

Einfluss von Komplementfaktor C3a und synthetischem  
C3a-Rezeptor-Agonist auf die C3a-Rezeptorexpression und  
Antitumorreaktivität von natürlichen Killerzellen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Hans-Guido Holl

aus

Mutlangen

2016

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.R. Salih

2. Berichterstatter: Juniorprofessor Dr. H. Langer

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>DAS MENSCHLICHE IMMUNSYSTEM</b>	<b>6</b>
1.1.1	ANGEBORENE IMMUNABWEHR	6
1.1.1.1	Grundlagen und Pathogenerkennung	6
1.1.1.2	Zellen der angeborenen Immunantwort	8
1.1.1.3	Major Histocompatibility Complex (MHC)	10
1.1.2	ERWORBENE IMMUNABWEHR	11
1.1.2.1	Grundlagen und Aktivierungsprozesse	11
1.1.2.2	Zellen der erworbenen Immunantwort	11
1.1.2.2.1	T-Zellen	11
1.1.2.2.2	B-Zellen	13
1.1.2.3	Antikörper	14
<b>1.2</b>	<b>NATÜRLICHE KILLERZELLEN</b>	<b>15</b>
1.2.1	GRUNDLAGEN	15
1.2.2	AKTIVIERUNG UND HEMMUNG	16
1.2.2.1	Grundlagen	16
1.2.2.2	Rezeptoren	17
1.2.2.2.1	Killer-immunoglobulin-like receptors (KIR)	17
1.2.2.2.2	Killer lectine-like receptors	18
<b>1.3</b>	<b>KOMPLEMENTSYSTEM</b>	<b>19</b>
1.3.1	GRUNDLAGEN UND FUNKTIONEN	19
1.3.1.1	Aktivierung	20
1.3.1.1.1	Der klassische Aktivierungsweg	21
1.3.1.1.2	Der Lektin-Weg	22
1.3.1.1.3	Der alternative Weg	22
1.3.2	REGULATION	23
1.3.3	KOMPLEMENTFAKTOR C3A	24
1.3.3.1	Funktionen von C3a	25
1.3.4	KOMPLEMENTREZEPTOR C3AR	26
1.3.4.1	Liganden	27
<b>1.4</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>30</b>

2.1.1	ZELLINIEN	30
2.1.2	GERÄTE	30
2.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
2.1.4	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	32
2.1.5	ANTIKÖRPER UND ZYTOKINE	33
2.1.6	MEDIEN	35
2.1.7	C3A-REZEPTORAGONISTEN	35
<b>2.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>37</b>
2.2.1	ETHIKKOMMISSION	37
2.2.2	ZELLKULTUR	37
2.2.2.1	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	37
2.2.2.2	Kultivierung verwendeter Zelllinien	37
2.2.3	ISOLIERUNG VON PBMC	38
2.2.4	POLYKLONALE NK-ZELLEN	39
2.2.5	FACS-ANALYSE	40
2.2.6	STIMULATIONSASSAYS	41
2.2.7	<sup>51</sup> CHROM-RELEASE-ASSAY	42
2.2.8	INTERNALISIERUNGSASSAYS	44
2.2.9	STATISTIK	44
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>EXPRESSION DES C3A-REZEPTORS AUF NK-ZELLEN</b>	<b>46</b>
3.1.1	EXPRESSION DES C3A-REZEPTORS AUF NK <sub>PBMC</sub> IN KULTUR	48
<b>3.2</b>	<b>STIMULATION DES C3A-REZEPTORS</b>	<b>49</b>
3.2.1	STIMULATION MIT ZYTOKINEN	49
3.2.2	STIMULATION MIT TLR-LIGANDEN	50
<b>3.3</b>	<b>VERHALTEN DES C3A-REZEPTORS NACH STIMULATION MIT SYNTHETISCHEM C3AR-AGONISTEN</b>	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>BEEINFLUSSUNG DER ANTITUMORREAKTIVITÄT VON NK<sub>PBMC</sub></b>	<b>55</b>
3.4.1	EINFLUSS DES SYNTHETISCHEN C3AR-AGONISTEN	56
3.4.2	EINFLUSS VON C3A57-77	57
3.4.3	EINFLUSS VON C3ASA	59
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<hr/>		

<b><u>5</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>68</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>78</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>DANKSAGUNGEN</u></b>	<b><u>90</u></b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>91</u></b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem ist als ein aus vielen Bestandteilen bestehendes System verantwortlich für die Verteidigung des Organismus gegen pathogene Erreger, entartete Körperzellen und schädliche Substanzen, wie zum Beispiel Insektengifte. Wenngleich das Immunsystem, zum einen direkt Infektionen abwehrt, sorgt es zum anderen auch für die Möglichkeit symbiontischer Konstellationen zwischen Mikroorganismen und dem menschlichen Körper, indem es auch Toleranzbildung zulässt [1, 2].

Grundsätzlich kann das Immunsystem in erworbene und angeborene, sowie zelluläre und humorale Abwehr unterteilt werden [1]. Für eine effektive und erfolgreiche Immunabwehr sind aber auch chemische und enzymatische Barrieren, wie Magensäure und Tränenflüssigkeit, und das lymphatische Gewebe von essentieller Bedeutung [2]. Das lymphatische Gewebe wird in primäres und sekundäres lymphatisches Gewebe eingeteilt, wobei das primäre lymphatische Gewebe für Produktion und Ausreifung der Immunzellen im Knochenmark und im Thymus verantwortlich ist, während das sekundäre lymphatische Gewebe mit seinen lymphatischen Follikeln einen Raum für die Immunantwort bietet [3]. Alle Zellen des Immunsystems entspringen einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks. Durch verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren reifen aus der Stammzelle die immunkompetenten Zellen heran [1]. Alle Teile des Immunsystems kommunizieren miteinander. So entsteht ein hoch effizientes, lern- und erinnerungsfähiges Abwehrsystem [1-3].

### 1.1.1 Angeborene Immunabwehr

#### 1.1.1.1 Grundlagen und Pathogenerkennung

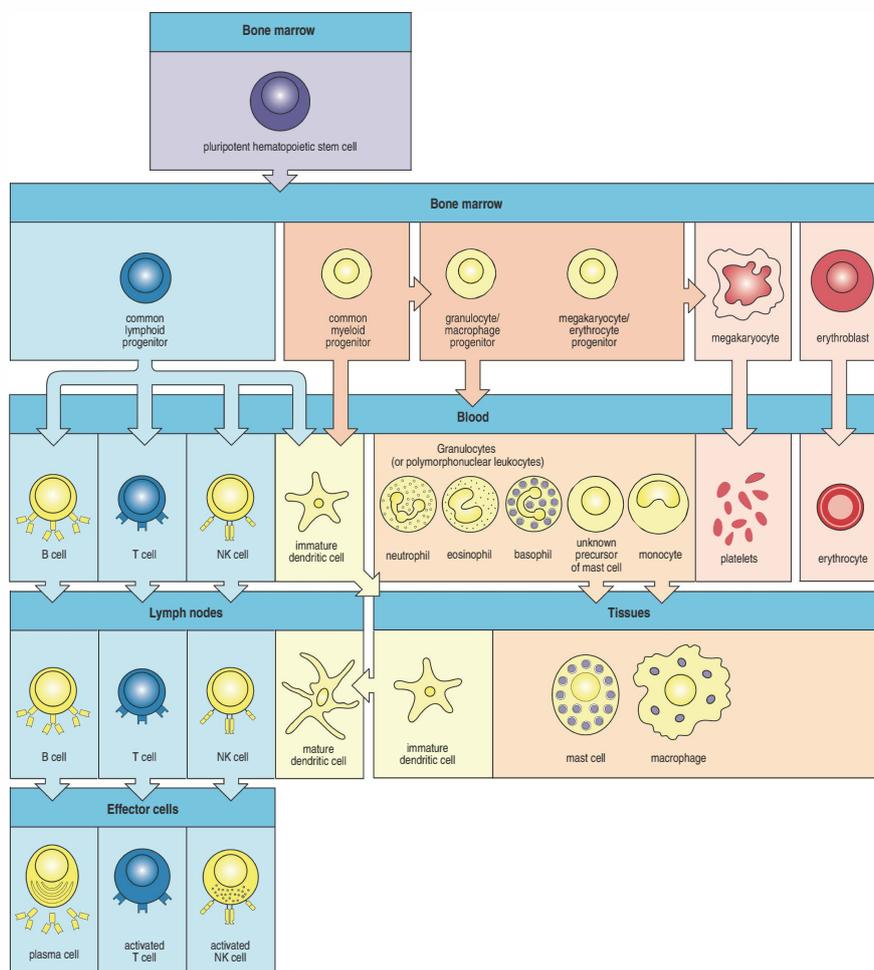
Die angeborene Immunabwehr wird häufig als die erste Linie der Abwehr bezeichnet. Die meisten Krankheitserreger, mit denen der Organismus täglich konfrontiert wird, werden binnen Minuten bis Stunden von der angeborenen Abwehr erkannt und eliminiert. Dabei ist, im Gegensatz zur erworbenen Immunabwehr, keine klonale Selektion von antigenspezifischen Lymphozyten nö-

tig [1, 4]. Ferner ist die angeborene Immunabwehr essentiell für die Aktivierung des erworbenen Immunsystems, zum Beispiel durch die Produktion kostimulatorischer Moleküle bei der T-Zell-Aktivierung [5]. Die Erkennung der pathogenen Erreger erfolgt meist über pattern recognition receptors (PRR), die pathogenassoziierte molekulare Strukturen (PAMP, pathogen-associated molecular pattern) auf den pathogenen Zellen erkennen. PAMPs sind hochkonservierte Molekülstrukturen, wie Zuckermoleküle, Lipopolysaccharide (LPS), Proteine oder Nucleinsäuren, durch die sich die Zelle des Organismus von der des Erregers unterscheidet [1, 4-6].

PRR existieren in einer großen Bandbreite und werden auf unterschiedlichen Ebenen der Zelle exprimiert. So ist das Mannose-binding Lectin (MBL) ein löslicher PRR, der das Komplementsystem aktiviert. Scavenger-, C-Typ Lektin- und Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Transmembranrezeptoren [7]. Toll-like Rezeptoren sind wahrscheinlich die bekanntesten PRRs. Beim Menschen sind 10 verschiedene Subtypen bekannt, die jeweils unterschiedliche Liganden haben. So werden beispielsweise Lipopolysaccharide von TLR4 und Einzelstrang-RNA von TLR8 erkannt. TLR bei Säugetieren sind in der Lage PAMP direkt zu erkennen, im Gegensatz zu TLR der Drosophila, die zur Bindung an PAMP die Aktivierung durch Spätzle benötigen [8, 9]. TLRs werden von beinahe allen Zellen des Immunsystems, angeboren sowie erworben, exprimiert. RIG-I-like- und NOD-like-Rezeptoren befinden sich im Zytosol und dienen unter anderem der Erkennung viraler DNA oder RNA im Zellinneren [7]. Die Erkennung über RIG-I-like-Rezeptoren aktiviert NF- $\kappa$ B und IRF-3, wobei RIG-I-like-Rezeptoren, im Gegensatz zu TLR, in fast allen Zelltypen vorkommen und so, durch die Ausschüttung von Zytokinen, eine Immunantwort ausgelöst wird [1, 6, 10]. Obwohl die PRRs hauptsächlich der Erkennung pathogener Strukturen durch Zellen der angeborenen Immunabwehr dienen, sind sie ebenso auf B- und T-Zellen exprimiert und aktivieren über ihren Signalweg NF- $\kappa$ B und NFAT, was eine Aktivierung der erworbenen Immunität zur Folge hat [7].

### 1.1.1.2 Zellen der angeborenen Immunantwort

Die meisten Zellen der angeborenen Immunantwort entstehen aus einer myeloischen Vorläuferzelle. So sind Granulozyten, Mastzellen, Monozyten bzw. Makrophagen myeloischen Ursprungs. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) reifen aus der lymphoiden Vorläuferzelle heran und dendritische Zellen entstehen zum einen Teil aus der myeloischen Vorläuferzelle und zum anderen Teil aus der lymphoiden [1].



**Abbildung 1: schematische Darstellung der Hämatopoese**

Schematische Darstellung der Hämatopoese. Entnommen aus Janeway's Immunobiology 8th edition [1]

Granulozyten sind in drei Untergruppen unterteilt, die sich durch die Anfärbbarkeit ihrer Granula unterscheiden – Neutrophile, Basophile und Eosinophile. Neutrophile sind der Hauptbestandteil (zwischen 50% und 70%) der Leukozy-

ten im peripheren Blut. Granulozyten sind in der Lage, über Diapedese aus der Blutbahn in die Peripherie zu gelangen. Dazu besitzen sie Selektine und Integrine, über die sie an die Endothelschicht der Gefäße binden können und durch Zellzwischenräume in das betroffene Areal auswandern. Granulozyten besitzen ein großes Arsenal antimikrobieller Funktionen. In ihren Granula tragen sie eine Vielzahl, für pathogene Mikroorganismen toxische Proteine, die durch Degranulation freigesetzt werden. Ferner sind Granulozyten zur Phagozytose fähig und töten die phagozytierten Zellen in ihrem Phagosom ab. Außerdem können sie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen und so durch den sogenannten respiratory burst Pathogene abtöten. Während Neutrophile vor allem bei bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle spielen, finden sich Basophile hauptsächlich bei parasitären Infektionen. Eosinophilen wird eine tragende Rolle bei Allergien zugeschrieben, jedoch ist ihre Funktion noch nicht vollständig verstanden [1, 11-14].

Makrophagen gehören, wie dendritische Zellen und Granulozyten, zu den Phagozyten der angeborenen Immunantwort. Makrophagen sind die ausgereifte, ortsständige Form der im Blut zirkulierenden Monozyten. Nach Übertritt der Monozyten ins Gewebe reifen die Zellen aus und entwickeln eine an die Umgebung angepasste Funktion, wie beispielsweise Langerhanszellen der Haut, Osteoklasten der Knochen und Kupffer-Sternzellen der Leber. Makrophagen besitzen zwei Hauptaufgaben: zum einen phagozytieren und töten sie eingedrungene Erreger und Fremdkörper, zum anderen präsentieren sie immunogene Peptide über MHC II und dienen so der Kommunikation zwischen angeborener und erworbener Immunität [1, 15, 16].

Mastzellen besitzen charakteristischerweise große Granula. Sie spielen vor allem in der Auslösung allergischer Reaktionen eine bedeutende Rolle. Man geht aber auch davon aus, dass sie dem Schutz der Körperoberfläche des Gastrointestinaltraktes dienen und dort die Abwehr parasitischer Würmer gewährleisten. Die Ausschüttung ihrer Granula ist immanent für die Inflammationsaktivierung [1, 3, 17].

Dendritische Zellen oder auch antigenpräsentierende Zellen (APC), gehören wie Makrophagen und Monozyten zum mononukleären Phagozytensystem

(MPS). Sie können einerseits direkt aus der myeloischen Vorläuferzelle reifen oder als Enddifferenzierungsstufe der Monozyten entstehen. Klassische dendritische Zellen haben eine relativ kurze Lebensdauer (3 – 5 Tage) und haben ihre Hauptaufgabe in der Präsentation von Antigenen für die T-Zellaktivierung. Dazu phagozytieren sie im peripheren Gewebe Pathogene und migrieren über die afferenten Lymphbahnen in die T-Zell-Zone der Lymphknoten. Plasmacytoide dendritische Zellen sind in der Lage nach Kontakt mit Viren große Mengen an Interferon-1 auszuschütten und so die Immunabwehr zu aktivieren [1, 18].

### **1.1.1.3 Major Histocompatibility Complex (MHC)**

Die MHC-Moleküle, im Menschen auch HLA genannt, entspringen polygenen und extrem polymorphen Gensequenzen auf Chromosom 6. Die MHC Klasse I besteht aus drei  $\alpha$ -Ketten (HLA-A, -B und -C), während MHC Klasse II aus drei Paaren von je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette besteht (HLA-DR, -DP und -DO) [19, 20].

Grundsätzlich lässt sich der MHC in zwei Klassen unterteilen. MHC Klasse I (MHC I) präsentiert Peptide, die im Cytosol von Zellen entstehen. Fast jede Zelle des Körpers exprimiert MHC I und präsentiert Peptide aus der Proteinbiosynthese zur immunologischen Überwachung. Ist eine Zelle von Viren oder cytosolischen Bakterien infiziert, werden über die präsentierten Proteine  $CD8^+$ -T-Zellen aktiviert und lysieren die betroffene Zelle. MHC Klasse II (MHC II) Moleküle sind hauptsächlich auf APC exprimiert und präsentieren Peptide aus dem vesikulären System. Diese Peptide sind typischerweise Bruchstücke vorher phagozytierter Erreger und werden von  $CD4^+$ -T-Zellen erkannt [21, 22].

Der MHC unterliegt einer hohen interindividuellen Divergenz in der Gesamtbevölkerung. Dem liegt die extreme Polymorphie der MHC-Moleküle mit über 800 Allelen zu Grunde.

Die MHC-Moleküle sind die herausragende Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr [1].

## **1.1.2 Erworbene Immunabwehr**

### **1.1.2.1 Grundlagen und Aktivierungsprozesse**

Die Aktivierung der erworbenen Immunantwort erfolgt über die Präsentation von spezifischen Antigenen. Diese Aufgabe wird von APC, zu denen hauptsächlich dendritische Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen gehören, übernommen. Im Gegensatz zu Zellen der angeborenen Immunabwehr, besitzen Zellen der erworbenen Immunabwehr kaum verschiedene Arten von PRRs, die eine Reaktion auf eine große Bandbreite von Pathogenen ermöglichen würden, sondern jede reife B- bzw. T-Zelle besitzt einen spezifischen Rezeptor, der nur ein bestimmtes Antigen erkennt. So ergibt sich, dass der menschliche Körper über eine extrem große Zahl unterschiedlicher B- und T-Zellrezeptoren verfügt. Werden die Zellen nun aktiviert, proliferieren sie klonal. Es entstehen also Zellen, die den exakt gleichen Rezeptor tragen. Dieser Prozess wird klonale Expansion genannt. Die Bandbreite der spezifischen Antigenrezeptoren wird durch die somatische Rekombination gewährleistet, in dem Gene der Rezeptoren zufällig kombiniert werden und zusätzlich noch durch Insertion verschiedener Basen die Variationsbreite weiter vergrößert wird [1].

### **1.1.2.2 Zellen der erworbenen Immunantwort**

#### **1.1.2.2.1 T-Zellen**

Die Aktivierung der erworbenen Immunantwort erfordert zunächst hauptsächlich die Aktivierung von T-Zellen. B-Zellen sind zwar in der Lage, ebenfalls Antigene über ihre spezifischen B-Zellrezeptoren zu erkennen, benötigen dann aber für eine suffiziente Antikörperproduktion die Hilfe von T-Helfer-Zellen [1, 23].

Naive T-Zellen lassen sich anhand ihrer Funktion und Oberflächenmoleküle in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen unterteilen.  $CD8^+$  cytotoxische T-Zellen (CTL) sind unter anderem in der Lage, nach Aktivierung virusinfizierte Zellen zu lysieren, indem sie pathogene Peptide auf MHC I der infizierten Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor erkennen. Diese Aktivierung kann auf zwei Arten geschehen. Zum einen können CTL direkt von dendritischen Zellen aktiviert werden, in dem die-

se, selbst aktiviert durch die virale Infektion, große Menge IL2 sezernieren. Zum anderen kann eine Co-Stimulation durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgen. Erkennt eine CD4<sup>+</sup> T-Zelle ihr spezifisches Antigen, präsentiert über MHC II auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), sezerniert diese IL2 und exprimiert verstärkt CD40L. CD40L bindet daraufhin CD40 auf den APC, die daraufhin verstärkt B7 und 4-1BBL exprimieren. CTL können B7 über CD28 binden und 4-1BB bindet 4-1BBL was zusammen mit IL2 zu einer potenten Aktivierung von CTL führt [1, 24, 25].

Im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedene Untergruppen: T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>, T<sub>FH</sub> und T<sub>reg</sub>. Die Aktivierung, das Überleben und die Selektion naiver T-Zellen in T<sub>H1</sub> und T<sub>H2</sub>, sowie T<sub>reg</sub> Zellen, erfolgt über drei grundsätzliche Faktoren. Zum einen ist zur Aktivierung die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem über MHC II präsentierten Antigen nötig. Zur Sicherstellung des Überlebens der T-Zelle ist zum zweiten die Bindung von CD80 bzw. CD86 mit CD28 und CTLA4 essentiell. Dies hat einerseits einen kostimulatorischen Effekt auf die Aktivierung der naiven T-Zellen zur Folge, andererseits wird so die Expression von CD40L gesteigert, was schlussendlich die Differenzierung der T-Zelle ermöglicht [1, 23, 26]. Ein Ausbleiben dieser Interaktion kann eine Toleranzentwicklung zur Folge haben [23]. Der dritte und schlussendlich entscheidende Faktor für die Differenzierung sind Faktoren, die die Entwicklung zu den einzelnen Subtypen der T-Zellen möglich machen. IL-12, -23, -27, IFNs und ICAM1 fördern die Entwicklung von T<sub>H1</sub>-Zellen; CCL2 und OX40L die Entwicklung in Richtung T<sub>H2</sub>; sowie IL-10 und TGF-β in Richtung T<sub>reg</sub> [23]. Jede T-Zell-Subgruppe übt spezifische Funktionen in der Immunabwehr aus und wird auch, je nach Infektionserreger, spezifisch aktiviert. T<sub>H1</sub>-Zellen werden so hauptsächlich für die Kontrolle intrazellulärer Erreger benötigt, T<sub>H2</sub> für die Kontrolle parasitärer Infektionen und T<sub>reg</sub> stellen grundsätzlich die regulatorische Fraktion der T-Zellen dar, die die Aktivität der Immunantwort kontrolliert um ein Überschießen zu verhindern [1, 27].

Durch die Ausschüttung von IL-6 und TGF-β differenzieren sich naive T-Zellen zu T<sub>H17</sub>-Zellen, deren Aufgabe darin besteht, über die IL-17 induzierte Aktivie-

rung von Fibroblasten bei extrazellulären bakteriellen Infektionen Granulozyten zu rekrutieren [1].

Die Verbindung zwischen zellulärer erworbener und humoraler Immunantwort bilden T<sub>FH</sub>-Zellen. Diese T-Zelluntergruppe bildet in lymphatischen Follikeln die T-Zell-Fraktion, die B-Zellen zur Produktion hochaffiner Antikörper anregt. T<sub>FH</sub>-Zellen sind in der Lage über TH1-like Zytokine bei B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgG zu induzieren und über TH2-like Zytokine den Klassenwechsel zu anderen Isotypen wie IgG2a. Die Interaktion zwischen T<sub>FH</sub>-Zellen und B-Zellen erfolgt hauptsächlich über CD40-CD40L, sowie CD30, OX40-OX40L und ICOS. T<sub>FH</sub>-Zellen üben ihre Funktion, im Gegensatz zu anderen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, hauptsächlich in lymphatischen Follikeln aus. So ist vor allem die Expression von CXCR5 essentiell für die suffiziente Migration in die B-Zellzone [1, 28].

#### **1.1.2.2.2 B-Zellen**

Die Rekrutierung und Aktivierung von B-Zellen kann in Thymus-abhängig, also T-Zell vermittelt, oder Thymus-unabhängig unterschieden werden. B-Zellen besitzen den sogenannten B-Zell-Rezeptor, der ein Komplex aus membrangebundenem Immunglobulin und CD79a und b darstellt. Bei der T-Zell abhängigen Aktivierung bindet die B-Zelle ein Antigen, phagozytiert es und präsentiert das Peptid über MHC II. Zirkulierende B-Zellen wandern, einem CXCL12-Gradienten folgend, in die lymphatischen Follikel und werden dort von T<sub>FH</sub>-Zellen aktiviert und zur klonalen Expansion angeregt. Diese T<sub>FH</sub>-Zellen erkennen das selbe Antigen wie die B-Zellen. Essentiell für die Differenzierung, den Klassenwechsel und die somatische Hypermutation der B-Zellen ist die Interaktion von CD40L (auf T-Zellen) und CD40 (auf B-Zellen) [1, 29].

Die T-Zell unabhängige B-Zell-Aktivierung kommt durch das Binden von bakteriellen Polysacchariden zustande. Die B-Zelle kann durch den intrazellulären Reiz, der durch die Bindung eines Antigens ausgelöst wird, direkt aktiviert werden oder durch wiederholtes Binden von ein und demselben Epitop. Dies gilt unter anderem für spezifische B-Zellen in der Marginalzone der Milz, deren Wegfall für das Auftreten der OPSI (overwhelming post-splenectomy infections) verantwortlich ist [1, 3].

### **1.1.2.3 Antikörper**

Das grundsätzliche Ziel der B-Zell-Aktivierung ist die Bildung von Antikörpern, deren Aufgabe zum einen darin besteht, ein pathogenes Epitop zu binden und somit eine gezielte Immunreaktion dagegen auszulösen und zum anderen Zellen und Komplementmoleküle zur Immunabwehr zur rekrutieren. Antikörper haben eine Y-förmige Struktur [1, 30, 31]. Diese Struktur setzt sich aus zwei schweren Ketten (heavy chains) und zwei leichten Ketten (light chains) zusammen, wovon jede aus einer variablen Region (V) und einer konstanten Region (C) bestehen[32]. Die variable Region, die die Bindungsstelle des Antikörpers mit dem Epitop darstellt, unterscheidet sich von Antikörper zu Antikörper signifikant. So entsteht ein riesiger Pool verschiedener Antikörper, was sicherstellt, dass so gut wie jede Struktur erkannt werden kann. Die konstante Region (C) ist für die Effektorfunktion des Antikörpers verantwortlich [31]. Bei der enzymatischen Verdauung der Antikörper durch Papain entstehen zwei Fab-Fragmente, die in der Lage sind Antigene zu binden; sie enthalten somit also die variablen Regionen. Des Weiteren entsteht ein Fc-Teil, der für die Bindung an Fc-Rezeptoren auf Immunzellen essentiell ist.. Antikörper kommen in fünf unterschiedlichen Klassen vor, die jeweils unterschiedliche Effektoraufgaben haben. Die Klassenzuordnung ergibt sich aus den schweren Ketten, die jeweils als  $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -Ketten die Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE definieren [33]. Antikörper der Klasse IgG kommen im Serum am häufigsten vor und sind Zeichen der sekundären Immunantwort. Sie sind in der Lage Pathogene zu opsonieren, Toxine und Viren zu neutralisieren und sind die einzigen Antikörper, die plazentagängig sind. IgM sind die Antikörper der primären Immunantwort. Sie werden direkt nach Aktivierung der B-Zellen ausgeschüttet und erlauben eine schnelle, wenn auch nicht sehr spezifische Reaktion gegen pathogene Epithope. IgA werden hauptsächlich auf Schleimhautoberflächen ausgeschüttet und haben so eine Art Barrierefunktion auf exponierten Körperoberflächen im respiratorischen und gastrointestinalen Bereich. Naive B-Zellen exprimieren IgD als B-Zellrezeptor, Mastzellen reagieren vor allem auf die Bindung von IgE [32].

## 1.2 Natürliche Killerzellen

### 1.2.1 Grundlagen

Natürliche Killerzellen (NK Zellen) sind Zellen der angeborenen Immunantwort. Sie entwickeln sich aus der gleichen Vorläuferzelle wie B- und T-Zellen, jedoch ist für ihre Entwicklung, im Gegensatz zu B- und T-Zellen, kein genetisches Rearrangement nötig [34]. NK-Zellen machen bis zu 15% der zirkulierenden Lymphozyten aus [35]. NK Zellen können bestimmte bakterielle, virusinfizierte und neoplastische Zellen mittels zytotoxischer Proteine in ihren Granula abtöten. Diese lytischen Granula, welche sekretorische Lysosomen darstellen, enthalten hauptsächlich Perforin, Granzyme und Fas-Ligand [1, 36]. Perforin polymerisiert in Anwesenheit von Calcium zu ringartigen Strukturen an der Zellmembran der Zielzellen und bildet dort Poren. Durch diese Poren können nun die Granzyme in die Zielzelle eindringen und lösen dort einen apoptotischen Reiz aus [37]. Granzyme sind Serinproteasen, die die Zielzellen über verschiedene Wege in Apoptose treiben können. Hierbei sind synergistische Effekte zwischen Granzymen, Fas-Ligand und Perforin anzunehmen, da Granzyme alleine nur sehr schwache zytolytische Eigenschaften haben [38]. Fas-Ligand bindet an CD95 (Fas) und induziert über diesen, zur Familie der TNF-Rezeptoren gehörenden Rezeptor, die Apoptose der Zielzelle [39].

Im Gegensatz zu Zellen der erworbenen Immunantwort erkennen NK Zellen ihre Zielzellen durch keimbahnkodierte Rezeptoren, die im Laufe der Immunantwort keine somatische Rekombination unterlaufen. Trotzdem scheinen NK Zellen Anpassung an die jeweilige Zielstruktur zu zeigen [36]. Es ist jedoch im Unterschied zu B- und T-Zellen keine klonale Selektion zur suffizienten Abwehr nötig [40]. Zusätzlich zur Abtötung der jeweiligen Zielzellen ist auch die massive Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) von entscheidender Bedeutung, vor allem bei der Kontrolle bestimmter viraler Infektionen, bis IFN- $\gamma$  aus CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verfügbar ist [1]. Trotz aller Ähnlichkeiten zu T-Zellen, wie die gemeinsame Progenitorzelle, die gleichen Funktionen der Zelllyse wie CD8<sup>+</sup> Zellen, sind NK-Zellen nicht in der Lage IL-2 zu produzieren und besitzen keinen spezifischen NK-Zellrezeptor [41].

Es lassen sich jedoch zwei Subpopulationen von NK-Zellen durchflusszytometrisch bestimmen. Die Einteilung erfolgt anhand der Expression von CD56 in CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup>. Die CD56<sup>dim</sup>-Fraktion der NK-Zellen macht ca. 90% der gesamten Population aus und übernimmt vor allem zytotoxische Funktionen. Die CD56<sup>bright</sup>-Fraktion stellt nur 10% der NK-Zellen und hat durch die Produktion von Zytokinen vor allem immunregulatorische Funktion [35].

## **1.2.2 Aktivierung und Hemmung**

### **1.2.2.1 Grundlagen**

NK-Zellen verfügen über ein großes Repertoire verschiedener Rezeptoren, die entweder aktivierend oder hemmend auf die NK-Zelle wirken können, über die sie körperfremde und durch Stress<sup>1</sup> transformierte Zellen erkennen [41, 42]. Die Balance zwischen aktivierenden und hemmenden Signalen ist schlussendlich entscheidend für die Reaktion der NK-Zelle auf eine potentielle Zielzelle. Schon früh wurde beschrieben, dass NK-Zellen andere Zellen lysieren, die entweder kein oder nur gering MHC I auf der Oberfläche tragen, bzw. allogenes MHC I besitzen [41]. 1990 beschrieben Lundgren et al. die sogenannte „missing-self“ Hypothese, die besagt, dass fehlendes MHC I die Lyse der entsprechenden Zelle durch NK-Zellen induziert [43]. Es zeigt sich jedoch, dass MHC I für die NK-Zellen kein aktivierender Faktor ist, sondern ein inhibitorischer. So dass Zellen, die sowohl kein MHC I exprimieren als auch keine aktivierenden Faktoren, der Lyse durch NK-Zellen entgehen. Ein Beispiel hierfür sind Erythrozyten. Die „missing-self“ Hypothese ist daher alleine nicht ausreichend um die Funktion von NK-Zellen zu beschreiben.

Die „induced-self“ Hypothese beschreibt daher, dass NK-Zellen durch spezifische Liganden aktiviert werden. Diese Liganden werden von den Zielzellen selbst im Falle einer viralen Infektion oder einer malignen Transformation exprimiert und dienen als eine Art Stresssignal [44]

Inhibitorische Rezeptoren besitzen eine zytoplasmatische Peptidsequenz, genannt immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motive (ITIM). Wird ein Rezep-

---

<sup>1</sup> bakterielle, virale oder parasitäre Infektionen, maligne Transformation

tor aktiviert, kommt es zur Phosphorylierung der ITIM-Sequenz. Spezifische Phosphatasen (SHP1 und 2, sowie SHIP) inhibieren nun die Effektorfunktionen der NK-Zellen durch Hemmung der Degranulation und Verhinderung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx [41].

Aktivierende Rezeptoren aktivieren eine grundsätzlich ähnliche Signalkaskade über das sogenannte immunoreceptor tyrosine-based activation motive (ITAM) – Teil des Signalproteins DAP12 – das, im Gegensatz zum ITIM-Signalweg, die Effektorfunktionen wie Degranulation und Zytokinausschüttung bzw. -synthese aktiviert. Der erste Rezeptor, bei dem ein zytoplasmatisches ITAM nachgewiesen wurde, war der low-affinity FcγRIII-Rezeptor (CD16), der über die Bindung von Fc-Teilen ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) der NK-Zellen auslösen kann, was vor allem für die Verwendung therapeutischer Antikörper von maßgeblicher Bedeutung ist [41, 45].

### **1.2.2.2 Rezeptoren**

#### **1.2.2.2.1 Killer-immunoglobulin-like receptors (KIR)**

Neben einer Vielzahl anderer Einflussfaktoren auf die NK-Zellreaktivität sind die Rezeptoren für MHC I bzw. seine Liganden von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung bzw. Hemmung von NK-Zellen. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem human killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) und Rezeptoren der CD94/NKG2 Familie [41].

Rezeptoren der KIR-Familie binden HLA I direkt und vermitteln entweder ein inhibitorisches (iKIR) oder ein aktivierendes Signal (sKIR). Jedoch wurde gezeigt, dass die sKIR HLA entweder nur sehr gering oder gar nicht binden. Vermutlich dient dies dem Schutz vor Autoimmunreaktionen. Über die Erkennung von HLA I vermitteln KIRs daher die Selbsterkennung von NK-Zellen und inhibieren die NK-Zellreaktivität [41, 46]. Die Bindung an HLA-Moleküle wird über die namensgebenden Immunglobulin-ähnlichen Extramembrandomänen der KIR vermittelt. Die KIR-Familie gehört zu einem Cluster verschiedener Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren, dem leukozyte receptor complex (LRC), die meisten hiervon binden ebenfalls an HLA I. KIR-Gene unterliegen einem ex-

zessiven Polymorphismus und können auch monoallelisch exprimiert werden. So kann beispielsweise ein Allel des gleichen KIRs ITIM-gekoppelt sein, also inhibitorisch wirken, während das andere Allel GAP12-gekoppelt ist, und somit aktivierend wirkt [1, 41]. KIR zeigen auch deutliche interindividuelle und interpopuläre Unterschiede, was den Schluss zulässt, dass es zu einer Selektion von verschiedenen KIR-Subgruppen und damit auch zur Selektion verschiedener NK-Zell-Subpopulationen durch entsprechende Pathogenexposition kommt [47].

#### **1.2.2.2 Killer lectine-like receptors**

Die weitere große Gruppe der NK-Zell spezifischen Rezeptoren sind die sogenannten killer lectine-like receptors (KLRs). Hierzu zählen die als Heterodimer auftretenden C-Typ Lektine CD94 und NKG2. CD94:NKG2 kann verschiedenen HLA I Subklassen erkennen und unterliegt, anders als die KIRs, kaum einem genetischen Polymorphismus [41]. Ob der CD94:NKG2 Heterodimer auf die NK-Zelle aktivierend oder hemmend wirkt, wird durch die NKG-Subklasse entschieden. Während beispielsweise NKG2A ein inhibitorisches ITIM enthält, ist NKG2C GAP12 gekoppelt und aktiviert die NK-Zell-Reaktion [1]. Die Gene von CD94, sowie den NKG2-Typen A-C und E, liegen auf Chromosom 12 im sogenannten NK gene complex [34].

NKG2D kommt jedoch bei der Aktivierung von NK-Zellen eine Sonderrolle zu. NKG2D binden bei Aktivierung im Gegensatz zu den anderen aktivierenden NKG2-Molekülen DAP10 und transduziert die aktivierenden Signale via PI3-Kinsase. Es zeigt sich sogar, dass eine Transduktion trotz gleichzeitiger inhibitorischer Signale zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt. Liganden für NKG2D sind unter anderem MICA, MICB und ULBP1-3 [48-50].

NKG2D-Liganden sind MHC codierte, durch Stress induzierbare Moleküle, die nicht auf gesunden, wohl aber auf virusinfiziertem Gewebe und auf epithelialen und hämatologischen Neoplasien exprimiert werden. In der Maus konnte gezeigt werden, dass die dort analog zu den humanen NKG2DL exprimierten RAE-1 Moleküle, durch karzinogene, DNA alternierende Stoffe induziert werden

konnten. Weitere Untersuchungen konnten eine Induzierung von MICA und MICB durch Kanzerogene im Menschen zeigen [51-53].

Dieses in vitro hocheffiziente System zeigt jedoch in vivo Schwächen, da Tumorzellen in der Lage sind über viele mannigfaltige Prozesse sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen. Ein weit verbreiteter Mechanismus dieser Immune escape ist zum Beispiel das shedding – also Abstoßen der NKG2D-Liganden – von der Zellmembran [54, 55]. Die meist über Metalloproteasen freigesetzten Moleküle können in ihrer löslichen Form die Rezeptoren der NK-Zellen blockieren beziehungsweise internalisieren. Die Immunantwort kann somit moduliert werden, da die Expressionsdichte der NKG2DL direkt mit der Stärke der Immunreaktion korreliert. Dadurch ist es Tumorzellen möglich sich der Kontrolle und schlussendlich der Lyse durch NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>T-Zellen zu entziehen. [56, 57].

## **1.3 Komplementsystem**

### **1.3.1 Grundlagen und Funktionen**

Das Komplementsystem ist ein Teil des angeborenen Immunsystems, bestehend aus über 30 membrangebundenen und plasmatischen Proteinen. Die meisten dieser Proteine werden in der Leber synthetisiert und machen mit 3g/l und 15% Anteil an der Globulinfraktion einer Elektrophorese einen großen Teil der Plasmaproteine aus [58, 59]. Das System wurde 1890 von Jules Bordet als hitzelabiler Teil des normalen Blutplasmas entdeckt. Bordet ging fälschlicherweise davon aus, dass die Proteine des Komplementsystems Antikörper bei der Opsonierung von bakteriellen Zellen „komplementieren“ [1]. Diese historische Bezeichnung hat sich bis heute gehalten, ebenso die nach ihrer Entdeckung fortlaufend nummerierten Proteine [59]. Die Proteine des Komplementsystems werden als inaktive Proenzyme synthetisiert und zirkulieren auch in dieser Form im Blut. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung durch einen anderen Komplementfaktor, was die kaskadenartige Aktivierung des Komplementsystems erklärt [60].

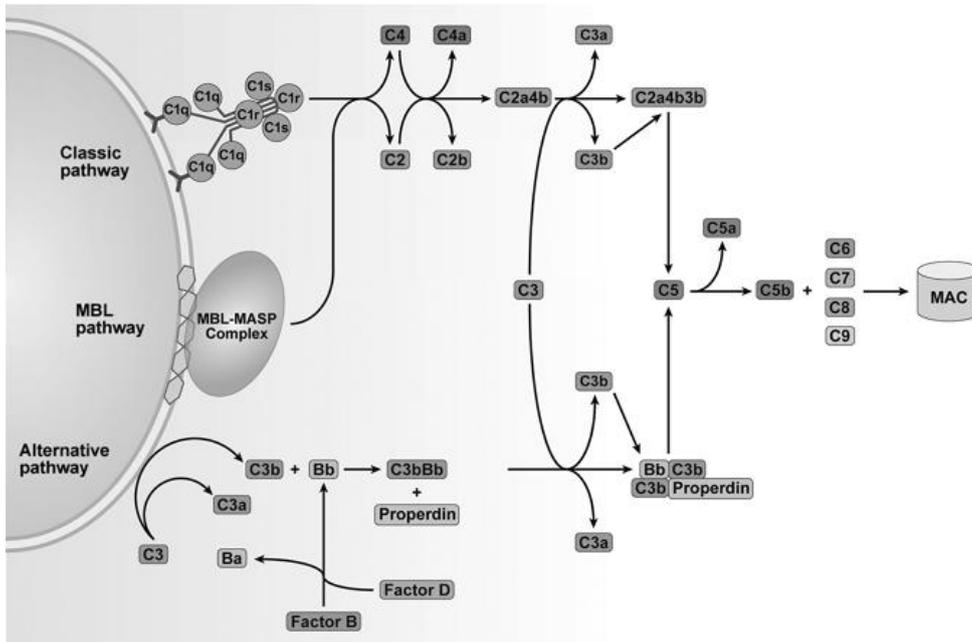
Dem Komplementsystem werden drei physiologische Hauptaufgaben zugeordnet. Die erste Aufgabe besteht in der direkten Abwehr von Infektionen des Or-

ganismus durch Bakterien und Pilze, sowie in der Lyse von virusinfizierten und neoplastischen Zellen durch Bildung des Membrane Attack Complex (MAC). Die zweite Hauptaufgabe ist die Opsonierung von bakteriellen Erregern. Dies erfolgt über die Bindung von Komplementfaktoren an die Zelloberfläche der Erreger – hauptsächlich C3b - wodurch diese von Phagozyten über Komplementrezeptoren erkannt und abgeräumt werden können. Als dritte Aufgabe wird die Rekrutierung lymphozytärer Zellen und Aktivierung der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine angesehen. Hierbei spielen vor allem die chemotaktische Wirkung von C3a und C5a eine besondere Rolle, die an Anaphylatoxinrezeptoren auf Leukozyten binden [1].

Ferner dient das Komplementsystem der Vermittlung von Interaktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem, indem die antikörpergebundene Immunantwort verstärkt wird und die Vermittlung eines immunologischen Gedächtnisses durch die Bindung der Faktoren C3a und C4b an das jeweilige Antigen deutlich verbessert wird [59]. Die Bindung von C3-Untereinheiten an CD21, CD19 und CD81 vermittelt eine schnellere Aktivierbarkeit von B-Zellen. Ebenso ist die Bindung an CD21 immanent für das Überleben von aktivierten B-Zellen im lymphatischen Follikel. Komplementfaktoren steigern ebenfalls die zelluläre Abwehr von viralen Infektionen, indem sie die Immunantwort spezifischer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verstärken [61]. Ferner werden auch Immunkomplexe und apoptotische Zellen opsoniert und somit ihre Abräumung induziert [59].

### **1.3.1.1 Aktivierung**

Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt über verschiedene Wege, deren gemeinsame Endstrecke die Bildung des Membran-Angriffskomplexes (MAC) ist [58].



**Abbildung 2: schematische Darstellung der Aktivierung des Komplementsystems**

Schematische Darstellung der drei Aktivierungswege des Komplementsystems. Entnommen aus Rutkowski et al., Cancer and the complement cascade, Mol Cancer Res, 2010 [62]

### 1.3.1.1.1 Der klassische Aktivierungsweg

Der erste – klassische – Weg wird über die Bindung des C1 Komplexes, bestehend aus den Untereinheiten C1q, C1r und C1s, an den Fc-Teil eines Antikörpers aktiviert. Zunächst bindet C1q direkt an den Fc-Teil des Antikörpers, worauf C1r eine spezifische Esterbindung der C1s-Untereinheit spaltet. Der C1-Komplex ist daraufhin in der Lage, die Faktoren C2 und C4 in ihre jeweiligen Untereinheiten a und b aufzuspalten (C2a und C2b bzw. C4a und C4b). Während C2b und C4a für den weiteren Kaskadenablauf keine Rolle mehr spielen, bildet sich aus den Einheiten C2a und C4b die sogenannte C3-Konvertase (C2a4b). Die C3-Konvertase wiederum spaltet C3 in C3a und C3b [62]. C3b ist in der Lage, eine kovalente Bindung mit der Zelloberfläche der angegriffenen Zellen einzugehen. Diese Bindung dient zum einen der Opsonierung und damit zur Markierung für komplementrezeptorpositive Phagozyten, zum anderen kann C3b die C3-Konvertase binden und so an der Zelloberfläche halten [1]. An die C3-Konvertase gebundenes C3b bildet nun C3a4b3b – die sogenannte C5-Konvertase. Die durch diese Konvertase induzierte Spaltung von C5 in C5a und

C5b markiert den letzten Schritt der Aktivierungskaskade. C5b induziert nun die Bildung des MAC, bestehend aus C6, C7, C8 und mehreren C9 Proteinen [63].

#### **1.3.1.1.2 Der Lektin-Weg**

Der Lektin-Weg nutzt die Erkennung von Oberflächenstrukturen pathogener Zellen. Diese Strukturen enthalten meist Kohlenhydrate, Lipide oder Proteine in sich wiederholender Anordnung. Dazu gehören unter anderem auch die Lipopolysaccharide (LPS) der Gram-negativen Bakterien, die auf eukaryontischen Zellen nicht zu finden sind. Der Lektin-Weg des Komplementsystems kann nun über die Bindung von vier im Blut zirkulierenden löslichen Rezeptoren für diese Oberflächenstrukturen aktiviert werden. Der zuerst entdeckte Rezeptor dieser Art war das Mannose binding lectine (MBL). Dieses Protein kann an Mannose-, Fruktose- und N-Acetylglukosamin-haltige Strukturen an Zelloberflächen binden. Die drei anderen pathogenerkennenden Proteine werden als Ficoline bezeichnet. Alle vier Moleküle werden in der Leber synthetisiert und bilden zunächst Trimere, bevor mehrere Trimere über Disulfidbrücken im Blut zu Oligomeren verbunden werden. Die Ficolin- oder MBL-Komplexe binden nun im Plasma Mannose-assoziierte Serinproteasen (MASP), die in zwei Subtypen (MASP-1 und MASP-2) vorliegen. Diese Serinproteasen liegen als Proenzyme vor und sind bis zur Bindung der Lektinkomplexe inaktiv [64, 65]. Nach der Bindung an Oberflächenstrukturen kommt es zur Aktivierung der MASP und dadurch zur Spaltung von C2 und C4, ähnlich der Spaltung durch den C1-Komplex im klassischen Aktivierungsweg. Dadurch kommt es ebenfalls zur Bildung von C2a4b und somit zur Aktivierung der Kaskade, die, gleich dem klassischen Weg, über die Spaltung von C3 und C5 schlussendlich zur Bildung des MAC führt [62].

#### **1.3.1.1.3 Der alternative Weg**

Der alternative Aktivierungsweg des Komplementsystems ist vermutlich der evolutionär älteste. Die Besonderheit dieses Weges ist die spontane Aktivierung und die besondere C3-Konvertase, die anders als die C3-Konvertase des Lektin- und des klassischen Weges (C2a4b), aus C3b und aktiviertem Faktor B

besteht. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass C3b selbst mehr C3 in C3b und C3a spalten kann und somit als eine Art Verstärkerschleife für die anderen Aktivierungswege fungiert. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten der Aktivierung des alternativen Weges:

An Zelloberflächen gebundenes C3b, das entweder aus dem Lektin- oder dem klassischen Weg stammt, bindet das Plasmaprotein Faktor B. Durch diese Bindung kann Faktor B von der Plasmaprotease Faktor D gespalten werden und wird so aktiviert.

Die andere Möglichkeit ist die Aktivierung in Form des sogenannten „tickover“. Dabei kommt es zu einer spontanen Hydrolyse einer Thioesterverbindung im C3-Molekül, so dass es zur Bildung von C3(H<sub>2</sub>O) kommt. Dadurch kommt es wiederum zur Bindung von Faktor B und dessen Spaltung durch Faktor D, was schlussendlich zur Bildung der C3-Konvertase C3(H<sub>2</sub>O)Bb führt [1]. Diese C3-Konvertasen sind prinzipiell sehr kurzlebig und werden normalerweise schnell abgebaut. Dies verhindert die Überaktivierung des Komplementsystems durch die spontane Aktivierung des alternativen Weges. Kommt es allerdings zur Bindung der C3-Konvertasen mit Properdin (Faktor P), das durch neutrophile Granulozyten gebildet wird, werden die Konvertasen stabilisiert und können über eine zweite Bindungsstelle des Properdins an Zelloberflächen von Pathogenen binden. Properdin hat Lektin-Eigenschaften und kann bestimmte Oberflächenstrukturen bakterieller Zellen binden. Durch diese Stabilisierung kann es nun zu vermehrter Bildung von C3a und C3b kommen, was bei aktivierten anderen Wegen zu deren Amplifizierung führt. Ferner kann an die C3-Konvertasen ein weiteres C3b-Molekül binden, was zur Bildung einer C5 Konvertase (C3bBb3b+Propertin bzw. C3(H<sub>2</sub>O)Bb3b+Propertin) führt und damit zur Bildung des MAC [1, 62].

### **1.3.2 Regulation**

Zur Regulation des Komplementsystems kommt eine Vielzahl verschiedener Faktoren, die zellgebunden oder plasmatisch vorkommen, zum Einsatz. Grundsätzlich stellen alle diese Faktoren sicher, dass eine Aktivierung des Komplementsystems nur an pathogenen Zellen oder an beschädigten körpereigenen

Zellen zu Stande kommt. Wichtig für die korrekte Funktion des Komplementsystems zur vermehrten Bildung der C3-Konvertase C3bBb über den alternativen Aktivierungsweg [1, 62] ist die bereits erwähnte Verstärkerschleife. So haben die meisten der Komplementregulationsproteine die Eigenschaft, entweder die Bildung der C3-Konvertase C3bBb zu verhindern oder deren schnelle Dissoziation von der Zelloberfläche zu ermöglichen. Der membrangebundene decay-accelerating factor (DAF oder CD55) kann kompetitiv an die Bindungsstelle für Bb an C3b binden oder bereits gebundenes Bb wieder verdrängen und verhindert somit die Bildung der Konvertase. Ähnliche Eigenschaften haben CD35 und CD46 (MCP), die als Kofaktor für den plasmatischen Faktor I dienen, die C3b und C4b binden und somit die Bildung der C3-Konvertase verhindern. CD35 induziert ferner, wie DAF, die Dissoziation von Bb von der C3-Konvertase [66-68]. Faktor H, ein plasmatisches Regulationsprotein, ist in der Lage C3b zu binden und so zu deaktivieren [69]. Der C1-Inhibitor (C1INH) löst den C1-Komplex, indem er C1r und C1s von C1q ablöst und damit den Startpunkt des klassischen Weges, die Antikörper-induzierte Aktivierung, hemmt [66]. CD59 schlussendlich bindet C5, C6, C7 sowie C8 und verhindert somit die Bindung von C9 an den MAC, was dessen Aktivierung verhindert [1, 66]. Des Weiteren spielt die schnelle Deaktivierung von Komplementfaktoren durch Spaltung eine bedeutende Rolle [1, 66, 70]. Fehlende oder unvollständige Regulation des Komplementsystems führt zu einer Reihe von Erkrankungen, hauptsächlich aus dem rheumatischen Formenkreis, sowie Abstoßungsreaktionen nach Transplantation [1, 71]. Als Beispiel ist hierfür der systemische Lupus erythematoses [72] und die Reaktionen des Komplementsystems gegen kleine Gefäße und Kapillaren bei Organtransplantationen zu nennen [73].

### **1.3.3 Komplementfaktor C3a**

Der Komplementfaktor C3a wird durch die Spaltung von C3 in C3a und C3b gebildet. Während C3b als weiterer Faktor in der Aktivierung der Komplementkaskade dient, hat C3a keinen direkten Einfluss auf die Bildung des MAC, sondern fungiert unter anderem als chemotaktischer und anaphylaktischer Faktor für Lymphozyten [1, 59].

C3a wird aus der  $\alpha$ -Kette des C3 gespalten und ist ein Molekül bestehend aus 77 Aminosäuren [1, 74]. Da die Spaltung von C3 ein äußerst wichtiger Teil im Ablauf der Komplementkaskade ist und, wie in Kapitel 1.3.1.1.3 beschrieben, eine Art Verstärkerschleife für den Kaskadenablauf bildet, kann die Serumkonzentration von C3a über 100 mmol/l betragen [70]; wenn gleich die C3a eine eher mittlere biologische Aktivität besitzt [1]. Das C-terminale Ende von C3a besitzt eine hochkonservierte Pentapeptidsequenz – Leu-Gly-Leu-Ala-Arg – die auch bei anderen Wirbeltieren wie Ratte und Schwein zu finden ist. Diese Pentapeptidsequenz ist, wie häufig bei hochkonservierten Peptidsequenzen, essentiell für die Bindung und Aktivierung des C3a-Rezeptors [75]. Von dem im Serum gelösten C3a wird das C-terminale Arginin durch Serum-Carboxypeptidasen abgespalten und somit faktisch deaktiviert. Das entstehende des-Arg<sup>77</sup>-C3a (C3adesArg) kann nicht mehr an den spezifischen C3a-Rezeptor (C3aR) binden [76]. C3a ist ein hoch kationisches Molekül, dessen Sekundärstruktur aus vier  $\alpha$ -Helices gebildet wird, die über drei Disulfidbrücken verbunden sind [77].

### **1.3.3.1 Funktionen von C3a**

C3a vermittelt eine weite Bandbreite an immunologisch relevanten Funktionen, wobei es sowohl Zellen des Immunsystems beeinflusst, als auch nicht zum Immunsystem gehörende Zellen [71]. C3a reguliert unter anderem die Vasodilatation, steigert die Permeabilität von kleinen Blutgefäßen und induziert die Kontraktion von glatter Muskulatur [78]. In Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten kann die Bindung von C3a einen oxidativen Burst auslösen, während basophile Granulozyten und Mastzellen mit der Ausschüttung von Histamin reagieren [71]. Auf aktivierte B-Zellen hat C3a einen modulatorischen Effekt, indem die polyklonale Immunantwort unterdrückt wird und die Ausschüttung von IL-6 und TNF gehemmt wird [79]. Ferner zeigt sich ein modulatorischer Effekt auf die Synthese von IL6- und TNF in Monozyten [71]. Auch wirkt C3a chemotaktisch auf Mastzellen, die einem Konzentrationsgradienten von C3a folgen [80]. Es wirkt jedoch im Gegensatz zu C5a nicht auf Makrophagen, neutrophile Granulozyten und aktivierte B-Zellen. C3a hat zusätzlich zu proin-

flammatorischen Eigenschaften auch regulatorische Funktionen für die Gewebsregeneration [71]. Diese Eigenschaften werden zum Teil, auch mit den Faktoren C3, C4 und C5, mit einer Begünstigung von Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht [62]. Mariewski et al. zeigten 2009, dass das Tumorwachstum in Mäusen mit C3-Defizienz deutlich eingeschränkt war. Ferner wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Komplementsystems das Tumorwachstum begünstigt. Neoplastische Zellen exprimieren vermehrt Komplementregulatorische Faktoren (zum Beispiel CD35, CD46, CD55 und CD59) und schützen sich so vor Opsonierung und Lyse durch den MAC. Gleichzeitig profitieren sie jedoch von den positiven Mechanismen, wie verbesserte Durchblutung und gesteigerte Gefäßpermeabilität, in ihrer Mikroumgebung [81]. C3a verstärkt ferner auch die Funktionen von SDF-1 auf das Homing von hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark und ihr Verbleiben in diesem Knochenmarkskompartiment [82]. Auch die SDF-1 Rekrutierung und Wanderung hämatopoetischer Stammzellen wird durch C3a verstärkt. In gestresstem oder verletztem Knochenmark trägt C3a zur Regeneration bei, ähnlich den Gewebsreparatureigenschaften, die C3a beispielweise bei Leberschädigung hat [83].

Zu Teilen wird davon ausgegangen, dass C3a zusammen mit anderen Komplementfaktoren als Biomarker für Neoplasien genutzt werden könnte. So stellten Habermann et al. 2006 fest, dass bei Patienten mit kolorektalen Tumoren deutlich erhöhte C3adesArg-Serumlevel vorliegen [84]. Jedoch gibt es bisher in der klinischen Praxis keine Anwendung für diese Ergebnisse. Auch für die kindliche Form der akuten lymphatischen Leukämie schlugen Shi et. al. C3a als potentiellen Biomarker vor [85].

#### **1.3.4 Komplementrezeptor C3aR**

Der C3a-Rezeptor (C3aR), auch complement component 3a receptor 1 (C3AR1) genannt, ist ein G Protein-gekoppelter Rezeptor aus der Gruppe der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, Untergruppe A8 [86, 87]. Der Rezeptor besteht aus sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices, die über hydrophile Loops miteinander verbunden sind. Der größere Loop Nr. 2 (zwischen Helix 4 und 5)

scheint bei der Bindung des Liganden eine besondere Rolle zu spielen, jedoch löst die Bindung keinen Effekt am Rezeptor selbst aus [88]. Die biologische Aktivität von C3a am C3aR wird über die letzten 21 C-terminalen Aminosäuren vermittelt [88, 89]. Der C3a-Rezeptor ist an ein inhibitorisches Pertussistoxin-sensitives (PTX) G-Protein gekoppelt, das einen Influx von extrazellulärem Calcium induziert [90]. Eine Aktivierung des PTX-Signalweges wurde bereits für Mikrogliazellen der Maus, für Monozyten bzw. Makrophagen und für neutrophile Granulozyten gezeigt [90-92]. Pertussistoxin inhibiert die  $\alpha_i$  Untereinheit [93], welche normalerweise die Bildung von cAMP aus ATP inhibiert [94]. Die Funktionen des Rezeptors auf verschiedene Zelltypen sind zum großen Teil noch Gegenstand der Forschung, jedoch scheint der Calciuminflux in die Zellen ein maßgeblicher Effekt der Bindung von C3a an den C3a-Rezeptor zu sein. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Aktivierung des C3a-Rezeptors zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration führt [95], was für einen  $G_i$ -Protein-Signalweg spräche. Auch über die Regulation der Rezeptorexpression ist bisher wenig bekannt.

#### **1.3.4.1 Liganden**

Außer C3a hat der C3a-Rezeptor noch weitere agonistische und antagonistische Liganden. Während im Meerschweinchen auch C4a an den C3a-Rezeptor binden kann, ist dies beim Menschen nicht der Fall [96]. Wie bereits beschrieben, sind für die Rezeptoraktivierung lediglich die letzten fünf C-terminalen Aminosäuren essentiell [75], vor allem das endständige C-terminale Arginin, nach dessen Abspaltung das C3a zu inaktivem C3adesArg wird [76]. In der Literatur werden viele agonistische Peptide beschrieben. Die letzten 21 C-terminalen Aminosäuren werden als Agonist beschrieben [89], die auch antimikrobielle Eigenschaften besitzen [70]. 1991 beschrieben Ember et al. die synthetische Produktion eines Agonisten mit 12-15facher Potenz von natürlichem C3a. Dazu verwendeten sie die letzten 15 C-terminalen Aminosäuren und veränderten die Sequenz (WWGKKYRASKLGLAR anstelle IRRQHARASHLGLAR) für bessere Bindung an die sekundäre Bindungsstelle des Rezeptors [97]. Scully et al. haben 2010 verschiedene Hexapeptide auf ihre agonistische Potenz über-

prüft, von denen sich vier als besonders potente Agonisten erwiesen [70]. SB 290157, ein synthetischer Inhibitor, zeigte in Experimenten die Eigenschaft den C3a-Rezeptor zu blockieren. In Meerschweinchenthrombozyten verhinderte das Molekül die C3aR induzierte ATP-Ausschüttung und war in der Lage an humanen C3a-Rezeptoren zu binden [98]. Ferner zeigten Mathieu et al. dass SB 290157 auch agonistische Eigenschaften besitzt [99].

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Natürliche Killerzellen sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort und verfügen über potente Wege zur Bekämpfung von virusinfizierten und entarteten Zellen. Eine suffiziente NK-Zell-Funktion ist essentiell für eine funktionierende immunologische Kontrolle und Bekämpfung maligner Neoplasien. Auch das Komplementsystem, einer der evolutionär ältesten Bestandteile des Immunsystems, ist ebenfalls wesentlich für das kompetente Funktionieren der Immunabwehr. Es erfüllt nicht nur die Funktion der eigentlichen Immunabwehr, sondern nimmt auch chemotaktische und regenerative Funktionen für Gewebe und Zellen wahr. Auch im Bereich der Entstehung und Bekämpfung von Malignomen hat das Komplementsystem entscheidende Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere C3a als Spaltprodukt bei der Hydrolyse von C3 eine begünstigende Wirkung auf das Tumorstadium bei kolorektalen Neoplasien hat [81, 84].

1982 zeigten Charriaut et al., dass C3a einen hemmenden Einfluss auf die Tumorzellaktivität von NK-Zellen besitzt [100]. Des Weiteren zeigten Habermann et al. 2006 erhöhte Serumkonzentration von C3a bei Kolonkarzinomen [84].

Ziel dieser Arbeit war, aufbauend auf den Erkenntnissen von Charriaut aufzuklären, wie NK-Zellen durch das Komplementsystem, insbesondere C3a in ihrer Funktion beeinflusst werden. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf die NK-Zell vermittelte Zytolyse von kolorektalen Tumorzellen und der Frage, ob die Lyseaktivität der NK-Zellen durch verschiedene C3a-Rezeptoragonisten, in Form verschiedener C3a-Peptide, wie dem von Ember et al. 1991 eingeführten

„Superagonist“ für den C3a Rezeptor [97] und dem synthetischen C3a-Rezeptoragonist von Sigma, beeinflusst werden kann.

Ferner wurde die Expression des C3a-Rezeptors und dessen Stimulierbarkeit analysiert, um weitere Rückschlüsse auf die Funktion des C3a-Rezeptors auf NK-Zellen zu erlauben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

HCT116	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
K562	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
K562-mb15-41BBL	St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN , USA
NK92	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
RPMI8866	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 1: verwendete Zelllinien

#### 2.1.2 Geräte

Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
MicroBeta Counter 1450 Plus	Perkin Elmar Wallac, Turku, Finnland
Cytomix FC 500 Durchflusszytometer	Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Werheim, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipetboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer, Reax Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, München, Deutschland

Zentrifugen	Heraeus, Hanau, Deutschland
-------------	-----------------------------

Tabelle 2: verwendete Geräte

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland Nun, Roskilde, Dänemark
Einmalpipetten, steril	Corning Inc., NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Werheim, Deutschland
FACS-Röhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Glasgefäße	Schott, Mainz, Deutschland
Kanülen G19	Hospira Inc. Lake Forest, IL, USA
Lumaplates (96 Wells)	Perkin Elmer, Boston, USA
Objekträger Superfrost plus	R. Langenbrick, Labortechnik, Emmendingen, Deutschland
Pasteurpipetten, long size	WU, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen, steril	VWR, Bruchsal, Deutschland
Platten für FACS (96 well)	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzenfilter, Minisart	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 3: verwendete Verbrauchsmaterialien

### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Apuwa (Aqua ad injectabile)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
BATDA Reagent	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
BD OptEIA™ Assay Diluent	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
C3a55-75	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
C3a Rceptor Agonist	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
C3aSA	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreiol (DDT)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Europium Solution	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Heparin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
humanes Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ionomycin	Sigman-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Lonza, Verviers, Belgien
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Pyruvate Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NEAA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching Deutschland
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TMB MicroWell Peroxidase Substrate	KPL, Geithersburg, MD, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Lonza, Verviers, Belgien
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 4: verwendete Chemikalien und Reagenzien

### 2.1.5 Antikörper und Zytokine

C3a-Rezeptor Antikörper	BioLegend, San Diego, CA, USA
C3a Receptor Agonist	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
CD107a-FITC, direkt markierter Antikörper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD107a-PE, direkt markierter Antikörper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD3-APC, direkt markierter Antikörper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD3-FITC, direkt markierter Antikörper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD3-PeCy5, direkt markierter Antikörper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD56-APC, direkt markierter Antikörper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD56-FITC, direkt markierter Antikörper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

CD56-PeCy5, direkt markierter Anti-körper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CpG ODN2006	InvivoGen, Toulouse, France
CpG ODN2395	InvivoGen, Toulouse, France
Donkey-anti-human IgG1 HRP	Jackson ImmunoResearch, West, Grove, USA
ELISA INF- $\gamma$ -Antikörper (M700A, M701B)	Theramo Scientific, Rockford, IL, USA
Goat-anti-Mouse-PE	Jackson Immunresearch, West Grove, USA
humanes IgG (hIgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IL10	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL12	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL15	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL18	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL2	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL6	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL8	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Loxoribine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mouse IgG-APC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IgG-FITC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IgG-PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IgG-PeCy5	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IgG-PeCy7	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IgG1	BD PharMingen, San Diego, CA, USA
Mouse IgG2b-Isotyp	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Mouse IgM	BD PharMingen, San Diego, CA, USA

Mouse-anti-Human-PE	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Poly I:C	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TNF	Immunotools, Friesoythe, Deutschland

Tabelle 5: verwendete Antikörper und Zytokine

### 2.1.6 Medien

NK92	RPMI-Medium + 10% FCS + 1% Pen-Strep + 2 mM L-Glutamin + IL2 (100U/ml)
HCT116	DMEM-Medium + 10% FCS + 1% Pen-Strep + 2mM L-Glutamin
PBMC (peripheral blood mononuclear cell)	RPMI-Medium + 10% FCS + 1% Pen-Strep
polyklonale NK-Zellen	RPMI-Medium + 10% FCS + 1% Pen-Strep + 1% (v/v) L-Glutamin
Einfriermedium zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff	70% RPMI-Medium + 20% FCS + 10% DMSO

Tabelle 6: für die Zellkultur verwendete Medien

### 2.1.7 C3a-Rezeptoragonisten

In denen für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurden insgesamt drei, auf den C3a-Rezeptor agnostisch wirkende, Agenzien verwendet. Basierend auf den Arbeiten von Lu, sowie Kasheem et al. wurde ein Peptid synthetisiert,

das aus den letzten 21 C-terminalen Aminosäuren von C3a besteht (C3a57-77) [89, 101].

Des Weiteren wurde der 1991 von Ember et al. erstbeschrieben „Superagonist“ für die Experimente synthetisierte, der die 12-15fache agonistische Aktivität von C3a am C3a-Rezeptor besitzt (C3aSA) [70, 97].

Beide Peptide wurden von EMC microcollections GmbH, Tübingen, synthetisiert. (C3aSA).

Basierend auf dieser Literatur und der von Hugli 1975 analysierten Primärstruktur, haben die Peptide folgende Aminosäuresequenz [74, 102].

C3a57-77	CNYITELRRQHARASHLGLAR
	Cys-Asn-Tyr-Ile-Thr-Glu-Leu-Arg-Arg-Glu-His-Ala-Arg-Ala-Ser-His-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg
C3aSA	WWGKKYRASKLGLAR
	Trp-Trp-Gly-Lys-Lys-Tyr-Arg-Ala-Ser-Lys-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg

**Tabelle 7: Primärstruktur der Peptide C3a57-77 und C3aSA**

Die Synthese der Peptide erfolgte, wie bereits erwähnt, durch EMC microcollections GmbH, Tübingen, wo ebenfalls die Validierung der Syntheseprodukte durchgeführt wurde. Die HPLC-Analyse ergab in beiden Fällen eine Reinheit von über 90%. Die beiden lyophilisierten Peptide wurden in Aqua ad injectabilia resuspendiert, mit 10µg/ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Der ebenfalls verwendete C3a Rezeptor Agonist wurde kommerziell von Santa Cruz Biotechnology bezogen und nach Angaben des Herstellers in DMSO gelöst und als 50mM Stocklösung bei 4°C gelagert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Ethikkommission**

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen überprüft und genehmigt (13/2007V).

### **2.2.2 Zellkultur**

#### ***2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien***

Zum Einfrieren von Zellen aus den Zellkulturen wurden zunächst die Zellen einen Tag nach dem letzten Splitten für 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$ /ml eingestellt. Mit dieser Zelldichte wurden die Zellen in Einfriermedium, bestehend aus 70% RPMI 1640, 20% FCS und 10% DMSO, resuspendiert und mit je 1ml in sterile Cryoröchen verbracht. Zunächst wurden die Zellen für zwei Tage bei -80°C eingeföhren, um im Anschluss zur weiteren Aufbewahrung in Flüssigstickstofftanks bei -180°C gelagert zu werden.

Zum Auftauen neuer Zellen wurde die benötigte Anzahl von Cryoröhrchen im Wasserbad auf 37°C erwärmt und sofort in 10ml Medium aufgenommen. Nach einmaligen zentrifugierten für 5 min bei 1500rpm wurden die Zellen zum Waschen in 10ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach erfolgte die Einstellung auf die jeweils empfohlene Zellzahl pro Milliliter und die Überführung in Zellkulturflaschen.

#### ***2.2.2.2 Kultivierung verwendeter Zelllinien***

Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank kultiviert. Die Zellenzahlen der Kulturen wurden anhand der Empfehlungen der DSMZ alle zwei bis drei Tage neu eingestellt. Zum Ausschluss toter Zellen wurde zunächst mit Trypanblau gefärbt an anschließend die Zellzahl mittel einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die entsprechende

Zellzahl wurde nach 5min Zentrifugation bei 1500rpm in frischem Medium in neue Zellkulturflaschen augenommen. Bei adhärennten Zellen erfolgte zunächst eine Ablösung mit 3ml Trypsin und eine Splittung der Zellen im Verhältnis 1:5. Die Einstellung auf eine feste Zellzahl erfolgte bei adhärennten Zelllinien alle sieben Tage.

<u>Zelllinie</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Zellzahl</u>
<b>NK92</b>	humane NK-Zellen	0,5x10 <sup>6</sup> /ml
<b>HCT116</b>	humanes kolorektales Karzinom	1x10 <sup>6</sup> /ml

Tabelle 8: verwendete Zelllinien mit entsprechendem Medium und Zellzahl

### 2.2.3 Isolierung von PBMC

Die PBMC (peripheral blood mononuclear cells), die bei den nachfolgend dargestellten Experimenten zum Einsatz kamen, wurden aus Blut freiwilliger, gesunder Spender isoliert. Hierzu wurde entweder heparinisieretes Vollblut, Leukaphereseprodukte oder Buffy Coats verwendet. Die Leukaphereseprodukte und Buffy Coats wurden freundlicherweise von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurden sowohl das Vollblut als auch die Blutspendeprodukte im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt und in 50 ml Falcons über 15 ml bereits vorgelegte Ficoll-Lösung geschichtet, so dass zwei Phasen entstanden. In der nun folgenden 18-minütigen Zentrifugation mit 2000 rpm mit ausgeschalteter Bremsfunktion trennten sich die Zellbestandteile in Erythrozyten und Leukozyten, sowie in Plasma auf. Die Leukozytenschicht wurde entnommen und drei mal mit PBS gewaschen (Megafuge, 5 min, 1500 rpm). Um die durch die Ficoll-Lösung nicht abtrennbaren Thrombozyten zu entfernen, wurden die Zellen in einem letzten Waschschrift in PBS aufgenommen und bei 800 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit den sich darin befindenden Thrombozyten wurde verworfen, die PBMC gezählt und in PBMC-Medium aufgenommen.

Die PBMC wurden nun entweder direkt für Experimente verwendet, in Einfriermedium übernommen und eingefroren oder mit einer Zellzahl von 2\*10<sup>6</sup>/ml in

Kultur genommen. Dazu wurden die Zellen bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> für maximal 10 Tage aufbewahrt.

#### **2.2.4 Polyklonale NK-Zellen**

Zur Herstellung von polyklonalen NK-Zellen wurden zunächst 30 ml frisch isolierter PBMC in einer liegenden Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit für eine Stunde inkubiert, damit sich die adhärennten Monozyten absetzen. Somit konnte eine nahezu monozytenfreie Zellsuspension, also PBLs (peripheral blood lymphocytes), abgenommen werden. Diese Zellen wurden für 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und in NK-Zellmedium mit einer Zellzahl von  $8 \cdot 10^5$ /ml aufgenommen. Die so hergestellte Zellsuspension wurde mit 50U/ml IL-2 versetzt.

Um eine polyklonale Vermehrung der NK-Zellen zu erreichen, sind Feederzellen notwendig. Hierzu wurden sowohl RPMI8866-Zellen (Anzucht von pNK-C<sub>RPMI8866</sub>) als auch K562-mb15-41BBL [103, 104] (Anzucht von pNK-C<sub>K562</sub>) verwendet. Beide Zelllinien wurden nach 6 Wochen in Kultur als neue Charge aufgetaut. Zur Vorbereitung auf den Klonierungsprozess wurden die Zellen zunächst in ein 50 ml Falcon™ überführt und mit 30 Gy bestrahlt. Dadurch wurde ein Wachstum der Feederzellen in Kultur verhindert. Nach dem Bestrahlungsprozess wurden die Zellen auf eine Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$ /ml in NK-Zellmedium eingestellt. Die Zellen wurden nun mit jeweils 500 µl in die inneren 8 wells einer 24well-Platte pipettiert. Als Verdunstungsbarriere wurden die randständigen Wells mit 600µl/well PBS gefüllt. Zu den Feederzellen wurden anschließend jeweils 500µl/well der PBLs hinzugegeben.

Alle zwei bis drei Tage wurden 200 µl des Mediums entnommen und durch frisches NK-Zellmedium (+ 25 U/ml IL-2) ersetzt. Nach 10 Tagen wurden die pNKC mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit untersucht und nur bei mindestens 80% CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen für Experimente verwendet.

### 2.2.5 FACS-Analyse

Die Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen wurde anhand der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) durchgeführt.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Zellen zunächst in FACS-Puffer (PBS; 1% FCS; 0,01% NaN<sub>3</sub>) mit humanem IgG (10µg/ml) aufgenommen und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin resuspendiert und mit einer Konzentration von mindestens 5\*10<sup>5</sup>/well in eine 96well-Platte vorgelegt. Die Platte wurde bei 2000 rpm für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Im ersten Färbeschritt wurden die entsprechenden unmarkierten Antikörper gegen die zu untersuchenden Oberflächenstrukturen in einer Konzentration von 10 µg/ml in FACS-Puffer aufgenommen und Zellen in 50 µl Antikörperlösung pro well resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte, indem die Zellen mit 150 µl/well FACS-Puffer ohne hlgG resuspendiert, bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde. Für jeden verwendeten Antikörper wurde ein entsprechender muriner Antikörper gleichen Isotyps als Negativkontrolle verwendet.

Der sekundäre Antikörper, meist ein PE-markierter goat-anti-mouse-Antikörper, wurde im Verhältnis 1:100 (10µg/ml) in FACS-Puffer verdünnt und mit 50 µl/well auf die Zellen gegeben und im Anschluss für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Als finaler Schritt wurde mit direkt markierten Antikörpern (PE, FITC, APC, Pe-Cy5, PeCy7) gegen die Selektionsmarker – im Falle von NK-Zellen, CD3<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> – gefärbt. Diese Antikörper wurden im Verhältnis 1:25 aus der vom Hersteller bereitgestellten Stocklösung in FACS-Puffer verdünnt und mit jeweils 50 µl/well für 20 min bei 4°C dunkel inkubiert. Jeder Antikörper wurde mit einem isotypentsprechenden murinen Antikörper negativ kontrolliert.

Die Messung der Zellen erfolgte am Cytomix FC 500 Durchflusszytometer und wurde im integrierten Analyseprogramm ausgewertet. Für jeden Versuchsan-satz wurden die Farben neu manuell kompensiert um somit verfälschte Ergebnisse durch Streustrahlen zu verhindern. Die verwendeten Gates wurden

grundsätzlich an der Negativkontrolle ausgerichtet. Da NK-Zellen die CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>-Zellen der Lymphozytenfraktion in der Forward-Sideward-Scatter Analyse darstellen, wurde spezifisch nur auf diese Zellen gated, um die Expressionsanalyse auf die NK-Zellen zu beschränken [105]. Der specific fluorescence index (SFI) wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$SFI = \frac{\text{Median}(\text{Fluoreszenz}_{C3a+g\alpha m-PE})}{\text{Median}(\text{Fluoreszenz}_{mIgG2b+g\alpha m-PE})}$$

### 2.2.6 Stimmulationsassays

Die Stimulierbarkeit des C3a-Rezeptors auf NK-Zellen wurde anhand verschiedener Stimuli überprüft. Zum einen wurde eine Stimulation von PBMC mit Interleukinen und TNF durchgeführt, zum anderen wurde mit verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert. In beiden Fällen wurde die Expression nach bestimmten Zeitpunkten mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Bei der Stimulation mit Interleukinen und TNF wurde als Analysezeitpunkt 60h nach Beginn der Inkubation mit den verschiedenen Stimulanzen gewählt. Die vorherigen Experimente zeigten hier ein unstimuliertes Expressionsmaximum. Als Stimulanzen wurde ein breites Spektrum verschiedener Interleukine gewählt, von denen eine Interaktion mit NK-Zellen bekannt ist. Alle Interleukine wurde mit einer Konzentration von 10ng/ml eingesetzt. Die einzige Ausnahme bildete IL-2, das mit 250U/ml eingesetzt wurde.

Es wurden zunächst 2 ml frisch isolierter PBMC mit einer Zellkonzentration von  $1 \cdot 10^6$ /ml in eine 24well-Platte pipettiert. Um einen Ausgangswert für die C3a-Rezeptorexpression zu erhalten, wurden die frisch isolierten PBMC direkt durchflusszytometrisch untersucht (0h-Wert). Nach Zugabe der Stimulanzen wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit für 60h inkubiert und ihre C3a-Rezeptor Expression anschließend durchflusszytometrisch ermittelt.

Um die Stimulierbarkeit des C3a-Rezeptors durch TLR-Agonisten zu untersuchen, wurden PBMC über vier verschiedene Zeitspannen mit LPS, CpG OND2395 und OND2006, Loxoribine und Poly I:C inkubiert.

Auch hier wurden die frisch isolierten PBMC zunächst mit einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$ /ml in eine 24well-Platte vorgelegt und mit den verschiedenen TLR-Agonisten versetzt. In der folgenden Tabelle sind die jeweils verwendeten Konzentrationen der Stimulanzen aufgelistet.

TLR-Agonist	Konzentration	stimulierter Rezeptor
LPS	0,1 µg/ml	TLR4
CpG OND2359	2 µg/ml	TLR9
CpG OND2006	2 µg/ml	TLR9
Loxoribine	300 µg/ml	TLR7
Poly I:C	10 µg/ml	TLR3

Tabelle 9: verwendete TLR-Agonisten mit entsprechenden Konzentrationen

Für jedes Stimulanz wurde auch hier je ein Well mit jeweils 2ml PBMC-Suspension verwendet und ein Ansatz für 24h, 48h, 72h und 96h vorbereitet. Zusätzlich wurde für jeden Zeitansatz noch ein Well mit einer unstimulierten Negativkontrolle angesetzt.

Die Zellen wurden dann bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die FACS-Messungen wurden jeweils nach dem vorgesehenen Zeitschema durchgeführt und die Expression der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen analysiert. Während der Inkubationsphase wurde bei den Zellen weder ein Mediumwechsel vorgenommen, noch wurden erneut TLR-Agonisten zugesetzt.

### 2.2.7 <sup>51</sup>Chrom-Release-Assay

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegen Tumorzellen wurde anhand eines <sup>51</sup>Chrom-Release-Assays analysiert. Das Grundprinzip beruht auf einem intrazellulären Labelling der Targetzellen mit radioaktivem <sup>51</sup>Cr, das bei der NK-Zell-induzierten Zytolyse der Targetzellen in den Überstand frei wird. Das Maß

für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen ist daher die Radioaktivität des Überstandes. Für alle Versuche wurden als Targetzellen HCT116 verwendet., Als Effektorzellen wurden hauptsächlich PBMC benutzt. Diese wurden im Verhältnis 80:1 zu den Targetzellen benutzt und 2:1 abwärts verdünnt, um pro Versuch auch ein Verhältnis 40:1 und 20:1 E:T zu erreichen.

Die Effektorzellen wurden je nach Ansatz bereits 18h oder 3h vor Verwendung für den Zytotoxizitätsassay mit C3a Rezeptor Agonist oder C3aSA bzw. C3a57-77 inkubiert. Hierzu wurden die Effektorzellen in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^6$ /ml in 24well Platten mit den jeweils entsprechenden Konzentrationen von C3a Rezeptor Agonist bzw. C3aSA und C3a57-77 inkubiert.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen im Verhältnis 80:1 zu den Targetzellen eingestellt ( $8 \cdot 10^5$ /well). Grundsätzlich wurden für jede Behandlung ein Triplet pipettiert, aus deren Durchschnitt die Killrate berechnet wurde.

Zunächst wurde die, je nach Ansatz unterschiedlich, benötigte Menge an Targetzellen ( $1 \cdot 10^4$ /well) in ein 15ml-Falconröhrchen aufgenommen, 5min bei 1500 rpm zentrifugiert und in 100µl resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit 2,75MBq  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  beladen und für 60min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit Standard-RPMI-Medium gewaschen in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^4$ /100µl resuspendiert und auf die vorbereiteten 96well Plates mit den Effektorzellen pipettiert.

Zur Bestimmung des Spontanreleases wurden 12 wells mit gelabelten Targetzellen 100µl RPMI-Medium zugegeben. Der Maximalrelease wurde durch eine Lyse von 12 Wells gelabelten Targetzellen mit 2% Triton-X-Lösung erreicht [107].

Die den Versuchsansatz beinhaltenden 96well Platten wurden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5%  $\text{CO}_2$  für 4h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden aus jedem well 50µl Überstand auf eine 96well Lumaplatte übertragen und 12h getrocknet. Zur Bestimmung der radioaktiven Zerfälle und damit der Lyserate wurde die Lumaplate im MicroBeta Counter 1450 Plus gemessen. Die prozentuale Lyserate der Targetzellen wurde anhand folgender Formel unter Berücksichtigung des Maximal- und Spontanreleases berechnet:

$$Lyse(\%) = \frac{\overline{ER} - \overline{SR}}{\overline{MR} - \overline{SR}} \cdot 100$$

Die Lyse der Targetzellen in Prozent ergibt sich folglich aus dem Quotienten der Differenz von arithmetischem Mittel der Zerfälle des jeweiligen Triplets und dem arithmetischen Mittel der Spontanrelease-wells und der Differenz von Mittelwert des Maximalreleases und dem des Spontanreleases, multipliziert mit 100. Die Auswertungen wurden anhand von Microsoft Excel für Mac 2011, Version 14.3.8, Microsoft Corporation, Redmond Washington, USA, erstellt.

Für die Auswertung der Daten wurden die E:T-Ration mit 40:1 gewählt, um gegebenenfalls auftretende Fehler durch Erreichen der maximal oder minimal messbaren Killrate zu verhindern. Die Daten wurden normalisiert, wobei die Lyserate durch die unbehandelten PBMC als 100% angenommen wurde.

### **2.2.8 Internalisierungsassays**

Der Einfluss verschiedener synthetischer C3a-Agonisten auf die Expression des C3a-Rezeptors wurde durch die Inkubation von PBMC mit C3a-Agonisten für verschiedene Zeiträume getestet. Dafür wurden zunächst frisch isolierte PBMC für 60h in einer Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten. Nach Ablauf der 60h wurden die Zellen entnommen, in frischem Medium auf 1\*10<sup>6</sup>/ml eingestellt und mit 0,01mM, 0,1M und 1M C3a-Rezeptoragonist behandelt. Nach 30min, 3h und 24h wurde jeweils mittels FACS-Analyse die Expression des C3a Rezeptor untersucht. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle.

### **2.2.9 Statistik**

Für die Berechnung der Mean- und Median-Werte wurden entweder Microsoft Excel für Mac 2011, Version 14.3.8, Microsoft Corporation, Redmond Washing-

ton, USA oder GraphPad Prism Version 5.00c für Mac OS X, GraphPad Software, San Diego California, USA, benutzt.

Zur Berechnung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test durch GraphPad Prism Version 5.00c für Mac OS X, GraphPad Software, San Diego California, USA, angewandt.

Die Normalisierung von Killraten wurde anhand folgender Formel mit Microsoft Excel für Mac 2011, Version 14.3.8, Microsoft Corporation, Redmond Washington, USA berechnet:

$$Lyse_{normalisiert}(\%) = \frac{Lyse(\%)}{Lyse_{unstimuliert}(\%)}$$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression des C3a-Rezeptors auf NK-Zellen

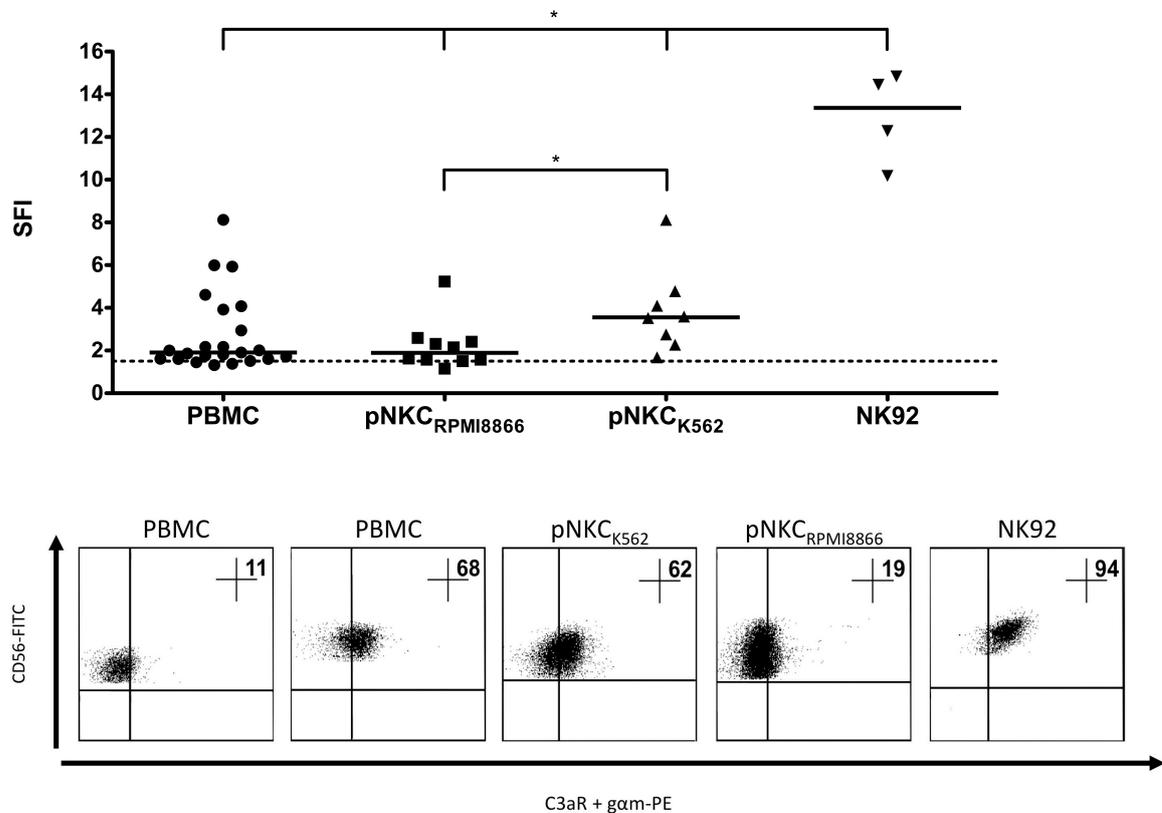
Um die konstitutive Expressions des C3a-Rezeptors auf NK-Zellen zu bestimmen, wurde zunächst mittels durchflusszytometrischer Analyse die Expression auf NK-Zellen verschiedenen Ursprungs untersucht.

Die Bestimmung der Expression des C3a-Rezeptors auf NK-Zellen erfolgte anhand der bereits im Abschnitt Methoden beschriebenen FACS-Analyse. Hierzu wurde ein C3a-Rezeptorantikörper der BioLegend (Isotyp IgG2b) verwendet, der durch einen sekundären PE-markierten goat-anti-mouse-Antikörper abgegriffen wurde. Untersucht wurden die NK-Zellfraktionen frisch isolierter PBMC, die direkt nach der Isolation gefärbt und analysiert wurden, sowie polyklonaler NK-Zellen, die entweder mit 4-1BB transfizierten K562-Feederzellen oder RPMI8866-Feederzellen über 10 Tage expandiert wurden. Ferner wurden auch standardmäßig in Kultur gehaltene NK92-Zellen FACS analysiert. Dies erfolgte einen Tag nachdem die Zellen gesplittet worden waren. Die FACS-Analyse erfolgte wie bereits beschrieben, wobei ab einem SFI von 1,5 von einer positiven Expression ausgegangen wurde [106].

Für die zeitbasierte Analyse der Rezeptorexpression wurden PBMC in einer (75cm<sup>2</sup>) Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit mit 2\*10<sup>6</sup>/ml in Kultur gehalten und nach 24h, 48h, 60h, 72h und 96h durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde kein Wechsel des Mediums vorgenommen, um das entsprechend entstehende Mikromilieu nicht zu verändern. Die Zellen, die in einem Versuchsansatz verwendet wurden, stammten zu allen Messzeitpunkten aus der gleichen Charge und Zellkulturflasche.

Zum einen wurde die NK-Zellfraktion (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) innerhalb von PMBC (NK<sub>PBMC</sub>) analysiert. Als NK-Zellen wurden per Definition CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Zellen des Lymphozytengates angenommen [106]. Zum anderen wurde die Expression des C3a-Rezeptors auf polyklonalen NK-Zellen (pNKC) untersucht. Hierzu wurden pNKC analysiert, die entweder mit RPMI8866 (pNKC<sub>RPMI8866</sub>), oder mit 4-1BBL transfizierten K562-Feedern (pNKC<sub>K562</sub>) hergestellt wurden. Des Weiteren

wurde auch die Expression auf der käuflich erwerblichen NK-Zelllinie NK92 analysiert [108, 109].



**Abbildung 3: C3a-Rezeptorexpression auf NK-Zellen**

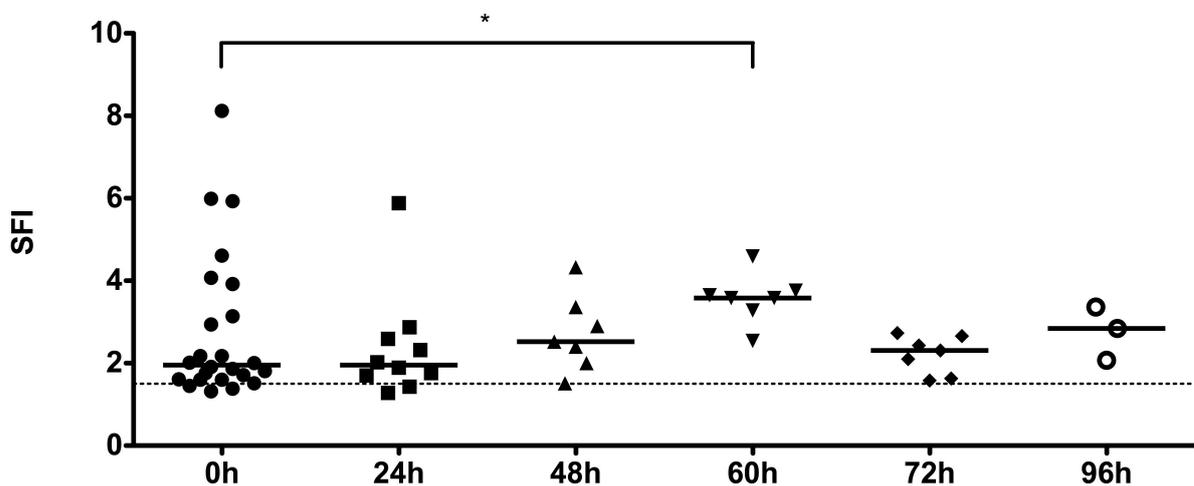
Expression dargestellt als SFI der  $CD56^+CD3^-$  Fraktion von PBMC ( $NK_{PBMC}$ ) (n=24),  $pNKC_{RPMI2233}$  (n=10),  $pNKC_{K562}$  (n=8) und NK92 (n=4). Signifikanzberechnung anhand des Mann-Whitney-U Tests, \* markiert statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede.

Legt man zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindung einen  $SFI \geq 1,5$  als untere Grenze für eine positive Expression zu Grunde [106], exprimieren alle untersuchten NK-Zellarten den C3a-Rezeptor. Die Expressionsmessungen von  $NK_{PBMC}$  ergeben einen Median-SFI von 1,9. Jedoch zeigen sich deutliche individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. So erstreckt sich die Expression des C3a Rezeptors auf  $NK_{PBMC}$  von einem Minimum-SFI von 1,3 bis zu einem Maximum-SFI von 8,12.  $pNKC_{K562}$  zeigen eine deutlich höhere Expression mit einem Median-SFI von 3,6, was auch im Vergleich zu  $pNKC_{RPMI8866}$ , mit einer Expression von 1,9 eine signifikante Mehrexpression ( $p=0,0234$ ) darstellt. Im Vergleich zu  $NK_{PBMC}$  war diese Mehrexpression nicht signifikant. Eine ähnlich breite Streuung der Expression wie bei  $NK_{PBMC}$  ist bei den beiden

pNKC-Arten nicht zu beobachten. NK92 zeigen einen Median-SFI von 13,4. Dies ist im Vergleich zu NK<sub>PBMC</sub> eine 7fach stärkere Expression und mit einem  $p=0,0019$  hoch signifikant. Auch in Bezug auf pNKC<sub>K562</sub> und pNKC<sub>RPMI8866</sub> ist die Mehrexpression signifikant (pNKC<sub>K562</sub>  $p=0,0040$ ; pNKC<sub>RPMI8866</sub>  $p=0,0058$ ) und stellt den 3,8fachen Wert der C3a-Rezeptorexpression auf pNKC<sub>K562</sub> und den 7,1fachen Wert der pNKC<sub>RPMI8866</sub> dar.

### 3.1.1 Expression des C3a-Rezeptors auf NK<sub>PBMC</sub> in Kultur

Zur Analyse des Expressionsverhaltens des C3a-Rezeptors auf NK<sub>PBMC</sub>, die in Kultur gehalten werden, wurden die frisch isolierten PBMC mit einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^6$ /ml in einer Zellkulturflasche über fünf Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten. Um das von den Zellen selbst generierte Mikromilieu aufrecht zu erhalten, wurde über diese Zeit kein Austausch des Mediums durchgeführt. Eine Expressionsbestimmung erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach 24h, 48h, 60h, 72h und 96h.



**Abbildung 4: Änderung der C3a-Rezeptorexpression in Kultur**

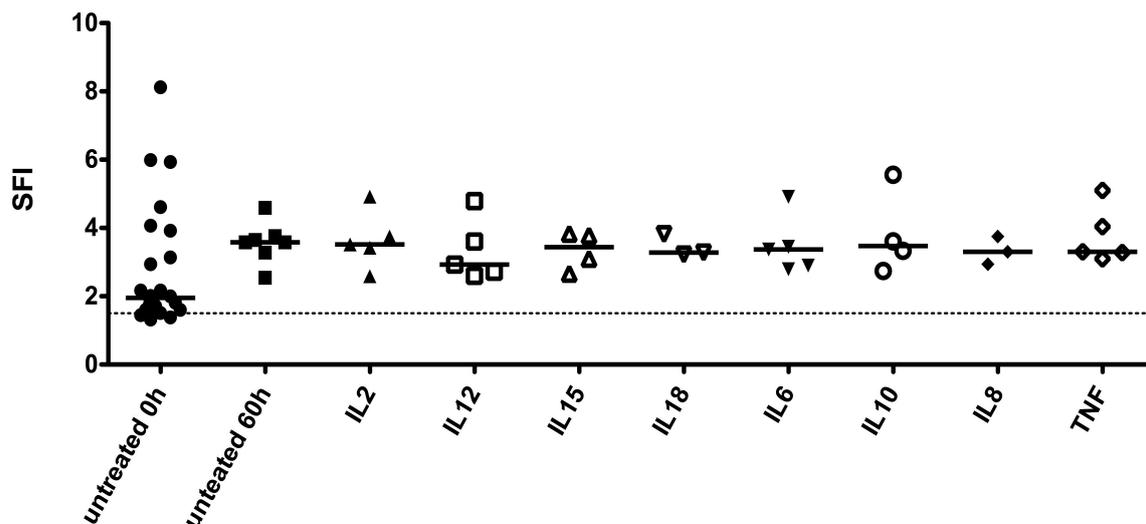
Expression dargestellt als SFI der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Fraktion von PBMC (NK<sub>PBMC</sub>). Messung direkt nach der Ficoll-Isolation der PBMC (0h), sowie nach 24h, 48h, 60h, 72h und 96h. Jeder Punkt entspricht dem Ergebnis mit NK Zellen eines einzelnen Spenders. Signifikanzberechnung durch Mann-Whitney-U, \* markiert statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich nach 24h mit einem medianen SFI von 2,0 die Expression im Vergleich zur direkten Analyse nach der Isolation (0h, SFI 2,0) nicht verändert, sondern konstant geblieben ist. Jedoch zeigt sich nach 48h bereits eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression mit einem SFI von 2,5, die nach 60h ihren Maximalwert (SFI 3,6) erreicht. Dies ist auch im Vergleich zum 0h-Wert eine signifikante Zunahme ( $p=0,0316$ ), was einer Steigerung der Expression um den Faktor 1,83 entspricht. Alle anderen Werte zeigten keine signifikante Expressionszunahme. Nach 72h ist jedoch wieder ein Rückgang der Expression auf einen SFI von 2,3 zu verzeichnen. Der 96h-Wert ist wieder leicht zunehmend und entspricht mit 2,8 ungefähr wieder dem 48h-Wert (SFI 2,5).

## **3.2 Stimulation des C3a-Rezeptors**

### **3.2.1 Stimulation mit Zytokinen**

Da  $NK_{PBMC}$  nach 60h ein Expressionsmaximum des C3a-Rezeptors erreichen, wurde versucht, das hierfür verantwortliche Stimulanz zu determinieren. Hierzu wurden PBMC in 24-Well-Platten mit einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^6$ /well über 60h mit verschiedenen Zytokinen inkubiert und dann die C3a-Rezeptorexpression bestimmt. Zur Verwendung kamen die generell als NK-Zell stimulierend geltenden Interleukine IL-2, -12, -15 [110], und -18, die NK-Zell hemmenden Interleukine IL-6 und -8[111], sowie der NK-Zellmigrationsfaktor IL-8 (CXCL8) [112] und der proinflammatorisch wirkende TNF [1].



**Abbildung 5: C3a-Rezeptorexpression nach 60h Interleukininkubation**

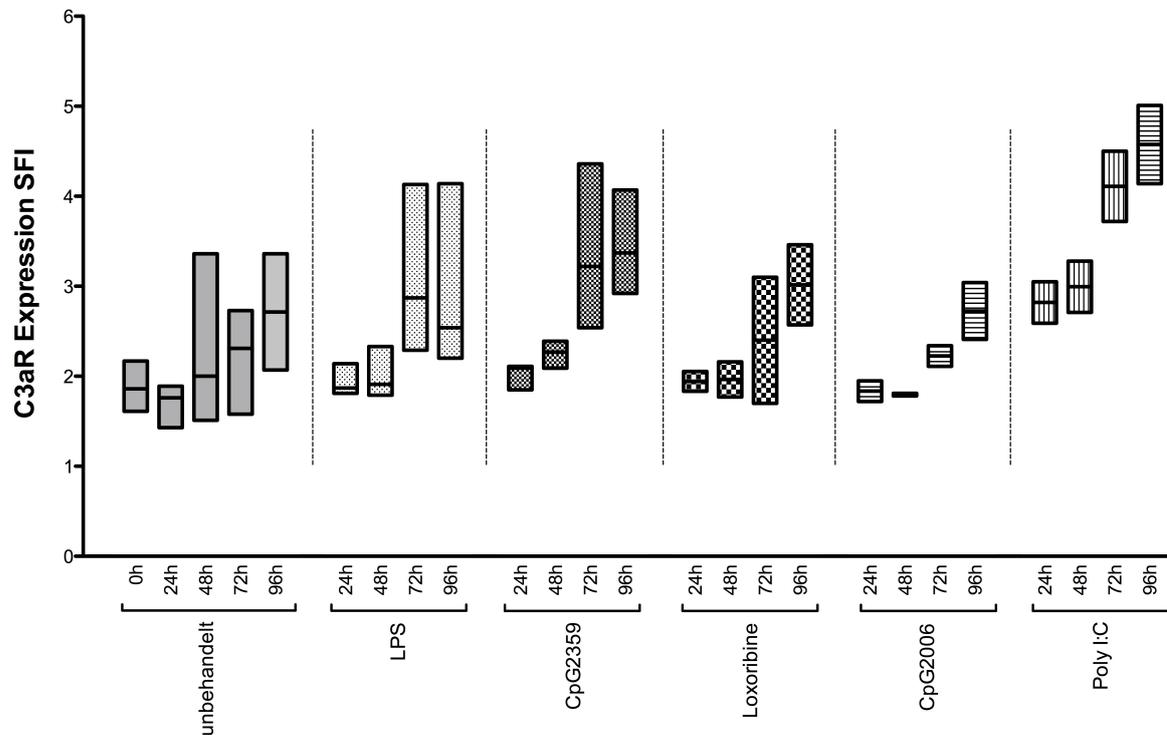
C3a-Rezeptorexpression dargestellt als SFI der  $CD54^+CD3^-$  Fraktion von PBMC ( $NK_{PBMC}$ ). Messung erfolgte direkt nach der Ficoll-Isolation (0h) und nach 60h Inkubation mit den dargestellten Interleukinen, sowie mit Medium (untreated). Signifikanzberechnung zwischen untreated 60h-Werten und allen anderen Inkubationensproben mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab keinen signifikanten Expressionsunterschied ( $p > 0,05$ ).

Im Vergleich zum unbehandelten 60h-Wert der  $NK_{PBMC}$  zeigen, mit Ausnahme der mit IL-12 inkubierten Proben, alle anderen Proben keinen relevanten Unterschied im gemessenen Median-SFI. Die NK-Zellen aus den mit IL-12 inkubierten PBMCs weisen mit einem Median-SFI von 2,9 einen geringen Rückgang der C3a-Rezeptorexpression im Vergleich zu der unbehandelten 60h Probe (Median-SFI 3,6) auf. Diese Differenz ist jedoch rechnerisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Alle anderen Proben, irrelevant ob mit grundsätzlich aktivierenden oder inhibierenden Substanzen inkubiert, zeigen Median-SFI Werte im Bereich von 3,3 bis 3,5 (Median-SFI [IL-2] 3,5; Median-SFI [IL-15] 3,4; Median-SFI [IL-18] 3,3; Median-SFI [IL-6] 3,4; Median-SFI [IL-10] 3,5; Median-SFI [IL-8] 3,3, median-SFI [TNF] 3,3) und waren somit kaum verändert im Vergleich zur unbehandelten 60h Probe.

### 3.2.2 Stimulation mit TLR-Liganden

Des Weiteren wurden Stimulationsversuche mit TLR-Liganden unternommen. Dazu wurden ebenfalls PBMC in 24-Well-Platten mit einer Zellzahl von

$2 \times 10^6$ /well mit LPS (TLR4), CpG OND2395 (TLR9), Loxoribine (TLR7) CpG OND2006 (TLR9) und Poly I:C (TLR3) [1, 113-115] inkubiert und alle 24h die C3a-Rezeptorexpression auf NK Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.



**Abbildung 6: C3a-Rezeptorexpression nach TLR-Stimulation**

C3a-Rezeptorexpression dargestellt als SFI der  $CD54^+CD3^+$  Fraktion von PBMC. Dargestellt maximale und minimale Expression mit Angabe des Median-SFI. unbehandelt (n=3), LPS (n=3), CpG2359 (n=3), Loxoribine (n=2), CpG2006 (n=2), Poly I:C (n=2)

Vergleicht man nun zunächst die Ergebnisse der 24h Messung, so lässt sich feststellen, dass alle Median-SFI-Werte der behandelten Proben über dem der unbehandelten Probe liegen (SFI 1,8). Jedoch fällt die Expressionszunahme unter der Behandlung mit CpG ODN2006 (SFI 1,8), Loxoribine (SFI 1,9), LPS (SFI 1,9) sowie CpG ODN2395 (2,1) geringer aus. Lediglich bei der Stimulation mit Poly I:C zeigt sich bereits hier eine deutliche Expressionszunahme (SFI 2,8), was im Vergleich zur unbehandelten 24h-Probe eine Expressionszunahme um das ca. 1,6fache darstellt.

Die 48h Messungen ergeben eine geringe absolute Zunahme der Expression des SFI um 0,0 – 0,2 (LPS 0,0; CpG OND2395 0,2; Loxoribine 0,0; Poly I:C 0,2).

Einzig bei CpG OND2006 ist ein leichter Rückgang des SFI von 1,84 auf SFI 1,80 zu verzeichnen. Die Expressionswerte der mit LPS (SFI 1,9), Loxoribine (SFI 2,0) und CpG OND2006 (SFI 1,8) behandelten Proben liegen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (SFI 2,0) jeweils unter deren Expressionswert. Die mit CpG OND2395 und Poly I:C stimulierten Proben zeigen beide höhere Expressionslevel als die unbehandelte 48h-Probe (CpG OND2395: SFI 2,3; Poly I:C: SFI 3,0), wobei CpG OND2395 im Vergleich nur geringfügig mehr Expression zeigte. Dagegen ist die Expression bei der mit Poly I:C behandelten Probe um das 1,5fache höher als die Expression der unbehandelten 24h Probe.

Nach 72h zeigen vor allem LPS, CpG OND2395 sowie Poly I:C noch einmal eine deutliche Zunahme des Expressionslevels des C3a-Rezeptor. So nimmt der SFI-Level bei der mit LPS stimulierten Probe von 1,9 (48h) auf 2,9 (72h) um das 1,50fache zu, bei der mit CPG OND2395 stimulierten Probe zeigt sich ein Sprung von 2,3 auf 3,2 (1,42fach) und bei der mit Poly I:C stimulierten nahm die Expression um das 1,37fache von 3,00 auf 4,1 zu. Damit liegt die Expression des C3a-Rezeptors bei allen drei Proben über der Expression der unbehandelten Kontrollprobe (SFI 2,3). Hierbei verfügt Poly I:C mit einem SFI 4,1 im Vergleich zur Kontrolle über die stärkste Potenz zur Expressionssteigerung. Auch die mit Loxoribine und CpG OND2006 stimulierten Proben zeigten, im Vergleich zu den jeweiligen 48h Proben, eine Zunahme der Expression. Die Zunahme bei der CpG OND2006 Probe ist mit der 1,24fachen Expression (von SFI 1,8 auf 2,2) relativ gering, wohingegen die Expressionssteigerung bei der Loxoribine-Probe von SFI 2,0 auf 2,1 noch geringer ausfällt (1,1fache Expression). Beide Proben zeigen jedoch keine gesteigerte Expression des Rezeptors im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle: SFI 2,3; Loxoribine: SFI 2,1; CpG OND2006 2,2).

Die letzte Messung erfolgte nach 96h und hierbei zeigen, mit Ausnahme der LPS-stimulierten Probe, alle Proben die höchste Expression. Während bei der unstimulierten Kontrolle eine Expression von SFI 2,7 vorliegt, liegen die Expression der CpG OND2395 stimulierten Proben mit einem Median-SFI von 3,4 um das 1,24fache darüber und die Poly I:C (SFI 4,6) stimulierten Proben mit der 1,65fachen Expression noch einmal deutlich höher. Die mit Loxoribine stimulierten

ten Proben zeigen zwar im Vergleich zur Expression nach 72h noch einmal eine 1,41fache Mehrexpression (72h: SFI 2,1; 96h: SFI 3,0), liegen aber mit einem Median-SFI von 3,0 nur 1,11fach über dem Median-SFI der unbehandelten Kontrollen. Der Median-SFI der mit CpG OND2006 stimulierten Proben entspricht mit 2,7 fast genau dem Wert der unbehandelten Kontrollen (Median-SFI 2,7). Bei den LPS stimulierten Proben ist im Vergleich zur Expression nach 72h Inkubation (Median-SFI 2,9) ein Rückgang um das 0,86fache auf Median-SFI 2,5 zu verzeichnen. Damit liegt der Median-SFI der LPS stimulierten Proben als einziger unterhalb der unbehandelten Kontrolle.

### **3.3 Verhalten des C3a-Rezeptors nach Stimulation mit synthetischem C3aR-Agonisten**

Der C3a-Rezeptor lässt sich durch C3a selbst, durch C3a55-57, C3aSA[70], aber auch durch einen käuflich erwerbbaeren synthetischen C3aR-Agonisten von Sigma stimulieren. Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Agonist auf die Expression des C3a-Rezeptors auf NK<sub>PBMC</sub> hat, wurden PBMC  $1 \times 10^6$ /ml in 24-well-plates zusammen mit dem C3aR-Agonisten in Konzentrationen von 0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M und 1 $\mu$ M inkubiert. Eine Messung der Expression erfolgte nach 30min, 3h und 24h mit Hilfe des Durchflusszytometers.

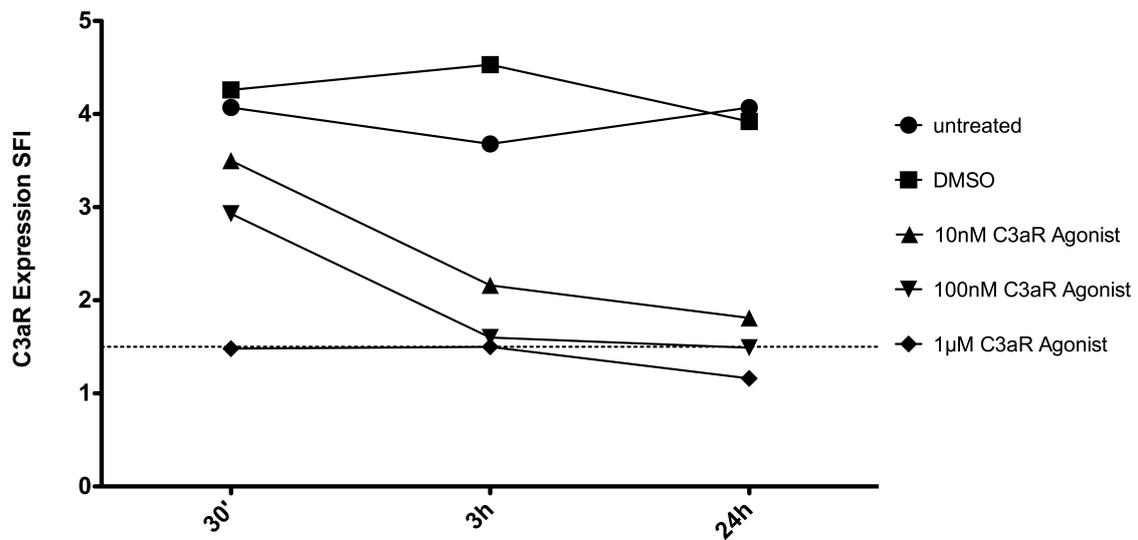


Abb. 7A

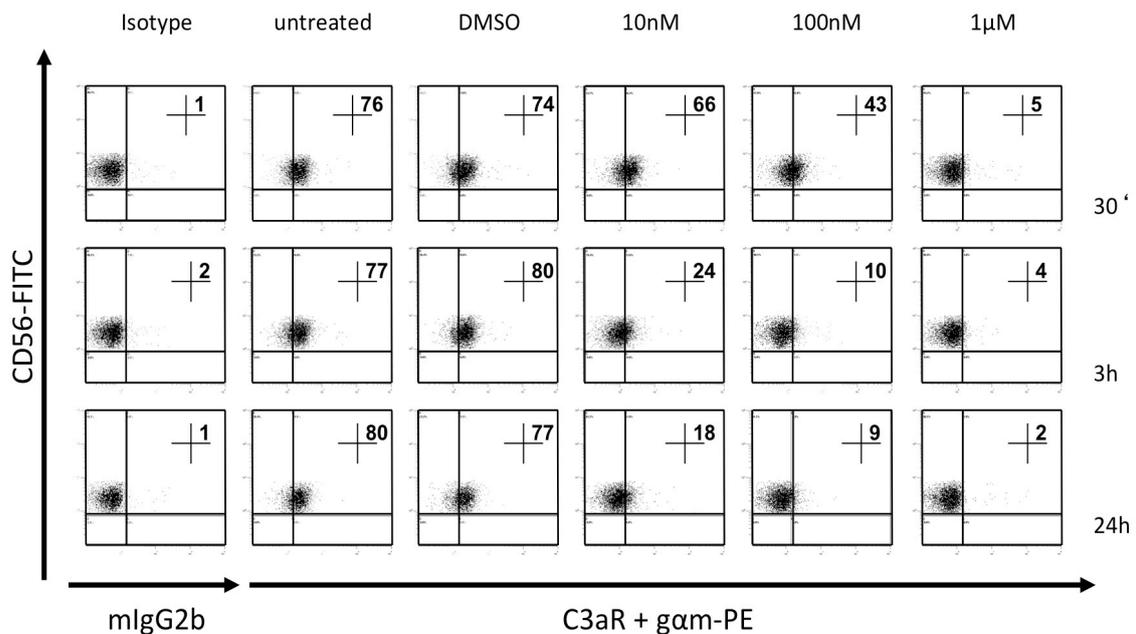


Abb. 7B

**Abbildung 7: C3a-Rezeptorexpression nach Inkubation mit synthetischem C3aR-Agonist**

**A:** Expression dargestellt als SFI der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Fraktion von PBMC (NK<sub>PBMC</sub>), Messung nach 30 Min, 3h und 24h

**B:** Dotplot-Darstellung der C3aR-Expression nach Inkubation für 30min, 3h und 24h mit synthetischem C3aR-Agonist, gated wurde auf die CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Fraktion von PBMC (NK<sub>PBMC</sub>), CD56-Expression auf der y-Achse (CD56-FITC) und C3a-Rezeptorexpression auf der x-Achse (C3aR+gam-PE). Angabe der C3a-Rezeptor positiven Zellen in Prozent. Isotypkontrolle mittels mlG2b+gam-PE.

Die Daten zeigen, dass die Expression der unbehandelten Kontrolle und der DMSO-Lösungsmittelkontrolle nur einen geringen Unterschied aufweisen (30

min: unbehandelt SFI 4,07, DMSO SFI 4,26; 3h: unbehandelt SFI 3,68, DMSO SFI 4,53; 24h: unbehandelt SFI 4,07, DMSO SFI 3,92) und somit nicht von einem Einfluss von DMSO auf die Rezeptorexpression ausgegangen werden kann. Es zeigt sich jedoch bereits mit einer Konzentration von 0,01  $\mu$ M C3aR-Agonist ein deutlicher Rückgang der Expression auf SFI 3,50. Mit einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M ist die Expression nach 30min sogar nur noch 2,93 und nach 30 minütiger Inkubation mit 1 $\mu$ M C3aR-Agonist ist mit einem SFI von 1,48 eine dnoch weiter erniedrigte Expression zu beobachten

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch nach 3h Inkubation, jedoch ist der Effekt der Expressionsreduktion noch deutlich stärker ausgeprägt. Die 0,01 $\mu$ M Probe zeigt nur noch eine Expression mit SFI 2,16, während es nach 30min noch ein SFI von 3,50 sind. Das bedeutet eine 1,7fach schwächere Expression im Vergleich zur unbehandelten Probe, die einen SFI von 3,68 zeigt. Mit einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M ist nach 3h auf den NK-Zellen mit einem SFI-Wert von 1,60 kaum noch C3a-Rezeptor nachweisbar, was einen extremen Rückgang um den Faktor 0,55 vom 30min-Wert (SFI 2,93) darstellt. Mit einem SFI von 1,50 ist bei einer Rezeptoragonisten-Konzentration von 1 $\mu$ M, ebenso wie nach 30min, keine Rezeptorexpression mehr nachweisbar.

Die letzte, nach 24h erfolgte, Messung zeigt, dass weder mit 0,1 $\mu$ M noch mit 1 $\mu$ M Rezeptoragonist noch eine C3a-Rezeptorexpression nachweisbar ist (SFI [0,1 $\mu$ M] 1,49; SFI [1 $\mu$ M] 1,16). Lediglich die mit 0,01 $\mu$ M Agonist inkubierte Probe zeigt noch eine Expression (SFI 1,81), die jedoch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mehr als die Hälfte geringer ist (0,44fach).

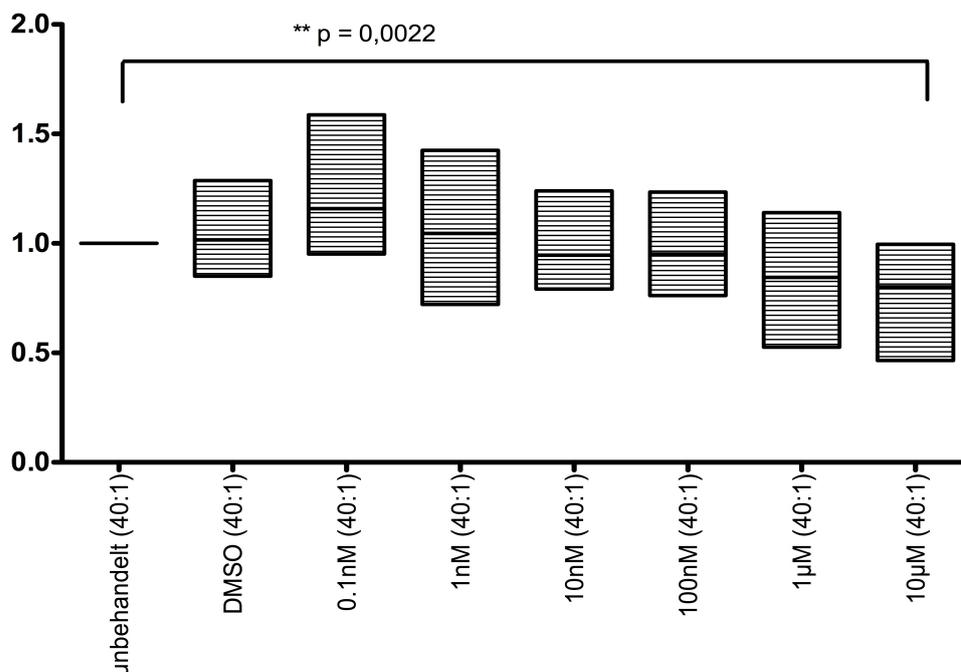
### **3.4 Beeinflussung der Antitumorreaktivität von NK<sub>PBMC</sub>**

Charriaut et al. beschrieben bereits 1982, dass C3a einen hemmenden Einfluss auf die gegen Tumorzellen gerichtete Aktivität von NK-Zellen hat. In den hier vorliegenden Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Fragmente von C3a und der synthetische C3aR-Agonist auf die Antitumorreaktivität von NK<sub>PBMC</sub> haben. Alle Experimente wurden mit der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 durchgeführt, da diese keinen C3a-Rezeptor exprimieren und somit

eine Beeinflussung der Zielzellen ausgeschlossen werden konnte. Ferner beschrieben Habermann et al. erhöhte Serumkonzentration an C3a bei Kolonkarzinomen. Die Zytotoxizität wurde anhand eines  $^{51}\text{Cr}$ -Release Assays untersucht.

### 3.4.1 Einfluss des synthetischen C3aR-Agonisten

Zur Determinierung des Einflusses von synthetischem C3aR-Agonist wurden PBMC über 16h mit sechs verschiedenen Konzentrationen, die von 0,1nM jeweils um eine Zehnerpotenz bis 10 $\mu\text{M}$  zunahmen, inkubiert. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in der gleichen Konzentration gewählt wie in der 10 $\mu\text{M}$  Probe.



**Abbildung 8:  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assey mit PBMC vs. HCT116 mit C3aR-Agonist für 16h**

PBMC vs. HCT116 in E:T 40:1, Vorbehandlung der PBMC mit C3aR-Agonist für 16h in den angegebenen Konzentrationen, Lyseraten kumuliert bei n=6 und gegen unbehandelt normalisiert (unbehandelte Lyse = 1.0), dargestellt sind Mittelwerte mit Boxdarstellung der maximaler und minimaler Lyseraten. Signifikanzberechnung erfolgte über dann Mann-Whitney-U Test zwischen unbehandelten Ansätzen und Ansätzen mit 10 $\mu\text{M}$  C3a-Rezeptoragonist \*\* ( $p=0,0022$ ), zwischen allen anderen Ansätzen keine Signifikanz ( $p>0,05$ ).

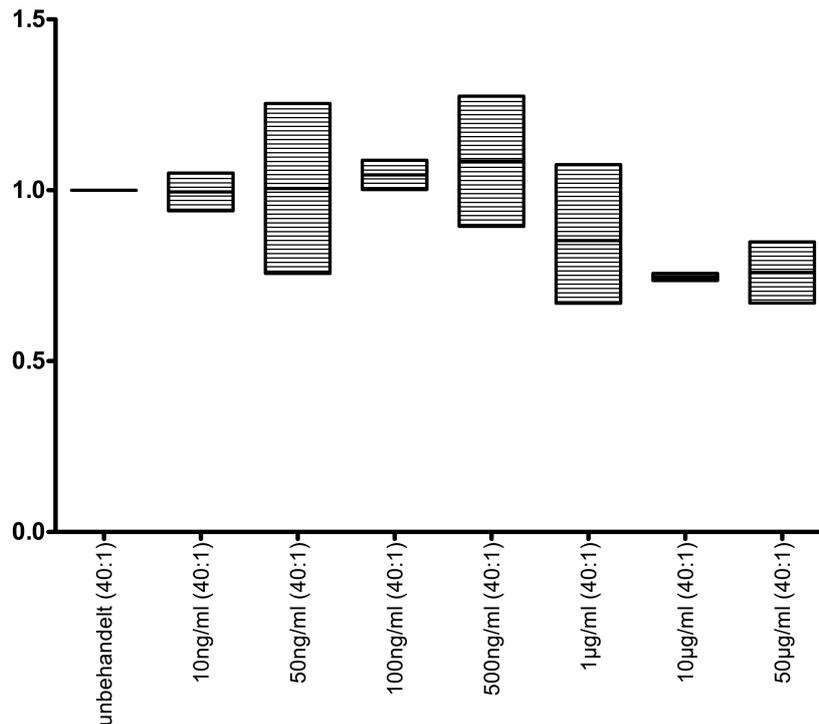
Zunächst zeigt sich, dass DMSO als Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Lyserate der NK-Zellen hat. Die Inkubation mit 0,1nM C3aR-Agonist führt zu einer

Steigerung der Lyserate um 15,9%. Dies war jedoch statistisch gesehen keine signifikante Steigerung ( $p=0,0906$ ). Der Einfluss von 1nM Agonisten ist, im Vergleich zu 0,1nM, jedoch bereits wieder geringer und liegt nur noch bei einer Steigerung der Lyserate von 4,6%. Mit 10nM und 100nM ist eine leichte Hemmung der Lyseaktivität der NK-Zellen zu verzeichnen, die bei 10nM bei 5,4% und bei 100nM bei 4,8% liegt. Bei einer Konzentration von 1 $\mu$ M lässt sich jedoch eine deutlich gesteigerte Hemmung von 15,5% feststellen. Dies ist aber ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,6184$ ). Stimuliert man die NK-Zellen nun mit 10 $\mu$ M C3aR-Agonist, lässt sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Hemmung um 19,8% verzeichnen. Diese Hemmung zeigte sich auch signifikant bei einem p-Wert von 0,0022.

### **3.4.2 Einfluss von C3a57-77**

Lu et al. beschrieben 1984, dass ein Peptid aus den letzten C-terminalen Aminosäuren des C3a-Proteins die gleiche agonistische Aktivität auf den C3 Rezeptor besitzt wie das gesamte Protein [89]. Kasheem et al. beschrieben, unter Berufung auf Lus Publikation von 1984, dass die letzten 20 C-terminalen Aminosäuren ebenfalls diesen Effekt zeigen [101]. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde daher entsprechend ein Peptid von EMC microcollections GmbH, Tübingen, generiert, das aus den letzten 21 C-terminalen Aminosäuren besteht (C3a57-77).

Für diese Experimente wurde wiederum PBMC mit verschiedenen Konzentrationen von C3a57-77 über 3h inkubiert und anschließend die Zytotoxizität in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Releaseassay analysiert. Die Inkubationszeit von 3h wurde gewählt um den Einfluss einer gegebenenfalls auftretenden proeolytischen Spaltung des Peptids zu minimieren.



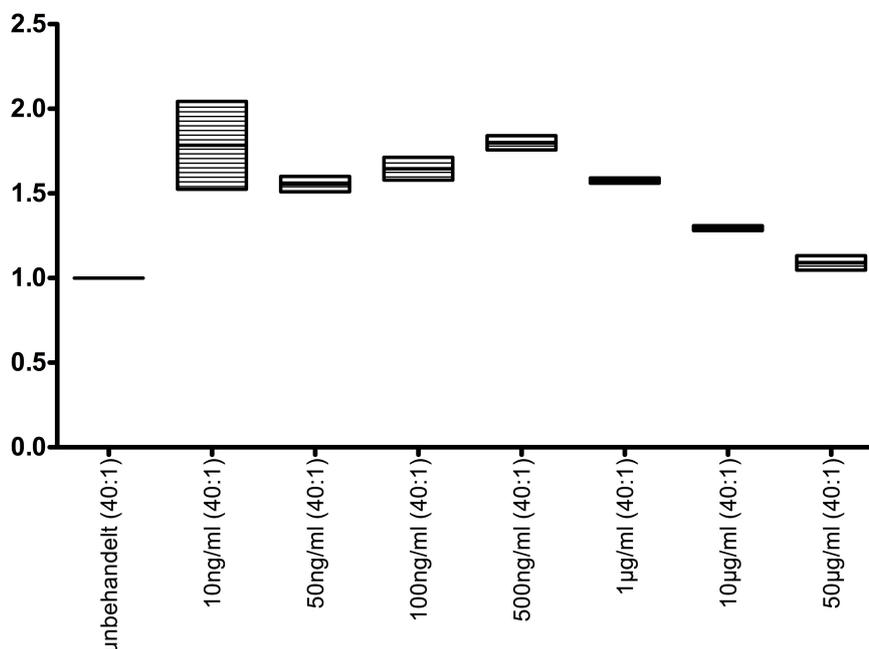
**Abbildung 9:**  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assey mit PBMC vs. HCT116 mit C3a57-77 für 3h

PBMC vs. HCT116 in E:T 40:1, Vorbehandlung der PBMC mit C3a57-77 für 3h in den angegebenen Konzentrationen, Lyseraten kumuliert bei  $n=3$  und gegen unbehandelt normalisiert (unbehandelte Lyse = 1.0), dargestellt sind Mittelwerte mit Boxdarstellung der maximaler und minimaler Lyseraten. Signifikanzberechnung erfolgte über dann Mann-Whitney-U Test, zwischen allen Ansätzen keine Signifikanz ( $p>0,05$ ).

Bei der Inkubation mit 10ng/ml bzw. 50ng/ml zeigt bei 10ng/ml eine 0,5% schwächere Lyseaktivität und 50ng/ml eine 0,5% höhere Lyseaktivität als bei unbehandelten Proben. Damit lässt sich bei 10 und 50ng/ml kaum ein Effekt auf die Lyserate feststellen. Die Lyserate der NK-Zellen ist mit einer Konzentration von 100ng/ml noch einmal geringfügig höher (4,5%) und erreicht ihr Maximum bei einer Konzentration von 500ng/ml mit einer Steigerung von 8,5%. Inkubiert man die Zellen nun mit 1µg/ml C3a57-77 zeigt sich eine deutliche Hemmung der Zytotoxizität um 13,4%. Diese Hemmung nimmt mit steigender Konzentration von C3a57-77 weiter zu und erreicht das Maximum von 25,4% bei einer Inkubation der Zellen mit 10µg/ml. Steigert man die Konzentration des C3a57-77 weiter auf 50µg/ml, lässt sich jedoch nur noch eine Hemmung von 24,1% feststellen.

### 3.4.3 Einfluss von C3aSA

Des Weiteren wurde 1991 von Ember et al. ein in der Sequenz alternierendes Peptid synthetisiert, das eine 12-15fach stärkere agonistische Aktivität am C3a Rezeptor besitzt als C3a selbst [97]. Scully et al. bestätigten diese Annahme durch weitere Experimente in ihrer Publikation von 2000 [70]. Dieser „Supera-  
gonist“ besteht aus 15 Aminosäuren, die, an verschiedenen Stellen verändert, die letzten 15 C-terminalen Aminosäuren darstellen. Die beiden ersten N-terminalen Aminosäuren wurden hierbei durch Tryptophan ersetzt, was eine bessere Bindung an die sekundäre Bindungsstelle des Rezeptor ermöglicht [70]. Zur Untersuchung des Einflusses des C3aSA wurden PBMC mit verschiedenen Konzentrationen C3aSA für 3h inkubiert und danach ihre Zytotoxizität gegen HCT116 in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Releaseassay analysiert. Auch hier wurde die Inkubationszeit von 3h gewählt um den Einfluss einer gegebenenfalls auftretenden proteolytischen Spaltung des Peptids zu minimieren.



**Abbildung 10:**  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assey mit PBMC vs. HCT116 mit C3aSA für 3h

PBMC vs. HCT116 in E:T 40:1, Vorbehandlung der PBMC mit C3aSA für 3h in den angegebenen Konzentrationen, Lyseraten kumuliert bei n=2 und gegen unbehandelt normalisiert (unbehandelte Lyse = 1.0), dargestellt sind Mittelwerte mit Boxdarstellung der maximaler und minimaler Lyseraten. Signifikanzberechnung erfolgte über dann Mann-Whitney-U Test, zwischen allen Ansätzen keine Signifikanz ( $p > 0,05$ ).

Die Auswertung der Daten zeigt zunächst eine, im Vergleich mit den anderen verwendeten Agonisten für den C3a-Rezeptor, deutliche Zunahme der Lyserate. Bereits bei Konzentration von 10 ng/ml liegt die Lyserate bei 178,4% im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswertes. Bei einer Konzentration von 50 ng/ml ist die Steigerung der Lyserate jedoch wieder geringer (155,5%), nimmt aber über 164,6% (100 ng/ml) bis zu einem Maximum von 179,9% bei 500 ng/ml, wieder zu. Ab einer C3aSA-Konzentration von 1 µg/ml nimmt die Lyserate wieder ab (157,6%), liegt bei 10 µg/ml bei einer Steigerung von 29,5% und erreicht bei einer Konzentration von 50 µg/ml die geringste Lysesteigerung von nur noch 8,9% über dem unbehandelten Ausgangswert. Im Vergleich zu den beiden anderen verwendeten C3a-Agonisten zeigt sich keine direkte Hemmung der Lyseaktivität, jedoch eine relative Hemmung in Form der Abnahme der Lysesteigerung.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der C3a-Rezeptor auf NK-Zellen innerhalb von frisch isolierten PBMCs ( $NK_{PBMC}$ ), auf  $pNKC_{RPMI6688}$  und  $pNKC_{K562}$  und auch auf NK92 exprimiert wird. Auf  $NK_{PBMC}$  unterliegt die Expression deutlichen interindividuellen Schwankungen, was sich in einer Expressionsbreite von SFI 1,32 bis SFI 8,12 zeigt. Die verwendeten PBMC stammen von unterschiedlichen Spenden. Daher könnte als Grund für die Schwankungen das jeweilige Geschlecht, unterschiedliche hereditäre Rezeptorexpression, sowie eventuell vorliegende subklinische Infektionen angenommen werden. Um eine Aussage diesbezüglich treffen zu können, müssen die Daten jedoch mit dieser entsprechenden Fragestellung analysiert werden. NK92 stellen eine hoch aktive NK-Zelllinie dar. NK92, welche gegen eine Vielzahl von Tumorzellen sowohl in vitro, also auch in klinischen Phase I Studien effektiv ist [108, 109, 116]. Unsere Experimente zeigen, dass NK92 die höchste aller gemessenen C3a-Rezeptorexpressionen mit einem SFI von 13,37 aufweisen. Dies legt nahe, dass C3a für die aktivierte NK-Zelle von großer Bedeutung ist, sei es als chemotaktisches Agens, direktes Stimulans oder kostimulatorisches Peptid. Auch zeigen  $pNKC_{K562}$  eine deutlich höhere C3a-Rezeptorexpression (Median-SFI 3,56) als  $NK_{PBMC}$  und eine signifikant höhere Expression als  $pNKC_{RPMI8866}$  ( $p=0,0234$ ). K562-mb15-41BBL steigern durch die genetische Modifikation zur Expression von 4-1BBL und membrangebundenem IL15 (mb15) durch die Benutzung als Feederzellen zur Klonierung von NK-Zellen deutlich die cytotoxischen Aktivität der entstehenden  $pNKC$  [103, 104]. Dadurch lässt sich die bereits erwähnte Vermutung, dass die Expression des C3a-Rezeptors ein gewisses Indiz für die Aktivität der NK-Zellen darstellt, weiter bekräftigen. So lässt sich die Expression des C3a-Rezeptors eventuell als ein Indikator für die Aktivierung von NK-Zellen ansehen.

Untersucht man NK-Zellen aus in Kultur gehaltenen PBMCs zeigt sich eine Zunahme der C3a-Rezeptorexpression über die Zeit mit einem Expressionsmaximum nach 60h (SFI 3,58). Da die Bindung von C3a an den C3a-Rezeptor auf Immunzellen eine Vielzahl von Funktionen hat, beginnend mit der Wirkung als

chemotaktisches Agens bis hin zur Degranulation, könnten ähnliche Funktionen ebenfalls für NK-Zellen angenommen werden. So kann zum Beispiel die Hochregulation des Rezeptors als eine Art Primingprozess interpretiert werden, so dass die ruhenden NK-Zellen schneller einem C3a-Gradienten folgen könnten. Da die Funktion des C3a-Rezeptors auf die Chemotaxis von NK-Zellen nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, bleibt dies in weiteren Studien zu untersuchen. In den ersten 24h der Kultivierung ist jedoch keine Zunahme der Expression zu verzeichnen (0h-SFI 1,96, 24h-SFI 1,96). Dies ist vermutlich auf das noch nicht ausreichend gebildete Mikromilieu und dadurch verminderte Signaltransduktion zur Expressionssteigerung zurückzuführen. Andererseits lässt sich diese Tatsache auch dadurch erklären, dass bis zur Expression eines Rezeptors auf der Zelloberfläche eine gewisse Zeit für die Proteinbiosynthese mit Gentranskription und -translation sowie posttranslationaler Modifikation und Transport an die Oberfläche nötig ist. Auch das Erreichen des Expressionsmaximum nach 60h spricht für diese Erklärung. Für die Abnahme der Expression nach 72h ist vermutlich der zunehmende Verbrauch an Medium und die begrenzte Lebensdauer der kultivierten PBMC verantwortlich, durch die der nötige Stimulus zur Expressionssteigerung wegfällt. Dem erneuten Anstieg der Expression nach 96h wird dabei weniger Bedeutung beigemessen, da hier nur drei verwertbare Messungen vorlagen.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse stellte sich nun die Frage, ob der C3a-Rezeptor über einen bestimmten Stoff regulierbar ist. Die naheliegendste Vermutung ist hierbei wohl, dass, ähnlich wie bei der Aktivierung der NK-Zellen, ein Stimulus in Form eines löslichen Stoffes, der durch andere Leukozyten sezerniert wird, vorliegt. So wurden zum einen monocyte-derived cytokines, wie IL-10, IL-12, IL-15 und IL-18 [35], auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die C3a-Rezeptorexpression zu regulieren, zum anderen NK-Zell aktivierende Faktoren, wie IL-2 und TNF, sowie IL-6, als bekanntes NK-Zell hemmendes Interleukin, und der Migrationsfaktor IL-8. Jedoch zeigte keiner der getesteten Faktoren die Fähigkeit den C3a-Rezeptor in seiner Expression zu regulieren. Lediglich die Inkubation der PBMC mit IL-12 zeigte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Mindereexpression um den Faktor 0,82. Diese verminderte Expression war

jedoch nicht signifikant. Weitere Experimente müssen zeigen, ob eine Möglichkeit einer Expressionsregulation durch Zell-Zell-Interaktion besteht.

Stimuliert man PBMC mit TLR-Agonisten und bestimmt alle 24h die C3a-Rezeptorexpression auf NK-Zellen, so zeigt sich, dass vor allem die Stimulation mit TLR9 und TLR3 Agonisten CpG OND2395 und Poly I:C eine deutliche Mehrexpression induziert. Während sich bei der Stimulation mit CpG OND2395 nach 24h und 48h nur eine geringe Expressionszunahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigt, liegen die Werte bei der Stimulation mit Poly I:C hier bereits höher als die höchste Expression der unbehandelten Proben nach 96h. Beide Stimulationen induzieren bei den NK-Zellen eine 1,24fach (CpG OND2395) bzw. 1,65fach (Poly I:C) höhere Expression des C3a-Rezeptor als bei der Kontrolle. Auch die Stimulation mit Loxoribine (TLR7) zeigte nach 96h eine höhere Expression als die Kontrolle. Jedoch sind die hier gemessenen Werte lediglich um das 1,11fach höher als die der Kontrolle. Ob dabei von einem Stimulationseffekt auszugehen ist, ist fraglich. Die Expression des C3a-Rezeptors bei der Stimulation mit LPS und CpG OND2006 unterscheidet sich nicht von der der Kontrollen, und somit ist hier kein Stimulations- oder Hemmungseffekt zu erkennen. Über den gesamten Versuch zeigte sich jedoch, dass erst nach ca. 48h ein deutlicher Sprung in der Expressionszunahme zu verzeichnen war. Dies stützt die bereits erwähnte These, dass, selbst unter Stimulation, die Biosynthese des C3a-Rezeptors ca. zwei Tage in Anspruch nimmt. Das könnte zum einen, wie bereits erwähnt, durch einen sehr langen Biosyntheseprozess erklärt werden oder dadurch, dass der C3a nur als Cofaktor für NK-Zellen dient und somit die Synthese des Rezeptors nicht primär priorisiert wird. Die Ausnahme bildet hier das Ergebnis der Stimulation mit Poly I:C, bei dem bereits nach 24h eine deutliche Expressionszunahme zu verzeichnen ist. Hierfür könnte als Grund angenommen werden, dass Poly I:C einen extrem potenten Stimulus für NK-Zellen darstellt den C3a-Rezeptor zu exprimieren und eventuell eine Art Reservoir mobilisiert und somit die schnelle Expressionszunahme veranlasst. TLR9 ist auf dendritischen Zellen exprimiert, TLR3 auf NK-Zellen [1, 117]. Dieser Fakt lässt die Annahme zu, dass Poly I:C, als TLR3-Agonist, NK-Zellen direkt stimuliert und daher eine deutliche Mehrexpression

des C3a-Rezeptors zu verzeichnen ist. TLR9, stimuliert durch CpG OND2395, entfaltet seine Wirkung und NK-Zellaktivierung über die Aktivierung von plasmazytoiden dendritischer Zellen (pDC) [118]. Über diese indirekte Stimulation ließe sich die, im Vergleich zur Stimulation mit Poly I:C, geringere Expressionssteigerung erklären. CpG OND2006 und 2395 sind beides Agonisten für TLR9, jedoch unterscheiden sie sich deutlich in ihrer Nukleotidsequenz – CpG OND2006 als Typ-B-OND und CpG OND2395 als Typ-C-OND mit palindromischer Sequenz – und zeigen daher auch unterschiedliche Spezifität bei der Aktivierung von Zellen [119]. CpG OND2006 aktiviert vor allem B-Zellen und kaum pDC, wohin gegen CpG OND2395 pDC gleichermaßen aktiviert [120]. Damit lässt sich die unterschiedliche Expressionsstimulation der TLR9-Agonisten erklären. TLR3 erkennt als PAMP-Rezeptor Doppelstrang-DNA (dsRNA), wie sie vor allem in Viren vorkommen, wohingegen TLR9 unmethylierte Einzelstrang-DNA erkennt, die in Viren und Bakterien vorliegt. Die Erkennung beider Muster ist essentiell für die Bekämpfung von Infektionen durch das angeborene Immunsystem [1]. Es scheint also, dass der C3a-Rezeptor auf NK-Zellen bei der Abwehr von vor allem viralen, aber auch bakteriellen Infektionen von Bedeutung sein könnte. Ob C3a über seinen Rezeptor nun als chemotaktisches Agens funktioniert oder entweder direkt oder indirekt, also als Cofaktor, die Lyse infizierter Zellen begünstigt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Inkubiert man PBMC mit verschiedenen Konzentrationen synthetischem C3a-Rezeptoragonist, stellt man bereits nach 30min eine deutliche Reduktion der Expression fest, die sich nach 3h und vor allem nach 24h noch deutlicher darstellt. Dies zeigt, dass der Agonist an den C3a-Rezeptor bindet und dieser daraufhin internalisiert wird. Dies ist ein typisches Verhalten G-gekoppelter Rezeptoren um, wie zum Beispiel bei adrenergen Rezeptoren, eine Überstimulation zu verhindern. Die Vermutung, dass der Agonist lediglich unspezifisch an den Rezeptor bindet und so die Bindungsstelle für den zur Expressionsanalyse verwendeten Antikörper blockiert, lässt sich durch die Dynamik der Expressionsreduktion entkräften. Würde der Agonist die Bindungsstelle des Antikörpers blockieren, würde man eine für jede Konzentration spezifische Hemmung konstant über alle drei Messpunkte sehen. Durch die kontinuierliche Reduktion zeigt sich

jedoch, dass der Agonist zuerst an eine bestimmte, konzentrationspezifische Anzahl an Rezeptoren bindet, diese dann internalisiert werden und dann an die nächsten noch freien Rezeptoren bindet.

In den Zytotoxizitätsassays zeigt sich eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Lyseaktivität der NK-Zellen durch den C3aR-Agonist und C3a57-77. Während es im Niedrigkonzentrationsbereich zu einer Steigerung der Lyse der Targetzellen von maximal 15,9% (0,1nM C3aR-Agonist) bzw. 8,5% (500ng/ml C3a57-77) kommt, nimmt dieser Effekt durch weitere Konzentrationssteigerung wieder ab und kehrt sich schließlich um, bis es zu einer Hemmung der Zytotoxizität bis maximal 25,4% (10µg/ml C3a57-77) bzw. 19,8% (10µM C3aR-Agonist) kommt. Dieser Effekt gilt grundsätzlich für beide Stimulantien, scheint aber in seiner Ausprägung abhängig von der agonistischen Potenz des jeweiligen Stoffes zu sein. So zeigt der C3aR-Agonist die maximale Hemmung bei einer Konzentration von 10µM, C3a57-77 jedoch schon bei 3,45 nM (= 10µg/ml). Interessanterweise tritt die Hemmung beim C3aR-Agonisten ab der Konzentration auf, bei der in vorherigen Experimenten kein C3a-Rezeptor mehr nachweisbar war (1µM), es also zu einer kompletten Internalisierung gekommen ist. Das kann eine Erklärung dafür zu sein, warum die Steigerung der Zytotoxizität mit zunehmender Konzentration agonistischer Substanzen wieder abnimmt. Wird also der Rezeptor internalisiert, geht auch die exzitatorische Wirkung des C3a wieder verloren. Entsprechend lässt sich auch die relativ große Verteilungsbreite des Steigerungseffekts in den Experimenten erklären, scheint doch der Effekt abhängig von der Rezeptorexpression zu sein und diese unterliegt großen interindividuellen Schwankungsbreiten (s. Abb. 5). Geht man nun davon aus, dass die Stimulation des C3a-Rezeptors eine aktivierende Wirkung auf die Zytotoxizität der NK-Zellen hat, stellt sich nun die Frage, wie es zu einer Hemmung der NK-Zellaktivität bei weiterer Dosissteigerung kommen kann. Eine Erklärung wäre wohl, dass, da für die Assay PBMC und damit nicht nur reine NK-Zellen verwendet wurden, das C3a57-77 bzw. der C3aR-Agonist die Ausschüttung inhibitorischer Faktoren durch andere Zellen induziert und daraufhin die NK-Zellreaktivität gehemmt wird. Bei niedrigeren Konzentrationen würde dann der direkte, aktivierende Effekt auf die NK-Zellreaktivität den Einfluss der Hem-

mung überdecken. Um dies zu bestätigen müssen Untersuchungen mit isolierten NK-Zellen folgen, um nur den spezifischen Effekt auf NK-Zellen alleine zu untersuchen. Carriaut et al. haben bereits 1982 einen hemmenden Effekt von C3a auf NK-Zellen beschrieben.

Habermann et al. beschreiben bei Patienten mit kolorektalem Karzinom deutlich erhöhte C3adesArg Serumlevel von 44 µg/ml (Konzentration beim Gesunden 98 ng/ml) [71, 84, 86]. Somit lässt sich im Umkehrschluss, da C3a 1:1 in C3adesArg gespalten wird, auf die gleiche Konzentration von C3a schließen. Wobei unklar ist, ob die Produktion der Komplementfaktoren durch eine Aktivierung des Systems durch den Tumor zustande kommt oder ob der Tumor direkt C3a bildet und damit eventuell aktiv einer Lyse durch NK-Zellen entgeht, in dem die Zellen durch die hohe Konzentration an C3a den C3a-Rezeptor internalisieren und so gegen C3a-Einfluss desensibilisiert werden, damit nur noch den der Einfluss hemmender Faktoren anderer Zellen zum Tragen kommt.

Die Zytotoxizitätsassays, die mit C3aSA durchgeführt wurden, zeigen jedoch einen komplett anderen Sachverhalt. So kommt es zu einer massiven Steigerung der Lyseaktivität von bis zu 79,9% (500ng/ml C3aSA) und keinem hemmenden Effekt. Den bereits beschriebenen Mechanismus der direkten NK-Zellaktivierung und dann folgenden indirekten NK-Zellhemmung zu Grunde legend, würde man also davon ausgehen, dass dieser Effekt auch mit C3aSA zu sehen ist, nur in deutlich stärkerer Ausprägung, da Ember et. al. 1999 die 15fache Potenz des „Superagonisten“ dargelegt haben. Der eigentliche Verlauf der Lyserate über die Konzentrationen scheint dies auch zu bestätigen, ist doch bei Konzentrationen ab 500ng/ml keine Steigerung der Zytotoxizität mehr nachweisbar. Hier kommt es wieder zu einem Rückgang der Lyseaktivität. Jedoch kommt es nicht, wie bei C3a57-77 und dem C3aR-Agonisten zu einer Hemmung der Lyseaktivität. Hierfür kommen zwei Erklärungen in Betracht. Zum einen könnte davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung der NK-Zellen derart potent ist, dass der Einfluss der hemmenden Faktoren, die durch andere Zellen ausgeschüttet werden, relativ gering ist und erst bei noch höheren Konzentrationen zum Tragen kommt. Zum anderen beschreiben Scully et al. zwar keine Bindung an den C5a-Rezeptor durch C3aSA, jedoch eine unspezifische

Bindung an Zellen, die sogar zu einer Aktivierung führt [70]. So kann es durchaus sein, dass auch bei NK-Zellen die Aktivierung nicht ausschließlich rezeptorvermittelt ist, sondern auch durch unspezifische Bindung des Superagonisten an die Zellen zustande kommt und es so auch zu einer Aktivierung der NK-Zellen mit internalisiertem C3a-Rezeptor kommen kann. Ferner muss davon ausgegangen werden, dass bei  $n=2$  zu einer punktuellen Beobachtung eines Effekts kam, der nur bei den speziell für diese Experimente verwendeten Spender-PBMC in diesem Maße zum tragen kam.

Diese Vermutungen müssen in weiteren Experimenten mit isolierten NK-Zellen bestätigt werden, um so den Effekt auf die NK-Zellen selbst betrachten zu können. Ferner sollte nach NK-Zell-hemmenden Faktoren in Überständen von PBMC gesucht werden, beispielsweise könnten NK-Zellen mit diesen Überständen inkubiert werden um damit die eventuell vorhandene Hemmung der Zellen zeigen zu können.

## 5 Zusammenfassung

NK-Zellen stellen einen wichtigen Teil der angeborenen Immunantwort dar. Sie sind darüber hinaus in der Lage neoplastische Zellen zu identifizieren und lysieren und damit unschädlich zu machen. Tumorzellen sind in der Lage, sich über verschiedene Mechanismen der immunologischen Kontrolle der NK-Zellen zu entziehen. 1982 konnte bereits gezeigt werden, dass der Komplementfaktor C3a, der bei der Hydrolyse von C3 entsteht, NK-Zellen in ihrer Reaktivität gegen Tumorzellen hemmen kann. Habermann et al. wiesen 2006 bei Patienten mit kolorektalem Karzinom einen erhöhten Serumspiegel an C3a nach. Diese Fakten legen die Vermutung nahe, dass die Anwesenheit von Komplementfaktor C3a ein entscheidender Mechanismus der NK-Hemmung ist. Der konkrete Mechanismus ist jedoch unklar. Die vorliegende Arbeit überprüfte deshalb die Zusammenhänge der Expression des C3a-Rezeptors, sowie dessen Stimulierbarkeit, und der Wirkung von C3a auf die Aktivität der NK-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen den C3a-Rezeptor mit einer deutlichen interindividuellen Streuung exprimieren. Die Expressionsraten liegen bei polyklonalen und damit aktivierten NK-Zellen deutlich über den von NK-Zellen aus frisch isolierten PBMC. Jedoch besteht ein signifikanter Unterschied der Rezeptorexpression zwischen den pNKC, je nach dem welche Feederzellen benutzt wurden. So liegt der Schluss nahe, dass die C3a-Rezeptorexpression ein Marker für die Aktivität der NK-Zellen darstellt. Dies belegt auch Rezeptorexpression auf NK92, die als hochaktive NK-Zelllinie bis zu 7fach höhere Expressionwerte aufweisen, als pNKC<sub>RPMI6688</sub>.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass der C3a-Rezeptor auf NK-Zellen aus PBMC hochreguliert wird, mit einem Maximum nach 60h, wenn sie in Kultur gehalten werden. Hierbei könnte es sich um einen Priming-Prozess handeln, der beispielsweise eine schnellere und effektivere Chemotaxis entlang eines C3a-Gradienten zur Folge ermöglichen könnte.

Unsere Experimente legen ferner nahe, dass der C3a-Rezeptor durch TLR-Agonisten stimulierbar ist, wobei der TLR9-Agonist CpG OND2006 und der TLR3-Agonist Poly I:C die Rezeptorexpression am stärksten stimulieren. Poly

I:C wirkt hierbei vermutlich über einen direkten Stimulationsmechanismus, da der TLR3 auf NK-Zellen selbst exprimiert wird. CpG OND2006 hingegen vermittelt seine Wirkung über den TLR9 z.B. auf auf plasmazytoiden dendritischen Zellen und damit wahrscheinlich über eine indirekte Stimulation der NK-Zellen. Ein z.B. von pDC produziertes und sezerniertes lösliches Agens konnte jedoch unter den normalerweise NK-Zellwirksamen Interleukinen nicht identifiziert werden. Somit ist eine Zell-Zell-Interaktion sehr wahrscheinlich.

Wir konnten weiter zeigen dass C3a bzw. ein synthetischer C3a-Rezeptoragonist eine für die für G-gekoppelte Rezeptoren typische internalisierende Wirkung zur Folge haben. Diese erfolgt zum einen konzentrationsabhängig und zum anderen zeitabhängig.

Die Untersuchungen zur Beeinflussung der Zytotoxizität von NK-Zellen zeigten für C3a57-77 und den synthetischen C3a-Rezeptoragonisten eine ähnliche Wirkung. Die Lyse der Zielzellen war deutlich abhängig von der Konzentration des jeweiligen Agens. Jedoch zeigte sich im Bereich von niedrigen Konzentrationen eine Steigerung der Lyse, während sich bei zunehmenden Konzentrationen eine Hemmung der zytotoxischen Aktivität einstellte. Dies könnte Folge verschieden gerichteter Wirkungen von C3a auf unterschiedliche Zellen der in den Experimenten verwendeten PBMC sein. Man kann vermuten, dass bei niedrigen Konzentrationen die exzitatorische Wirkung von C3a auf die NK-Zellen überwiegt, während bei zunehmender Konzentration die Ausschüttung hemmender Faktoren durch andere Zellen die Targetzelllyse durch NK-Zellen hemmt. Die Beobachtung, dass C3aSA die Lyse zunächst extrem steigert und danach an stimuliertem Einfluss verliert ohne jedoch die Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Proben zu hemmen, kann einerseits als punktuelle Beobachtung betrachtet werden, oder C3aSA hat eine unspezifische, nicht rezeptorvermittelte Wirkung auf NK-Zellen.

Diese Arbeit konnte somit darlegen, dass NK-Zellen den C3a-Rezeptor exprimieren und diesen sowohl in Kultur, als auch unter TLR3- und TLR9-Stimulation hochregulieren. Ferner konnten die Ergebnisse von Charriot et al. von 1999 bestätigt werden und darüber hinaus ein spezieller Verlauf der NK-

Zellbeeinflussung, in Form einer Aktivitätssteigerung bei niedrigeren Konzentrationen und einer Lysehemmung bei höheren Konzentrationen, gezeigt werden. C3a und der C3a-Rezeptor scheinen demnach eine entscheidende Rolle für die Tumorlyseaktivität von NK-Zellen zu spielen. Ferner scheint die C3a-Rezeptorexpression ein Marker für die Aktivität der NK-Zellen zu sein, wobei sich in weiteren Experimenten zeigen muss, ob der Rezeptor auch die chemotaktische Wanderung von NK-Zellen beeinflusst.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 8<sup>th</sup> ed. 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
2. Longo, D.L., *Harrison's principles of internal medicine*. 18<sup>th</sup> ed. 2012, New York: McGraw-Hill.
3. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2. komplett überarb. Aufl. ed. 10 Tabellen. 2006, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XVII, 637 S.
4. Nie, Y. and Y.Y. Wang, *Innate immune responses to DNA viruses*. *Protein Cell*, 2013. **4**(1): p. 1-7.
5. Ausubel, F.M., *Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?* *Nat Immunol*, 2005. **6**(10): p. 973-9.
6. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
7. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. *Science*, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
8. Hansson, G.K. and K. Edfeldt, *Toll to be paid at the gateway to the vessel wall*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1085-7.
9. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. *Cell*, 1996. **86**(6): p. 973-83.
10. Yoneyama, M. and T. Fujita, *Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors*. *Immunity*, 2008. **29**(2): p. 178-81.
11. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 459-89.
12. Bugl, S., et al., *Current insights into neutrophil homeostasis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1266**: p. 171-8.
13. Dahlgren, C. and A. Karlsson, *Respiratory burst in human neutrophils*. *J Immunol Methods*, 1999. **232**(1-2): p. 3-14.
14. Geering, B., et al., *Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(8): p. 398-409.
15. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
16. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 593-623.
17. Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, *Mast cells in innate immunity*. *Immunol Rev*, 2000. **173**: p. 131-40.
18. Satpathy, A.T., et al., *Re(de)fining the dendritic cell lineage*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(12): p. 1145-54.
19. Gromme, M. and J. Neefjes, *Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways*. *Mol Immunol*, 2002. **39**(3-4): p. 181-202.
20. Brocke, P., et al., *HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 22-9.
21. Williams, A., C.A. Peh, and T. Elliott, *The cell biology of MHC class I antigen presentation*. *Tissue Antigens*, 2002. **59**(1): p. 3-17.

22. Villadangos, J.A., *Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them.* Mol Immunol, 2001. **38**(5): p. 329-46.
23. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
24. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 191-212.
25. Andreasen, S.O., et al., *Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3689-97.
26. Peach, R.J., et al., *Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28.* J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21181-7.
27. Tofukuji, S., et al., *Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF-beta.* J Immunol, 2012. **188**(10): p. 4846-57.
28. Tellier, J. and S.L. Nutt, *The unique features of follicular T cell subsets.* Cell Mol Life Sci, 2013.
29. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, *Activation of B cells by non-canonical helper signals.* EMBO Rep, 2012. **13**(9): p. 798-810.
30. Diaz, M. and P. Casali, *Somatic immunoglobulin hypermutation.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 235-40.
31. Chaudhuri, J., et al., *Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism.* Adv Immunol, 2007. **94**: p. 157-214.
32. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
33. Edelman, G.M., *Antibody Structure and Molecular Immunology.* Scandinavian Journal of Immunology, 1991. **34**(1): p. 4 - 22.
34. Lanier, L.L., *NK cell receptors.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
35. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets.* Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
36. Bryceson, Y.T., et al., *Molecular mechanisms of natural killer cell activation.* J Innate Immun, 2011. **3**(3): p. 216-26.
37. Kurschus, F.C., et al., *Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate-dependent endocytosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 13799-804.
38. Kam, C.M., D. Hudig, and J.C. Powers, *Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 307-23.
39. Sharma, K., et al., *Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand.* Pharmacol Ther, 2000. **88**(3): p. 333-47.
40. Yoon, S.R., J.W. Chung, and I. Choi, *Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells.* Mol Cells, 2007. **24**(1): p. 1-8.
41. Lanier, L.L., *NK cell recognition.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
42. Vivier, E., J.A. Nunes, and F. Vely, *Natural killer cell signaling pathways.* Science, 2004. **306**(5701): p. 1517-9.
43. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.* Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.

44. Moretta, A., et al., *Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells.* J Exp Med, 1995. **182**(3): p. 875-84.
45. Schmiedel, B.J., et al., *Generation and Preclinical Characterization of a Fc-optimized G1TR-Ig Fusion Protein for Induction of NK Cell Reactivity Against Leukemia.* Mol Ther, 2013. **21**(4): p. 877-86.
46. Legaz, I., et al., *KIR Gene Mismatching and KIR/C Ligands in Liver Transplantation: Consequences for Short-Term Liver Allograft Injury.* Transplantation, 2013. **95**(8): p. 1037-1044.
47. Hollenbach, J.A., et al., *Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene content variation in the HGDP-CEPH populations.* Immunogenetics, 2012. **64**(10): p. 719-37.
48. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.* Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
49. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.* Science, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
50. Raulat, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 781-90.
51. Salih, H.R., et al., *Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia.* Blood, 2003. **102**(4): p. 1389-96.
52. Groh, V., et al., *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6879-84.
53. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor.* Nature, 2005. **436**(7054): p. 1186-90.
54. Salih, H.R., et al., *Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies.* J Immunol, 2001. **167**(7): p. 4059-66.
55. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity.* J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
56. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle, *Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4098-102.
57. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.* Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
58. Troutbeck, R., S. Al-Qureshi, and R.H. Guymer, *Therapeutic targeting of the complement system in age-related macular degeneration: a review.* Clin Experiment Ophthalmol, 2012. **40**(1): p. 18-26.
59. Walport, M.J., *Complement. First of two parts.* N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
60. Gros, P., F.J. Milder, and B.J. Janssen, *Complement driven by conformational changes.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 48-58.
61. Ghannam, A., et al., *Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells.* J Immunol, 2008. **181**(7): p. 5158-66.

62. Rutkowski, M.J., et al., *Cancer and the complement cascade*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(11): p. 1453-65.
63. Hadders, M.A., D.X. Beringer, and P. Gros, *Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense*. Science, 2007. **317**(5844): p. 1552-4.
64. Bohlsion, S.S., D.A. Fraser, and A.J. Tenner, *Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions*. Mol Immunol, 2007. **44**(1-3): p. 33-43.
65. Gal, P., et al., *A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33435-44.
66. Stowell, S.R., et al., *Initiation and regulation of complement during hemolytic transfusion reactions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 307093.
67. Smith, G.P. and R.A. Smith, *Membrane-targeted complement inhibitors*. Mol Immunol, 2001. **38**(2-3): p. 249-55.
68. Singhrao, S.K., et al., *Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis*. Am J Pathol, 2000. **157**(3): p. 905-18.
69. Atkinson, J.P. and T.H. Goodship, *Complement factor H and the hemolytic uremic syndrome*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1245-8.
70. Scully, C.C., et al., *Selective hexapeptide agonists and antagonists for human complement C3a receptor*. J Med Chem, 2010. **53**(13): p. 4938-48.
71. Klos, A., et al., *The role of the anaphylatoxins in health and disease*. Mol Immunol, 2009. **46**(14): p. 2753-66.
72. Alegretti, A.P., et al., *The role of complement regulatory proteins in peripheral blood cells of patients with systemic lupus erythematosus: review*. Cell Immunol, 2012. **277**(1-2): p. 1-7.
73. Khan, M.A. and M.R. Nicolls, *Complement-mediated microvascular injury leads to chronic rejection*. Adv Exp Med Biol, 2013. **734a**: p. 233-46.
74. Hugli, T.E., *Human anaphylatoxin (C3a) from the third component of complement. Primary structure*. J Biol Chem, 1975. **250**(21): p. 8293-301.
75. Caporale, L.H., et al., *The active site of C3a anaphylatoxin*. J Biol Chem, 1980. **255**(22): p. 10758-63.
76. Kohl, J., *Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases*. Mol Immunol, 2001. **38**(2-3): p. 175-87.
77. Nettesheim, D.G., et al., *Secondary structure of complement component C3a anaphylatoxin in solution as determined by NMR spectroscopy: differences between crystal and solution conformations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5036-40.
78. Volanakis, J.E. and M.M. Frank, *The human complement system in health and disease*. 1998, New York: M. Dekker. ix, 656 p.
79. Fischer, W.H. and T.E. Hugli, *Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4279-86.
80. Hartmann, K., et al., *C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells*. Blood, 1997. **89**(8): p. 2863-70.

81. Markiewski, M.M., et al., *Modulation of the antitumor immune response by complement*. Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1225-35.
82. Reza, R., et al., *Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3784-93.
83. Ratajczak, M.Z., et al., *Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)--implications for trafficking of CXCR4+ stem cells*. Exp Hematol, 2006. **34**(8): p. 986-95.
84. Habermann, J.K., et al., *Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors*. Gastroenterology, 2006. **131**(4): p. 1020-9; quiz 1284.
85. Shi, L., et al., *Discovery and identification of potential biomarkers of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Proteome Sci, 2009. **7**: p. 7.
86. Lee, J.J. and H.F. Rosenberg, *Eosinophils in Health and Disease*. 2012: Academic Press.
87. Lambris, J.D., *Current Topics in Innate Immunity*. 2007: Springer Science+Business Media, LLC.
88. Sun, J., et al., *Identification of ligand effector binding sites in transmembrane regions of the human G protein-coupled C3a receptor*. Protein Sci, 1999. **8**(11): p. 2304-11.
89. Lu, Z.X., et al., *Conformational analysis of COOH-terminal segments of human C3a. Evidence of ordered conformation in an active 21-residue peptide*. J Biol Chem, 1984. **259**(12): p. 7367-70.
90. Norgauer, J., et al., *Complement fragment C3a stimulates Ca<sup>2+</sup> influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein*. Eur J Biochem, 1993. **217**(1): p. 289-94.
91. Moller, T., et al., *Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling in mouse microglia*. J Neurosci, 1997. **17**(2): p. 615-24.
92. Zwirner, J., et al., *Blood- and skin-derived monocytes/macrophages respond to C3a but not to C3a(desArg) with a transient release of calcium via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2317-22.
93. Burns, D.L., *Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin*. Microbiol Sci, 1988. **5**(9): p. 285-7.
94. Birnbaumer, L., *Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 772-93.
95. Li, K., et al., *Cyclic AMP plays a critical role in C3a-receptor-mediated regulation of dendritic cells in antigen uptake and T-cell stimulation*. Blood, 2008. **112**(13): p. 5084-94.
96. Lienenklaus, S., et al., *Human anaphylatoxin C4a is a potent agonist of the guinea pig but not the human C3a receptor*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2089-93.
97. Ember, J.A., N.L. Johansen, and T.E. Hugli, *Designing synthetic superagonists of C3a anaphylatoxin*. Biochemistry, 1991. **30**(15): p. 3603-12.

98. Hutamekalin, P., et al., *Effect of the C3a-receptor antagonist SB 290157 on anti-OVA polyclonal antibody-induced arthritis*. J Pharmacol Sci, 2010. **112**(1): p. 56-63.
99. Mathieu, M.C., et al., *The C3a receptor antagonist SB 290157 has agonist activity*. Immunol Lett, 2005. **100**(2): p. 139-45.
100. Charriaut, C., et al., *Inhibition of in vitro natural killer activity by the third component of complement: role for the C3a fragment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(19): p. 6003-7.
101. Kashem, S.W., et al., *G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2*. Eur J Pharmacol, 2011. **668**(1-2): p. 299-304.
102. Bajic, G., et al., *Human C3a and C3a desArg anaphylatoxins have conserved structures, in contrast to C5a and C5a desArg*. Protein Sci, 2013. **22**(2): p. 204-12.
103. Shook, D.R. and D. Campana, *Natural killer cell engineering for cellular therapy of cancer*. Tissue Antigens, 2011. **78**(6): p. 409-15.
104. Fujisaki, H., et al., *Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 4010-7.
105. Hilpert, J., et al., *Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses*. J Immunol, 2012. **189**(3): p. 1360-71.
106. Schmiedel, B.J., et al., *Receptor activator for NF-kappaB ligand in acute myeloid leukemia: expression, function, and modulation of NK cell immunosurveillance*. J Immunol, 2013. **190**(2): p. 821-31.
107. Baessler, T., et al., *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans*. Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 1037-45.
108. Gong, J.H., G. Maki, and H.G. Klingemann, *Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells*. Leukemia, 1994. **8**(4): p. 652-8.
109. Tonn, T., et al., *Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(4): p. 535-44.
110. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
111. Pawelec, G., *Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing?* Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(3): p. 262-74.
112. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.
113. Hanten, J.A., et al., *Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 39.
114. Kim, Y.C., et al., *Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion*. Blood, 2012. **119**(12): p. 2810-8.

115. Allacher, P., et al., *Stimulation and inhibition of FVIII-specific memory B-cell responses by CpG-B (ODN 1826), a ligand for Toll-like receptor 9*. *Blood*, 2011. **117**(1): p. 259-67.
116. Arai, S., et al., *Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial*. *Cytotherapy*, 2008. **10**(6): p. 625-32.
117. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. *J Immunol*, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
118. Guilleroy, C., et al., *Pivotal role of plasmacytoid dendritic cells in inflammation and NK-cell responses after TLR9 triggering in mice*. *Blood*, 2012. **120**(1): p. 90-9.
119. Moseman, E.A., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(7): p. 4433-42.
120. Vollmer, J. and A.M. Krieg, *Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(3): p. 195-204.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

4-1BB	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9; CD137
4-1BBL	4-1BB Ligand
<sup>51</sup> Cr	synthetisches Radioisotop von Chrom
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity (dt. antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)
APC	antigen presenting cell (dt. antigenpräsentierende Zelle)
APC (Farbstoff)	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
B-Zellen	B-Lymphozyt
B7	CD80 molecule
BATDA	Bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylat
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Celsius
C-type-Lektin	Kohlenhydrat bindende Lektin
C1	Complement Component 1
C1INH	C1 Esterase Inhibitor
C1q	Spaltprodukt q des complement component 1
C1r	Spaltprodukt r des complement component 1
C1s	Spaltprodukt s des complement component 1
C2	Complement Component 2
C2a	Spaltprodukt a des Complement Component 2
C2a4b	C3-Konvertase
C2b	Spaltprodukt b des Complement Component 2

C3	Complement Component 3
C3a	Spaltprodukt a des complement component 3
C3a	Spaltprodukt a des Complement Component 3
C3a57-77	C3a Pepitd bestehend aus Aminosäure 57 bis 77
C3adesArg	C3a ohne das C-terminale Arginin
C3aR	complement component 3a receptor 1 (auch C3AR1)
C3AR1	complement component 3a receptor 1 (auch C3aR)
C3aSA	C3a „Superagonist“
C3b	Spaltprodukt b des Complement Component 3
C4	Complement Component 4
C4a	Spaltprodukt a des Complement Component 4
C4b	Spaltprodukt b des Complement Component 4
C5	Complement Component 5
C5a	Spaltprodukt a des Complement Component 5
C5b	Spaltprodukt b des Complement Component 5
C6	Complement Component 6
C7	Complement Component 7
C8	Complement Component 8
C9	Complement Component 9
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
CD	Cluster of Differentiation
CD107a	lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)

CD16	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (auch CD16a)
CD19	CD19 molecule
CD21	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2 (auch CR2)
CD28	CD28 molecule
CD3	Komplex aus CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ und CD3 $\epsilon$
CD35	complement component (3b/4b) receptor 1
CD4	CD4 molecule
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	CD8 positive T-Zellen
CD40	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5
CD40L	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 ligand
CD46	CD46 complement regulatory protein
CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement
CD56	neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1)
CD59	CD59 complement regulatory protein (auch Membrane Attack Complex inhibiting protein)
CD79a	B-cell antigen receptor-complex-associated alpha chain (dt. B-Zell Antigenrezeptor assoziierte Alpha-Kette)
CD79b	B-cell antigen receptor-complex-associated beta chain (dt. B-Zell Antigenrezeptor assoziierte Alpha-Kette)
CD8	CD8a molecule
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	CD8 positive T-Zellen
CD80	CD80 molecule (auch B7)
CD81	CD81 molecule (auch Tetraspanin-28)
CD86	CD86 molecule (auch B7-2)
CD90	Thy-1 cell surface antigen
CD94	killer cell lectin-like receptor subfamily D,

	member 1
CD95	Fas cell surface death receptor
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid
CTL	cytotoxic T-cell (dt. cytotoxischer T-Lymphozyt)
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL12 oder 8	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 oder 8
CXCR5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5
DAF	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement
DAP10	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
DDT	Dithiothreiol
des-Arg <sup>77</sup>	abgespaltenes Arginin an Position 77
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (dt. Desoxiribonukleinsäure)
DSMZ	deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	double-strang ribonucleic acid (dt. Doppelstrang-Ribonukleinsäure)
E:T-Ratio	Effector to Target Ratio
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	antigen-binding fragment (dt. Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Faktor B	complement factor B
Faktor D	complement factor D
Faktor H	complement factor H
Faktor I	complement factor I

Faktor P	complement factor P, Properdin
Faktor P	Properdin
Fas	Fas cell surface death receptor (auch CD95)
Fas-Ligand	Fas ligand, TNF superfamily, member 6 (auch CD178)
Fc	crystallisable fragment (dt. kristallisierbares Fragment eines Antikörpers)
FCS	Fetal Calf Serum (dt. fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GAP12	GTPase activating protein 12
G <sub>i</sub>	inhibierendes Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Gy	Gray
gam-PE	Phycoerythrin markierter goat-anti-mouse Antikörper
h	Stunde
HCT116	humane Zelllinie eines kolorektalen Karzinoms
hIgG	humanes Immunglobulin Klasse G
HLA	Human Leukocyte Antigen (dt. humane Leukozytenantigen-System)
HLA-DO	Human Leukocyte Antigen (dt. humane Leukozytenantigen-System) Klasse II Subtyp DO
HLA-DP	Human Leukocyte Antigen (dt. humane Leukozytenantigen-System) Klasse II Subtyp DP
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen (dt. humane Leukozytenantigen-System) Klasse II Subtyp DR
HPLC	high performance liquid chromatography (dt. Hochleistungsflüssigkeitschromato-

	graphie)
HRP	Horseradish peroxidase (dt. Meerrettigperoxidase)
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (auch CD54)
ICOS	inducible T-cell co-stimulator (auch CD278)
IFN	Interferon
IFR-3	Interferon-regulatorischer Faktor 3
IgA	Immunglobulin Klasse A
IgD	Immunglobulin Klasse D
IgE	Immunglobulin Klasse E
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgG1	Immunglobulin Klasse G1
IgG2a	Immunglobulin Klasse G2a
IgM	Immunglobulin Klasse M
iKIR	inhibierender KIR
IL	Interleukin
ITAM	intercellular adhesion molecule
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motiv (dt. Thyrosin-basiertes hemmendes Motiv von Immunrezeptoren)
k	kilo
K562	humane CML-Zelllinie
K562-mb15-41BBL	K562 mit membranständiger Expression von IL-15 und 41BBL
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
KLAR	killer lectine-like receptor
LPS	Lipopolysaccharid
LRC	leukocyte receptor cluster/complex
Ly94	natural cytotoxicity triggering receptor 1

M	Mol
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAC	Membran Attack Complex
MASP-1	mannan-binding lectin serine peptidase 1
MASP-2	mannan-binding lectin serine peptidase 2
MBL	mannose-binding lectin
MCP	Membran Cofactor Protein, CD46 complement regulatory protein
MHC I	Major Histocompatibility Complex Klasse I
MHC II	Major Histocompatibility Complex Klasse II
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
mIgG2b	murines IgG Subtyp 2b
min	Minute(n)
ml	Mililiter
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
n	Anzahl
n (Präfix)	nano
NEAA	non-essential Amino Acid (dt. nicht-essentielle Aminosäuren)
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated b-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NK92	humane NK-Zellen, isoliert aus Patient mit Non-Hogkin-Lymphom
NKG2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
NKG2C	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2

NKG2D	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
NK <sub>PBMC</sub>	NK-Zellpopulation von PBMC
NOD-like Rezeptor	nucleotide-binding oligomerization domain receptors
OND	Oligonukleotid
OPSI	overwhelming post plenectomy infection
Ox40	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, CD134
Ox40L	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 Ligant, CD252
p (auch p-Wert)	Signifikanz, Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBL	peripheral blood lymphocytes (dt. Lymphozyten aus peripherem Blut)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (dt. periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	phosphate buffered saline (dt. Phosphatgepufferte Salzlösung)
pDC	plasmazytoiden dendritischer Zellen
PE	Phycoerythrin
PeCy5	Konjugatfarbstoff aus Phycoerythrin und Cyanin 5
PeCy7	Konjugatfarbstoff aus Phycoerythrin und Cyanin 5
Pen/Strep (P/S)	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pNKC	polyklonale Natürliche Killerzellen
pNKC <sub>K562</sub>	polyklonale NK-Zellen mit K562-mb14-41BBL Feederzellen
pNKC <sub>RPMI8866</sub>	polyklonale NK-Zellen mit RPMI8866 Fee-

	derzellen
Poly I:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern recongisation receptors
PTX	Pertussistoxin
RIG-I-like Rezeptor	retinoic acid-inducible gene 1 like Rezep- tor
RNA	Ribonucleinacid
ROS	reactive oxygen species
Rpm	rounds per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RPMI8866	B lymphozytäre humane CML Zelllinie
SB290157	synthetischer C3a-Rezeptorantagonist
SDF-1	= CXCL12
SFI	Specific fluorescence index (dt. spezifi- scher Fluoreszenzindex)
SHIP	inositol polyphosphate-5-phosphatase D
SHP1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SHP2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2
sKIR	aktivierender KIR
sKIR	aktivierender KIR
T-Zellen	T-Lymphozyten
T <sub>FH</sub>	follikuläre B T-Helferzellen
TGF-β	transforming growth factor beta
T <sub>H</sub> 1	Typ 1 T-Helferzelle
TH1-like Zytokine	die T <sub>H</sub> 1-Differenzierung beeinflussende Zytokine
T <sub>H</sub> 17	Typ 17 T-Helferzelle
T <sub>H</sub> 2	Typ2 T-Helferzelle
TH2-like Zytokine	die T <sub>H</sub> 2-Differenzierung beeinflussende Zytokine

TLR	toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
Typ-B-OND	Typ B Oligonukleotid
Typ-C-OND	Typ B Oligonukleotid
UL16	type 1 membrane protein von Herpesviren
ULBP1-3	UL16 binding protein 1-3
$\alpha_i$	inhibitorische alpha-Untereinheit
$\mu$	mykro

## 8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: schematische Darstellung der Hämatopoese</i>	8
<i>Abbildung 2: schematische Darstellung der Aktivierung des Komplementsystems</i>	21
<i>Abbildung 3: C3a-Rezeptorexpression auf NK-Zellen</i>	47
<i>Abbildung 4: Änderung der C3a-Rezeptorexpression in Kultur</i>	48
<i>Abbildung 5: C3a-Rezeptorexpression nach 60h Interleukininkubation</i>	50
<i>Abbildung 6: C3a-Rezeptorexpression nach TLR-Stimulation</i>	51
<i>Abbildung 7: C3a-Rezeptorexpression nach Inkubation mit synthetischem C3aR-Agonist</i>	54
<i>Abbildung 8: <sup>51</sup>Cr-Release-Assey mit PBMC vs. HCT116 mit C3aR-Agonist für 16h</i>	56
<i>Abbildung 9: <sup>51</sup>Cr-Release-Assey mit PBMC vs. HCT116 mit C3a57-77 für 3h</i>	58
<i>Abbildung 10: <sup>51</sup>Cr-Release-Assey mit PBMC vs. HCT116 mit C3aSA für 3h</i>	59

## 9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: verwendete Zelllinien</i>	30
<i>Tabelle 2: verwendete Geräte</i>	31
<i>Tabelle 3: verwendete Verbrauchsmaterialien</i>	31
<i>Tabelle 4: verwendete Chemikalien und Reagenzien</i>	33
<i>Tabelle 5: verwendete Antikörper und Zytokine</i>	35
<i>Tabelle 6: für die Zellkultur verwendete Medien</i>	35
<i>Tabelle 7: Primärstruktur der Peptide C3a57-77 und C3aSA</i>	36
<i>Tabelle 8: verwendete Zelllinien mit entsprechendem Medium und Zellzahl</i>	38
<i>Tabelle 9: verwendete TLR-Agonisten mit entsprechenden Konzentrationen</i>	42

## 10 Danksagungen

Ich möchte mich an aller erster Stelle bei meinem Doktorvater Professor Dr. Helmut Salih für die Überlassung des Themas, die Diskussionen und Motivationen bedanken.

Ferner gilt mein besonderer Dank Dr. rer. nat. Tina Nübling, Dr. rer. nat. Theresa Placke und Julia Wild für die Betreuung, die eine große Hilfe waren bei allen Fragen und Problemen und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Der ganzen AG Salih für die herzliche Aufnahme und Unterstützung während der gesamten Versuchszeiten und darüber hinaus.

Ganz lieben Dank an Anja Meier, Lucas Bettac und Christoph Grabenbauer für die Unterstützung, Hilfe und Kritik, ohne euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen

Und natürlich möchte mich ganz besonders bei meinen Eltern Sibylle von Schneider und Hans-Martin Holl für alles bedanken was sie nicht nur während dieser Zeit sondern auch davor und danach für mich geleistet haben und immer noch leisten. Vielen Dank für eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

## 11 Lebenslauf

Name Hans-Guido Holl  
Geburtsdatum, -ort 11. November 1987, Mutlangen  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Berufserfahrung

seit 01.2015 **Assistenzarzt für Innere Medizin**  
Klinikum Stuttgart, Abteilung für Hämatologie Onkologie und Palliativmedizin

### Hochschulausbildung

04.2008 – 11.2014 **Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**  
2008-2010: Vorklinik  
04.2010: Physikum  
2010-2014: klinischer Studienabschnitt  
05.11.2014: Ärztliche Prüfung

### praktisches Jahr

04. - 07.2014 **Innere Medizin**  
Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart  
02.2014 - 04.2014 **Abteilung für Gefäßchirurgie**  
Western Hospital, Melbourne, Lehrkrankenhaus der University of Melbourne  
12.2013 - 02.2014 **Allgemein- und Viszeralchirurgie**  
Shanghai East Hospital, Lehrkrankenhaus der Tonji University Shanghai  
09. - 12.2013 **Anästhesie und Intensivmedizin**  
Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

### Famulaturen

2013 **Abteilung für Hämatologie und Onkologie**  
Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Tübingen  
2012 **Praxis für Innere Medizin und Nuklearmedizin**  
Dr. Michael Haen, Tübingen  
2012 **Abteilung für Hämatologie und Onkologie**  
Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart  
2010 **Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin**  
Universitätsklinikum Tübingen

### Schulausbildung und Zivildienst

09.1998 – 07.2007 **Parler-Gymnasium, Schwäbisch Gmünd**  
Abiturnote 1,8  
07.2007 – 03.2008 **Zivildienst am Margaritenhospital, Schwäbisch Gmünd**

## **weitere Tätigkeiten**

10.2013 – 12.2013 und  
04.2014 – 07.2014

### **studentischer Angestellter**

Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Zentrum für Innere Medizin

03.2011 – 09.2013

### **studentischer Angestellter**

Universitätsklinik Tübingen, Medizinische Klinik I (Gastroenterologie) und II (Hämatologie/Onkologie)

04.2010 – 08.2011

### **studentische Hilfskraft**

anatomisches Institut Universität Tübingen, Abteilung für klinische Anatomie

09.2009 – 12.2009

### **Tutor im anatomischen Präparierkurs**