bersicht. In: *Immun. Infekt* (1997), Nr. 1/97, S. 12–23
- [5] BIRON, C. A. ; NGUYEN, K. B. ; PIEN, G. C. ; COUSENS, L. P. ; SALAZAR-MATHER, T. P.: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. In: *Annu Rev Immunol* 17 (1999), S. 189–220
- [6] BIRON, C. A. ; YOUNG, H. A. ; KASAIAN, M. T.: Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells in vivo. In: *J Exp Med* 171 (1990), Nr. 1, S. 173–88
- [7] BLOMBERG, K. ; HAUTALA, R. ; LOVGREN, J. ; MUKKALA, V. M. ; LINDQVIST, C. ; AKERMAN, K.: Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. In: *J Immunol Methods* 193 (1996), Nr. 2, S. 199–206
- [8] BORREGO, F. ; LOPEZ-BELTRAN, A. ; PENA, J. ; SOLANA, R.: Downregulation of Fc gamma receptor IIIA alpha (CD16-II) on natural killer cells induced by anti-CD16 mAb is independent of protein tyrosine kinases and protein kinase C. In: *Cell Immunol* 158 (1994), Nr. 1, S. 208–17

Literaturverzeichnis

- [9] BOTTINO, C. ; CASTRICONI, R. ; MORETTA, L. ; MORETTA, A.: Cellular ligands of activating NK receptors. In: *Trends Immunol* 26 (2005), Nr. 4, S. 221–6
- [10] BOTTINO, C. ; VITALE, M. ; PENDE, D. ; BIASSONI, R. ; MORETTA, A.: Receptors for HLA class I molecules in human NK cells. In: *Semin Immunol* 7 (1995), Nr. 2, S. 67–73
- [11] BOURIN, P. ; MANSOUR, I. ; DOINEL, C. ; ROUE, R. ; ROUGER, P. ; LEVI, F.: Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men. In: *Chronobiol Int* 10 (1993), Nr. 4, S. 298–305
- [12] BRADLEY, M. ; ZEYTUN, A. ; RAFI-JANAJREH, A. ; NAGARKATTI, P. S. ; NAGARKATTI, M.: Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. In: *Blood* 92 (1998), Nr. 11, S. 4248–55
- [13] BRYCESON, Y. T. ; MARCH, M. E. ; LJUNGGREN, H. G. ; LONG, E. O.: Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. In: *Blood* 107 (2006), Nr. 1, S. 159–66
- [14] CAMBIAGGI, A. ; VIVIER, E. ; OLCESE, L.: Inhibitory and activatory receptors for MHC class I molecules. In: *Res Immunol* 148 (1997), Nr. 3, S. 172–9
- [15] CAMPBELL, K. S. ; DESSING, M. ; LOPEZ-BOTET, M. ; CELLA, M. ; COLONNA, M.: Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. In: *J Exp Med* 184 (1996), Nr. 1, S. 93–100
- [16] CANTONI, C. ; BOTTINO, C. ; VITALE, M. ; PESSINO, A. ; AUGUGLIARO, R. ; MALASPINA, A. ; PAROLINI, S. ; MORETTA, L. ; MORETTA, A. ; BIASSONI, R.: NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. In: *J Exp Med* 189 (1999), Nr. 5, S. 787–96
- [17] CELLA, M. ; LONGO, A. ; FERRARA, G. B. ; STROMINGER, J. L. ; COLONNA, M.: NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. In: *J Exp Med* 180 (1994), Nr. 4, S. 1235–42
- [18] CERWENKA, A. ; LANIER, L. L.: NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. In: *Tissue Antigens* 61 (2003), Nr. 5, S. 335–43
- [19] DAVIES, S. M. ; RUGGIERI, L. ; DEFOR, T. ; WAGNER, J. E. ; WEISDORF, D. J. ; MILLER, J. S. ; VELARDI, A. ; BLAZAR, B. R.: Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. In: *Blood* 100 (2002), Nr. 10, S. 3825–7
- [20] DIEFENBACH, A. ; JAMIESON, A. M. ; LIU, S. D. ; SHASTRI, N. ; RAULET,

- D. H.: Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. In: *Nat Immunol* 1 (2000), Nr. 2, S. 119–26
- [21] DREICER, R.: Tyrosine kinase inhibitors compared with cytokine therapy for metastatic renal cell carcinoma: overview of recent clinical trials differentiating clinical response and adverse effects. In: *Clin Genitourin Cancer* 5 Suppl 1 (2006), S. S19–23
- [22] DUNNE, J. ; LYNCH, S. ; O'FARRELLY, C. ; TODRYK, S. ; HEGARTY, J. E. ; FEIGHERY, C. ; DOHERTY, D. G.: Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. In: *J Immunol* 167 (2001), Nr. 6, S. 3129–38
- [23] ENDO, Kanbayashi H. Y.: Modified arabinoxylan from rice bran (BioBran/MGN-3) beneficial for weight loss of mice as a major and acute adverse effect of Cisplatin. In: *Pharmacology and Toxicology* 92 (2003), S. 300–303
- [24] FISCHER, A.: Human primary immunodeficiency diseases. In: *Immunity* 27 (2007), Nr. 6, S. 835–45
- [25] GARBE, C. ; PERIS, K. ; HAUSCHILD, A. ; SAIAG, P. ; MIDDLETON, M. ; SPATZ, A. ; GROB, J. J. ; MALVEHY, J. ; NEWTON-BISHOP, J. ; STRATIGOS, A. ; PEHAMBERGER, H. ; EGGERMONT, A.: Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. In: *Eur J Cancer* (2009)
- [26] GEISELHART, A. ; NEU, S. ; BUCHHOLZ, F. ; LANG, P. ; NIETHAMMER, D. ; HANDGRETINGER, R.: Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting. In: *Nat Immun* 15 (1996), Nr. 5, S. 227–33
- [27] GEMLO, B. T. ; PALLADINO, Jr. M. A. M. A. ; JAFFE, H. S. ; ESPEVIK, T. P. ; RAYNER, A. A.: Circulating cytokines in patients with metastatic cancer treated with recombinant interleukin 2 and lymphokine-activated killer cells. In: *Cancer Res* 48 (1988), Nr. 20, S. 5864–7
- [28] GHONEUM, Brown J. M.: NK Immunorestitution of cancer patients by Biobran/MGN-3, a modified arabinoxylan rice bran. In: *Anti-Aging Medical Therapeutics* 3 (1999), S. 217–226
- [29] GHONEUM, M.: Anti-HIV activity in vitro of MGN-3, an activated arabinoxylane from rice bran. In: *Biochem Biophys Res Commun* 243 (1998), Nr. 1, S. 25–9
- [30] GHONEUM, M.: Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylan from rice bran (BioBran/MGN-3). In: *International journal of immunotherapy* XIV (1998), Nr. 2, S. 89–99
- [31] GHONEUM, M. ; ABEDI, S.: Enhancement of natural killer cell activity of aged

- mice by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). In: *J Pharm Pharmacol* 56 (2004), Nr. 12, S. 1581–8
- [32] GHONEUM, M. ; GOLLAPUDI, S.: Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. In: *Cancer Lett* 201 (2003), Nr. 1, S. 41–9
- [33] GHONEUM, M. ; GOLLAPUDI, S.: Synergistic role of arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) in *S. cerevisiae*-induced apoptosis of monolayer breast cancer MCF-7 cells. In: *Anticancer Res* 25 (2005), Nr. 6B, S. 4187–96
- [34] GHONEUM, M. ; JEWETT, A.: Production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro. In: *Cancer Detect Prev* 24 (2000), Nr. 4, S. 314–24
- [35] GHONEUM, M. ; MATSUURA, M.: Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/biobran). In: *Int J Immunopathol Pharmacol* 17 (2004), Nr. 3, S. 283–92
- [36] GOHLA, Neth R.-D. S.: Gezielte Immunstimulation durch eine Polysaccharidfraktion aus *Thuja occidentale* L. In: *Therapeutikon* 12 (1988), S. 717–725
- [37] GORDON, J. ; MACLEAN, L. D.: A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. In: *Nature* 208 (1965), Nr. 5012, S. 795–6
- [38] GRIGGS, J. ; ZINKEWICH-PEOTTI, K.: The state of the art: immune-mediated mechanisms of monoclonal antibodies in cancer therapy. In: *Br J Cancer* 101 (2009), Nr. 11, S. 1807–12
- [39] GRIMM, E. A. ; MAZUMDER, A. ; ZHANG, H. Z. ; ROSENBERG, S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. In: *J Exp Med* 155 (1982), Nr. 6, S. 1823–41
- [40] GRZYWACZ, B. ; KATARIA, N. ; VERNERIS, M. R.: CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. In: *Leukemia* 21 (2007), Nr. 2, S. 356–9; author reply 359
- [41] GUMPERZ, J. E. ; LITWIN, V. ; PHILLIPS, J. H. ; LANIER, L. L. ; PARHAM, P.: The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. In: *J Exp Med* 181 (1995), Nr. 3, S. 1133–44
- [42] HEATON, K. M. ; GRIMM, E. A.: Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review. In: *Cancer Immunol Immunother* 37 (1993), Nr. 4, S. 213–9

Literaturverzeichnis

- [43] HERBERMAN, R. B. ; NUNN, M. E. ; HOLDEN, H. T. ; LAVRIN, D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. In: *International journal of cancer Journal international du cancer* 16 (1975), Nr. 2, S. 230–9
- [44] HUARD, B. ; KARLSSON, L. ; TRIEBEL, F.: KIR down-regulation on NK cells is associated with down-regulation of activating receptors and NK cell inactivation. In: *Eur J Immunol* 31 (2001), Nr. 6, S. 1728–35
- [45] IMAI, K. ; MATSUYAMA, S. ; MIYAKE, S. ; SUGA, K. ; NAKACHI, K.: Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. In: *Lancet* 356 (2000), Nr. 9244, S. 1795–9
- [46] JACOBY, Wnorowski G.-Sakata K. Maeda H. H.I.: The effect of Modified Arabinoxylan from Rice Bran (BioBran/MGN-3) on Cisplatin and Doxorubicin induced toxicity in the rat. In: *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods* 3 (2001), Nr. 4, S. 3–11
- [47] JANEWAY, Travers P.-Walport M. Shlomchik M. C.A.: *Immunologie*. 5. Spectrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 2002
- [48] KÄRRE, K.: Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and hypothesis. In: *Academic Press, Orlando* (1985), S. 81–92
- [49] KÄRRE, K.: Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells. In: *Science* 267 (1995), Nr. 5200, S. 978–9
- [50] KASAKURA, S. ; LOWENSTEIN, L.: A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leukocyte cultures. In: *Nature* 208 (1965), Nr. 5012, S. 794–5
- [51] KATZ, G. ; GAZIT, R. ; ARNON, T. I. ; GONEN-GROSS, T. ; TARCIC, G. ; MARKEL, G. ; GRUDA, R. ; ACHDOUT, H. ; DRIZE, O. ; MERIMS, S. ; MANDELBOIM, O.: MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. In: *J Immunol* 173 (2004), Nr. 3, S. 1819–25
- [52] KIESSLING, R. ; KLEIN, E. ; WIGZELL, H.: Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. In: *Eur J Immunol* 5 (1975), Nr. 2, S. 112–7
- [53] KING, J. ; WAXMAN, J. ; STAUSS, H.: Advances in tumour immunotherapy. In: *QJM* 101 (2008), Nr. 9, S. 675–83
- [54] KOGURE, T. ; MANTANI, N. ; SAKAI, S. ; SHIMADA, Y. ; TAMURA, J. ; TERASAWA, K.: Natural killer cytolytic activity is associated with the expression of

Literaturverzeichnis

- killer cell immunoglobulin-like receptors on peripheral lymphocytes in human. In: *Mediators Inflamm* 12 (2003), Nr. 2, S. 117–21
- [55] KRAGEL, A. H. ; TRAVIS, W. D. ; STEIS, R. G. ; ROSENBERG, S. A. ; ROBERTS, W. C.: Myocarditis or acute myocardial infarction associated with interleukin-2 therapy for cancer. In: *Cancer* 66 (1990), Nr. 7, S. 1513–6
- [56] LAATSCH, H.: [Polysaccharides with antitumor activity from fungi]. In: *Pharm Unserer Zeit* 21 (1992), Nr. 4, S. 159–66
- [57] LANIER, L. L.: NK cell receptors. In: *Annu Rev Immunol* 16 (1998), S. 359–93
- [58] LANIER, L. L.: Natural killer cell receptor signaling. In: *Curr Opin Immunol* 15 (2003), Nr. 3, S. 308–14
- [59] LANIER, L. L. ; BUCK, D. W. ; RHODES, L. ; DING, A. ; EVANS, E. ; BARNEY, C. ; PHILLIPS, J. H.: Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. In: *J Exp Med* 167 (1988), Nr. 5, S. 1572–85
- [60] LANIER, L. L. ; PHILLIPS, J. H.: Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. In: *Immunol Today* 17 (1996), Nr. 2, S. 86–91
- [61] LANIER, L. L. ; RUITENBERG, J. J. ; PHILLIPS, J. H.: Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. In: *J Immunol* 141 (1988), Nr. 10, S. 3478–85
- [62] LAZETIC, S. ; CHANG, C. ; HOUCHINS, J. P. ; LANIER, L. L. ; PHILLIPS, J. H.: Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. In: *J Immunol* 157 (1996), Nr. 11, S. 4741–5
- [63] LEE, R. K. ; SPIELMAN, J. ; ZHAO, D. Y. ; OLSEN, K. J. ; PODACK, E. R.: Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. In: *J Immunol* 157 (1996), Nr. 5, S. 1919–25
- [64] LEE, S. H. ; MIYAGI, T. ; BIRON, C. A.: Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. In: *Trends Immunol* 28 (2007), Nr. 6, S. 252–9
- [65] LEUNG, W. ; IYENGAR, R. ; TURNER, V. ; LANG, P. ; BADER, P. ; CONN, P. ; NIETHAMMER, D. ; HANDGRETINGER, R.: Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. In: *J Immunol* 172 (2004), Nr. 1, S. 644–50
- [66] LJUNGGREN, H. G. ; KARRE, K.: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. In: *Immunol Today* 11 (1990), Nr. 7, S. 237–44
- [67] LOTZE, M. T. ; GRIMM, E. A. ; MAZUMDER, A. ; STRAUSSER, J. L. ; ROSEN-

Literaturverzeichnis

- BERG, S. A.: Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. In: *Cancer Res* 41 (1981), Nr. 11 Pt 1, S. 4420–5
- [68] LUCAS, Montesano-R. E. H. E. H.: Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. In: *Antibiotics and chemotherapy* 7 (1957), S. 1–4
- [69] MALMBERG, K. J. ; BRYCESON, Y. T. ; CARLSTEN, M. ; ANDERSSON, S. ; BJORKLUND, A. ; BJORKSTROM, N. K. ; BAUMANN, B. C. ; FAURIAT, C. ; ALICI, E. ; DILBER, M. S. ; LJUNGGREN, H. G.: NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. In: *Cancer Immunol Immunother* 57 (2008), Nr. 10, S. 1541–52
- [70] MEROPOL, N. J. ; PORTER, M. ; BLUMENSON, L. E. ; LINDEMANN, M. J. ; PEREZ, R. P. ; VAICKUS, L. ; LOEWEN, G. M. ; CREAVEN, P. J. ; WILKES, K. A. ; GIEDLIN, M. A. ; CALIGIURI, M. A.: Daily subcutaneous injection of low-dose interleukin 2 expands natural killer cells in vivo without significant toxicity. In: *Clin Cancer Res* 2 (1996), Nr. 4, S. 669–77
- [71] MILTENYI, S. ; MULLER, W. ; WEICHEL, W. ; RADBRUCH, A.: High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (1990), Nr. 2, S. 231–8
- [72] MOCELLIN, S. ; WANG, E. ; MARINCOLA, F. M.: Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. In: *J Immunother* 24 (2001), Nr. 5, S. 392–407. – Mocellin, SWang, EMarincola, F MReviewUnited StatesJournal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)J Immunother. 2001 Sep-Oct;24(5):392-407.
- [73] MOLDAY, R. S. ; YEN, S. P. ; REMBAUM, A.: Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells. In: *Nature* 268 (1977), Nr. 5619, S. 437–8
- [74] MORETTA, A. ; BOTTINO, C. ; VITALE, M. ; PENDE, D. ; CANTONI, C. ; MINGARI, M. C. ; BIASSONI, R. ; MORETTA, L.: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. In: *Annu Rev Immunol* 19 (2001), S. 197–223
- [75] MORGAN, D. A. ; RUSCETTI, F. W. ; GALLO, R.: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. In: *Science* 193 (1976), Nr. 4257, S. 1007–8
- [76] MOTA, G. ; MOLDOVAN, I. ; CALUGARU, A. ; HIRT, M. ; KOZMA, E. ; GALATIUC, C. ; BRASOVEANU, L. ; BOLTZ-NITULESCU, G.: Interaction of human immunoglobulin G with CD16 on natural killer cells: ligand clearance, FcγRIIIA turnover and effects of metalloproteinases on FcγRIIIA-mediated binding, signal transduction and killing. In: *Scand J Immunol* 59 (2004), Nr. 3, S. 278–84

Literaturverzeichnis

- [77] NORTH, J. ; BAKHSH, I. ; MARDEN, C. ; PITTMAN, H. ; ADDISON, E. ; NAVARRETE, C. ; ANDERSON, R. ; LOWDELL, M. W.: Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. In: *J Immunol* 178 (2007), Nr. 1, S. 85–94
- [78] O'CONNOR, G. M. ; GUINAN, K. J. ; CUNNINGHAM, R. T. ; MIDDLETON, D. ; PARHAM, P. ; GARDINER, C. M.: Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. In: *J Immunol* 178 (2007), Nr. 1, S. 235–41
- [79] OGAWA, K. ; TAKEUCHI, M. ; NAKAMURA, N.: Immunological effects of partially hydrolyzed arabinoxylan from corn husk in mice. In: *Biosci Biotechnol Biochem* 69 (2005), Nr. 1, S. 19–25
- [80] OHARA, Onai K. I.: Modified arabinoxylan from rice bran (BioBran/MGN-3) improves glucose tolerance in NIDDM adult rats given Streptozotocin as neonates. In: *Stuies, Aichi Gakusen University* 37 (2002), Nr. 17-23
- [81] OHARA, Tabuchi R.-Onai K. I.: Effects of modified arabinoxylan from rice bran (BioBran/MGN3) on serum lipids and taste preference in Streptozotocin-induced diabetic rats. In: *Nutrition Research* 20 (2000), Nr. 1, S. 59–68
- [82] OLCESE, L. ; LANG, P. ; VELY, F. ; CAMBIAGGI, A. ; MARGUET, D. ; BLERY, M. ; HIPPEN, K. L. ; BIASSONI, R. ; MORETTA, A. ; MORETTA, L. ; CAMBIER, J. C. ; VIVIER, E.: Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. In: *J Immunol* 156 (1996), Nr. 12, S. 4531–4
- [83] OOI, V. E. ; LIU, F.: Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. In: *Curr Med Chem* 7 (2000), Nr. 7, S. 715–29
- [84] PENAFUERTE, C. ; BAUTISTA-LOPEZ, N. ; MOHAMED-RACHID, B. ; ROUTY, J. P. ; GALIPEAU, J.: The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation. In: *Cancer Res* 69 (2009), Nr. 23, S. 9020–8
- [85] PENDE, D. ; BIASSONI, R. ; CANTONI, C. ; VERDIANI, S. ; FALCO, M. ; DONATO, C. di ; ACCAME, L. ; BOTTINO, C. ; MORETTA, A. ; MORETTA, L.: The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. In: *J Exp Med* 184 (1996), Nr. 2, S. 505–18
- [86] PORGADOR, A.: Natural cytotoxicity receptors: pattern recognition and involvement of carbohydrates. In: *ScientificWorldJournal* 5 (2005), S. 151–4

Literaturverzeichnis

- [87] RAULET, D. H. ; VANCE, R. E.: Self-tolerance of natural killer cells. In: *Nat Rev Immunol* 6 (2006), Nr. 7, S. 520–31
- [88] RAVETCH, J. V. ; LANIER, L. L.: Immune inhibitory receptors. In: *Science* 290 (2000), Nr. 5489, S. 84–9
- [89] REICHERT, J. M. ; VALGE-ARCHER, V. E.: Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. In: *Nat Rev Drug Discov* 6 (2007), Nr. 5, S. 349–56
- [90] RESTIFO, N. P. ; MARINCOLA, F. M. ; KAWAKAMI, Y. ; TAUBENBERGER, J. ; YANNELLI, J. R. ; ROSENBERG, S. A.: Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. In: *J Natl Cancer Inst* 88 (1996), Nr. 2, S. 100–8
- [91] ROSENBERG, S. A. ; GRIMM, E. A. ; MCGROGAN, M. ; DOYLE, M. ; KAWASAKI, E. ; KOTHS, K. ; MARK, D. F.: Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. In: *Science* 223 (1984), Nr. 4643, S. 1412–4
- [92] ROSENBERG, S. A. ; LOTZE, M. T. ; MUUL, L. M. ; CHANG, A. E. ; AVIS, F. P. ; LEITMAN, S. ; LINEHAN, W. M. ; ROBERTSON, C. N. ; LEE, R. E. ; RUBIN, J. T. ; AL. et: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. In: *N Engl J Med* 316 (1987), Nr. 15, S. 889–97
- [93] ROSENBERG, S. A. ; LOTZE, M. T. ; YANG, J. C. ; AEBERSOLD, P. M. ; LINEHAN, W. M. ; SEIPP, C. A. ; WHITE, D. E.: Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. In: *Ann Surg* 210 (1989), Nr. 4, S. 474–84; discussion 484–5
- [94] ROSENBERG, S. A. ; LOTZE, M. T. ; YANG, J. C. ; TOPALIAN, S. L. ; CHANG, A. E. ; SCHWARTZENTRUBER, D. J. ; AEBERSOLD, P. ; LEITMAN, S. ; LINEHAN, W. M. ; SEIPP, C. A. ; AL. et: Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. In: *J Natl Cancer Inst* 85 (1993), Nr. 8, S. 622–32
- [95] RUGGERI, L. ; AVERSA, F. ; MARTELLI, M. F. ; VELARDI, A.: Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. In: *Immunol Rev* 214 (2006), S. 202–18
- [96] RUSSELL, J. H. ; LEY, T. J.: Lymphocyte-mediated cytotoxicity. In: *Annu Rev Immunol* 20 (2002), S. 323–70
- [97] SHIN, E. C. ; CHOI, K. S. ; KIM, S. J. ; SHIN, J. S.: Modulation of the surface

- expression of CD158 killer cell Ig-like receptor by interleukin-2 and transforming growth factor-beta. In: *Yonsei Med J* 45 (2004), Nr. 3, S. 510–4
- [98] SIVORI, S. ; VITALE, M. ; MORELLI, L. ; SANSEVERINO, L. ; AUGUGLIARO, R. ; BOTTINO, C. ; MORETTA, L. ; MORETTA, A.: p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. In: *J Exp Med* 186 (1997), Nr. 7, S. 1129–36
- [99] SMITH, K. A.: T-cell growth factor. In: *Immunol Rev* 51 (1980), S. 337–57
- [100] SMITH, K. A.: Interleukin-2: inception, impact, and implications. In: *Science* 240 (1988), Nr. 4856, S. 1169–76
- [101] SRIVASTAVA, S. ; LUNDQVIST, A. ; CHILDS, R. W.: Natural killer cell immunotherapy for cancer: a new hope. In: *Cytotherapy* 10 (2008), Nr. 8, S. 775–83
- [102] STARK, S. ; WATZL, C.: 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. In: *Int Immunol* 18 (2006), Nr. 2, S. 241–7
- [103] STEWART, C. A. ; LAUGIER-ANFOSSI, F. ; VELY, F. ; SAULQUIN, X. ; RIEDMULLER, J. ; TISSERANT, A. ; GAUTHIER, L. ; ROMAGNE, F. ; FERRACCI, G. ; AROSA, F. A. ; MORETTA, A. ; SUN, P. D. ; UGOLINI, S. ; VIVIER, E.: Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Nr. 37, S. 13224–9
- [104] TALMADGE, J. E. ; HERBERMAN, R. B. ; CHIRIGOS, M. A. ; MALUSH, A. E. ; SCHNEIDER, M. A. ; ADAMS, J. S. ; PHILIPS, H. ; THURMAN, G. B. ; VARESI, L. ; LONG, C. ; AL. et: Hyporesponsiveness to augmentation of murine natural killer cell activity in different anatomical compartments by multiple injections of various immunomodulators including recombinant interferons and interleukin 2. In: *J Immunol* 135 (1985), Nr. 4, S. 2483–91
- [105] TANI, M. ; TANIMURA, H. ; YAMAUE, H. ; TSUNODA, T. ; IWAHASHI, M. ; NOGUCHI, K. ; TAMAI, M. ; HOTTA, T. ; MIZOBATA, S.: Augmentation of lymphokine-activated killer cell activity by lentinan. In: *Anticancer Res* 13 (1993), Nr. 5C, S. 1773–6
- [106] TARTOUR, E. ; MATHIOT, C. ; FRIDMAN, W. H.: Current status of interleukin-2 therapy in cancer. In: *Biomed Pharmacother* 46 (1992), Nr. 10, S. 473–84
- [107] TERAKAWA, N. ; MATSUI, Y. ; SATOI, S. ; YANAGIMOTO, H. ; TAKAHASHI, K. ; YAMAMOTO, T. ; YAMAO, J. ; TAKAI, S. ; KWON, A. H. ; KAMIYAMA, Y.: Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled trial. In: *Nutr Cancer* 60 (2008), Nr. 5, S. 643–51

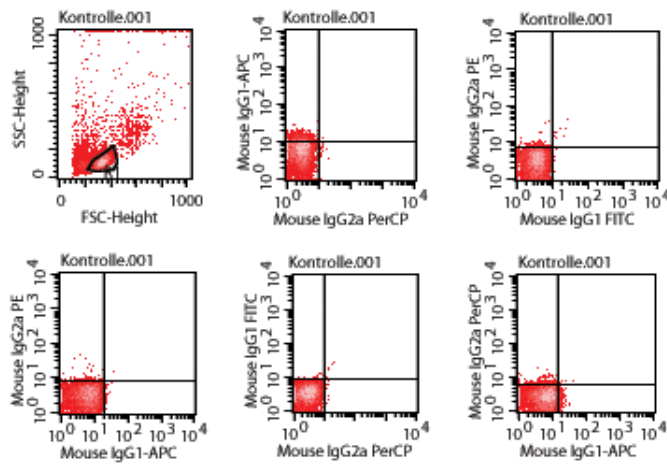
- [108] TRACEY, K. J. ; CERAMI, A.: Tumor necrosis factor in the malnutrition (cachexia) of infection and cancer. In: *Am J Trop Med Hyg* 47 (1992), Nr. 1 Pt 2, S. 2–7
- [109] TSUNEKAWA, H.: Effect of long-term administration of immunomodulatory food on cancer patients completing conventional treatments. In: *Clinical Pharmacology and Therapy* 14 (2004), Nr. 3, S. 295–302
- [110] VITALE, M. ; BOTTINO, C. ; SIVORI, S. ; SANSEVERINO, L. ; CASTRICONI, R. ; MARCENARO, E. ; AUGUGLIARO, R. ; MORETTA, L. ; MORETTA, A.: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. In: *J Exp Med* 187 (1998), Nr. 12, S. 2065–72
- [111] VIVIER, E. ; DAERON, M.: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. In: *Immunol Today* 18 (1997), Nr. 6, S. 286–91
- [112] VIVIER, E. ; TOMASELLO, E. ; BARATIN, M. ; WALZER, T. ; UGOLINI, S.: Functions of natural killer cells. In: *Nat Immunol* 9 (2008), Nr. 5, S. 503–10
- [113] WARLE, M. C. ; FARHAN, A. ; METSELAAR, H. J. ; HOP, W. C. ; PERREY, C. ; ZONDERVAN, P. E. ; KAP, M. ; KWEKKEBOOM, J. ; IJZERMANS, J. N. ; TILANUS, H. W. ; PRAVICA, V. ; HUTCHINSON, I. V. ; BOUMA, G. J.: Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? In: *Liver Transpl* 9 (2003), Nr. 2, S. 170–81
- [114] WASSER, S. P.: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 60 (2002), Nr. 3, S. 258–74
- [115] WELTE, S. ; KUTTRUFF, S. ; WALDHAUER, I. ; STEINLE, A.: Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. In: *Nat Immunol* 7 (2006), Nr. 12, S. 1334–42
- [116] WILLEMZE, R. ; RODRIGUES, C. A. ; LABOPIN, M. ; SANZ, G. ; MICHEL, G. ; SOCIE, G. ; RIO, B. ; SIRVENT, A. ; RENAUD, M. ; MADERO, L. ; MOHTY, M. ; FERRA, C. ; GARNIER, F. ; LOISEAU, P. ; GARCIA, J. ; LECCHI, L. ; KOGLER, G. ; BEGUIN, Y. ; NAVARRETE, C. ; DEVOS, T. ; IONESCU, I. ; BOUDJEDIR, K. ; HERR, A. L. ; GLUCKMAN, E. ; ROCHA, V.: KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. In: *Leukemia* 23 (2009), Nr. 3, S. 492–500
- [117] WU, J. ; LANIER, L. L.: Natural killer cells and cancer. In: *Adv Cancer Res* 90 (2003), S. 127–56
- [118] YRON, I. ; WOOD, Jr. T. A. T. A. ; SPIESS, P. J. ; ROSENBERG, S. A.: In vitro

Literaturverzeichnis

growth of murine T cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. In: *J Immunol* 125 (1980), Nr. 1, S. 238–45

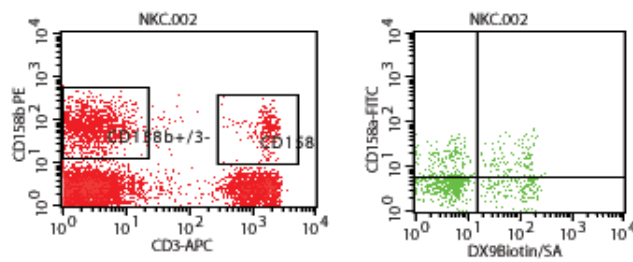
Anhang

Beispiel einer FACS-Auswertung



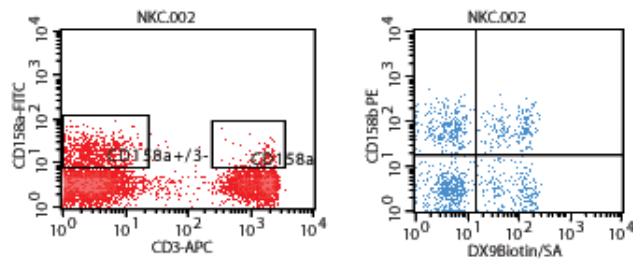
File: NKC.002
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G1

Region	Events	% Gated	% Total
R1	9836	100.00	80.87
CD158b+/3-	1740	17.69	14.31
CD158b+/3+	309	3.14	2.54
CD158a+/3-	1054	10.72	8.67
CD158a+/3+	111	1.13	0.91
CD158e+/3-	1325	13.47	10.89
CD158e+/3+	198	2.01	1.63
CD3+/56+	1182	12.02	9.72
CD3-/56+	4481	45.56	36.84
CD56dim/16-	2	0.02	0.02
CD56dim/16+	4775	48.55	39.26
3+/56+	931	9.47	7.65
3-/56+	2539	25.81	20.87
56+/3+	1486	15.11	12.22
56+/3-	8325	84.64	68.45



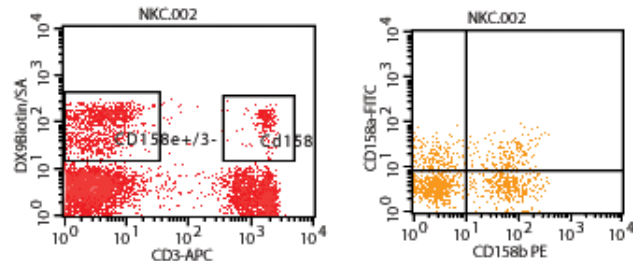
File: NKC.002
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G2

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	378	21.72	3.11
UR	223	12.82	1.83
LL	833	47.87	6.85
LR	306	17.59	2.52



File: NKC.002
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G4

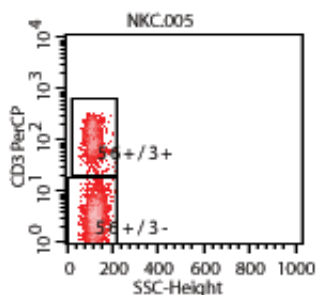
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	251	23.81	2.06
UR	171	16.22	1.41
LL	433	41.08	3.56
LR	199	18.88	1.64



File: NKC.002
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G6

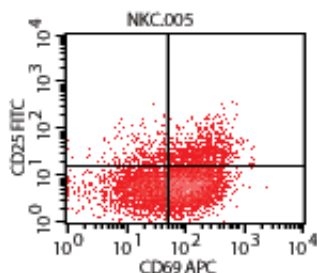
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	177	13.36	1.46
UR	183	13.81	1.50
LL	601	45.36	4.94
LR	364	27.47	2.99

Anhang



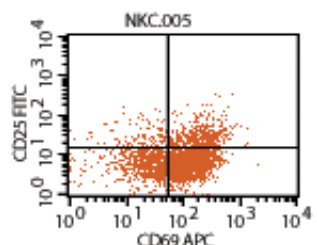
File: NKC.005
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G1

Region	Events	% Gated	% Total
R1	7505	100.00	35.94
CD158b+/3-	1268	16.90	6.07
CD158b+/3+	442	5.89	2.12
CD158a+/3-	515	6.86	2.47
CD158a+/3+	505	6.73	2.42
CD158e+/3-	1108	14.76	5.31
Cd158e+/3+	57	0.76	0.27
CD3+/56+	2135	28.45	10.23
CD3-/56+	4457	59.39	21.35
CD56+/16-	10	0.13	0.05
CD56dim/16-	1167	15.55	5.55
3+/56+	2220	29.58	10.63
3-/56+	4346	57.91	20.81
56+/3+	2376	31.66	11.38
56+/3-	5111	68.10	24.48



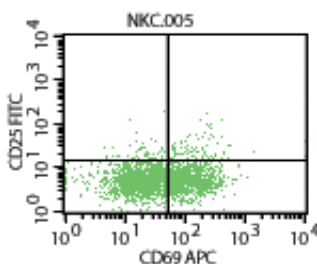
File: NKC.005
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	321	4.28	1.54
UR	921	12.27	4.41
LL	2618	34.88	12.54
LR	3645	48.57	17.46



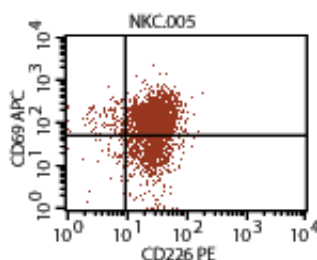
File: NKC.005
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G15

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	265	5.18	1.27
UR	821	16.06	3.93
LL	1320	25.83	6.32
LR	2705	52.93	12.95



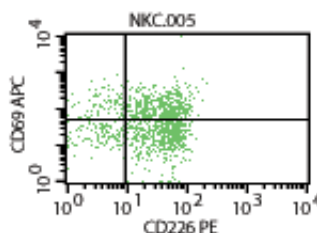
File: NKC.005
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G14

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	52	2.19	0.25
UR	93	3.91	0.45
LL	1297	54.59	6.21
LR	934	39.31	4.47



File: NKC.005
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G15

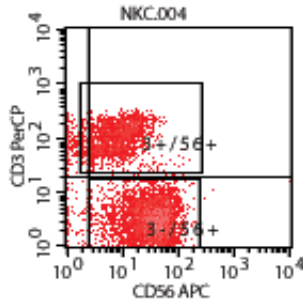
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	184	3.60	0.88
UR	3359	65.72	16.09
LL	84	1.64	0.40
LR	1484	29.04	7.11



File: NKC.005
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G14

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	164	6.90	0.79
UR	873	36.74	4.18
LL	226	9.51	1.08
LR	1113	46.84	5.33

Anhang

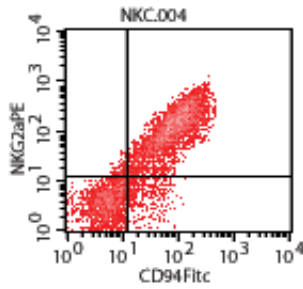


File: NKC.004
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	323	4.05	1.57
UR	2211	27.76	10.72
LL	76	0.95	0.37
LR	5356	67.24	25.97

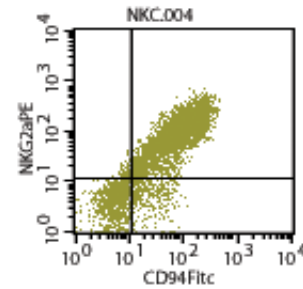
File: NKC.004
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G1

Region	Events	% Gated	% Total
R1	7966	100.00	38.62
CD158b+/3-	2117	26.58	10.26
CD158b+/3+	0	0.00	0.00
CD158a+/3-	2243	28.16	10.88
CD158a+/3+	0	0.00	0.00
CD158e+/3-	2498	31.36	12.11
Cd158e+/3+	0	0.00	0.00
CD3+/56+	2214	27.79	10.73
CD3-/56+	5266	66.11	25.53
CD56+/16-	13	0.16	0.06
CD56dim/16-	2543	31.92	12.33
3+/56+	2289	28.73	11.10
3-/56+	5333	66.95	25.86
56+/3+	2514	31.56	12.19
56+/3-	5420	68.04	26.28



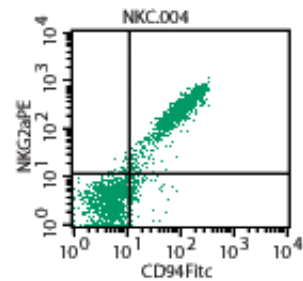
File: NKC.004
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	167	2.10	0.81
UR	5067	63.61	24.57
LL	2318	29.10	11.24
LR	414	5.20	2.01



File: NKC.004
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G13

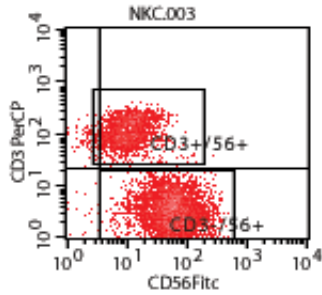
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	105	1.97	0.51
UR	3883	72.81	18.83
LL	1008	18.90	4.89
LR	337	6.32	1.63



File: NKC.004
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G12

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	33	1.44	0.16
UR	1065	46.53	5.16
LL	1088	47.53	5.28
LR	103	4.50	0.50

Anhang

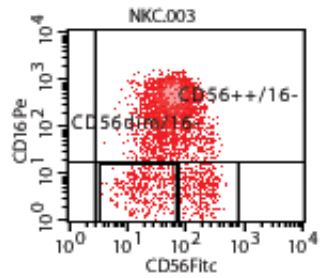


File: NKC.003
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	134	1.84	0.73
UR	2157	29.63	11.79
LL	20	0.27	0.11
LR	4970	68.26	27.16

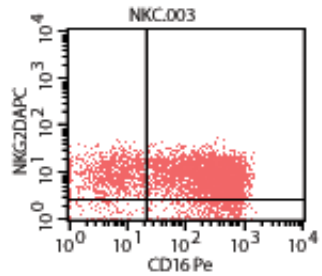
File: NKC.003
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G9

Region	Events	% Gated	% Total
R1	4958	100.00	27.09
CD158b+/3-	3077	62.06	16.81
CD158b+/3+	0	0.00	0.00
CD158a+/3-	4179	84.29	22.84
CD158a+/3+	0	0.00	0.00
CD158e+/3-	58	1.17	0.32
CD158e+/3+	0	0.00	0.00
CD3+/56+	0	0.00	0.00
CD3-/56+	4958	100.00	27.09
CD56+/+/16-	384	7.75	2.10
CD56dim/16-	453	9.14	2.48
3+/56+	0	0.00	0.00
3-/56+	4445	89.65	24.29
56+/3+	0	0.00	0.00
56+/3-	4946	99.76	27.03



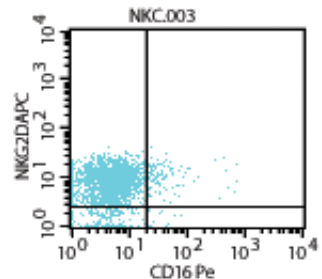
File: NKC.003
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G9

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	4092	82.53	22.36
LL	0	0.00	0.00
LR	866	17.47	4.73



File: NKC.003
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G9

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	832	16.78	4.55
UR	3582	72.25	19.57
LL	76	1.53	0.42
LR	468	9.44	2.56



File: NKC.003
Acquisition Date: 17-Apr-08
Gate: G8

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1891	85.88	10.33
UR	114	5.18	0.62
LL	186	8.45	1.02
LR	11	0.50	0.06

Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Handgretinger für die Überlassung des interessanten Themas und die Aufnahme in sein Labor. Bei Dr. Matthias Pfeiffer bedanke ich mich für die gute, geduldige und kompetente Betreuung, die zahlreichen Hilfestellungen und die wertvollen Ratschläge.

Bei den Mitarbeitern des KMT- und des hämatologischen Labors, sowie den anderen Doktoranden bedanke ich mich recht herzlich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank Annie Barbarin-Dorner, für die geduldige Einarbeitungsphase, die vielen Tipps und Tricks und ihre Mithilfe bei der Studie. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei denjenigen, die freiwillig bei der Studie mitgemacht haben.

Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern und Freunden, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und mir bei Ausarbeitung und Formatierung geholfen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Petra Zerbes
Geburtsdatum 28.05.1984
Geburtsort Freiburg i.Br.

Schule / Studium

1995 - 2003 Scheffel-Gymnasium Bad Säckingen
06.2003 Abitur
10.2003 - 12.2004 Studium der Sonderpädagogik an der PH-Heidelberg
04.2005 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhardt-Karls-Universität
Tübingen
21.03.2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.2007 Beginn der Promotion an der Kinderklinik Tübingen unter Prof. Dr.
Handgretinger: „Untersuchung zum Einfluss des Nahrungsergänzungs-
präparates Biobran/MGN-3 auf die Zytotoxizität Natürlicher
Killerzellen“
03.2009 – 09.02009 Auslandssemester an der Université Victor-Segalen Bordeaux
seit 08.2010 Praktisches Jahr
1. Tertial: Innere Medizin (Coventry, England; Tübingen)
2. Tertial: Pädiatrie (Tübingen)
3. Tertial: Chirurgie (Visp, Schweiz)
27.10.2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktika/ Berufserfahrung

03.2005 - 08.2005 Krankenpflegepraktikum, Uniklinik Heidelberg (Gastroenterologie)
03.2006 - 04.2006 Krankenpflegepraktikum, Uniklinik Lausanne (HNO)
seit 06.2006 Nachtwache bei einem pflegebedürftigen, schwerstbehinderten Kind
09.2007 - 10.2007 Famulatur in der Loretto-Klinik Tübingen (ambulante Chirurgie)
07.2008 - 09.2008 Famulatur im Western Regional Hospital Pokhara, Nepal
(Gynäkologie)
03.2009 – 09.02009 Während des Auslandsaufenthaltes in Frankreich jeweils 2monatige
Praktika in den Bereichen Chirurgie/Orthopädie, Gastroenterologie
und auf der Notaufnahme
seit 10.2009 Tutor für jüngere Semester im Bereich Innere Medizin/ SkillsLab