

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. D. Kabelitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE ROLLE VON REGULATORISCHEN T-ZELLEN BEI
TUMORERKRANKUNGEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MATTHIAS JURICKE

aus Bremen

Kiel (2014)

1. Referent: Prof. Dr. Daniela Wesch, Institut für Immunologie
2. Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15.06.2015

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Glossar</i>	<i>VI</i>
1 Einleitung	1
1.1 T-Zellen	1
1.1.1 Regulatorische T-Zellen	3
1.1.2 FoxP3 ⁺ regulatorische T-Zellen in Tumorgewebe	4
1.2 Immunescapemechanismen beim duktalem Pankreasadenokarzinom	6
1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killerzellen in der Tumorbilogie	6
1.3.1 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten	6
1.3.2 B-Zellen	7
1.3.3 Natürliche Killerzellen	8
1.4 Immunsystem und Ovarialkarzinom	8
1.5 Aszites bei Malignomen	9
2 Fragestellung	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Material	11
3.1.1 Medien, Medienzusätze und Puffer	11
3.1.2 Zellmaterialien	13
3.1.2.1 Buffy coats (Leukozytenkonzentrate)	13
3.1.2.2 Aszites Spender	13
3.1.2.3 Tumorzelllinien	14
3.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie	15
3.1.3.1 Spezifische Antikörper	15
3.1.3.2 Isotypkontrollen	16
3.1.3.3 Sekundär-Reagentien	16
3.1.4 Test-Kits	16
3.1.5 Membranen und Filter	16
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	16
3.1.7 Geräte	17

3.2 Methode	18
3.2.1 Gewinnung von mononukleären Zellen aus einem buffy coat	18
3.2.2 Aufarbeitung von Aszites	18
3.2.3 Generierung von Tumorzelllinien	19
3.2.4 Tumorzellkultur	19
3.2.5 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	19
3.2.6 Kryokonservierung	19
3.2.7 Magnetische Zellisolierung	20
3.2.8 Isolierung von CD4 ⁺ 25 ⁺ Treg Zellen und CD4 ⁺ CD25 ⁻ Respondern	21
3.2.9 T-Zellstimulation	22
3.2.10 Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien	23
3.2.11 Durchflusszytometrische Messungen	23
3.2.11.1 Markierung von Zelloberflächenantigenen	23
3.2.11.2 Intrazelluläre FoxP3-Färbung	24
3.2.11.3 CFSE Färbung	24
3.2.11.4 DDAO-SE Färbung	25
3.2.11.5 Tumorzellfärbung	25
3.2.11.6 Aszites-Zell-Färbung	25
3.2.12 Tumorzellkokultur	26
3.2.13 Suppressionsansatz	27
3.2.14 Statistik	27
4 Ergebnisse	28
4.1 Charakterisierung von Tumorzellen	28
4.2 Proliferationsinhibition von Responder-Zellen durch Tumorzellen	30
4.3 Suppressionsansatz mit kokultivierten Responder-Zellen	33
4.4 Optimierung der Differenzierung von Respondern durch DDAO-SE	34
4.5 Suppression von Resp(CFSE) durch TZR-stimulierte RespV	36
4.6 Reduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen im Aszites	39
4.7 Proliferationsvermögen von $\gamma\delta$ T-Zellen aus Aszites	40
5 Diskussion	42
6 Zusammenfassung	54
7 Literaturverzeichnis	56

8 Publikationsliste	66
9 Danksagung	67
10 Lebenslauf	68

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod
Ak	Antikörper
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BrHPP	Bromhydrinpyrophosphat
BSA	bovine serum albumin
CCL22	CC-Chemokin-Liganden 22
CCR4	CC-Chemokin-Rezeptor 4
CD	cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DDAO-SE	9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one-7-yl)-succinimidyl ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	forward scatter
GITR	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor–related protein
GITRL	GITR-Ligand
GAM	goat anti-mouse
GSI	γ -Sekretase Inhibitor
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HER2	human epidermal growth factor receptor
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte Treg
IPEX	immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
KM	Zellkulturmedium
LAG-3	lymphocyte activation gene-3
MACS	magnetic activated cell sorting

MHC	major histocompatibility complex
MIC	major histocompatibility antigen related chain
MNZ	mononukleäre Zellen
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphat buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PDAC	duktales Pankreasadenokarzinom
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
SSC	side scatter
rpm	rounds per minute
rIL-2	rekombinantes Interleukin-2
RT	Raumtemperatur
TGF- β	transforming growth factor- β
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TLRs	toll-like receptors
TLSs	tertiary lymphoid structures
Treg	regulatorische T-Zelle
Tr1	regulatorische T Zelle vom Typ 1
TSDR	Treg spezifische Demethylierungsregion
TZR	T-Zellrezeptor/CD3-Komplex
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
XLAAD	X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome

Glossar

Responder:	aktivierte wie auch naive CD4 ⁺ T-Zellen, CD4 ⁺ exprimierende regulatorische T-Zellen ausgeschlossen
RespV:	für mindestens 90 Std. mit oder ohne TZR-Stimulus vorinkubierte Responder
RespV(Colo357):	Responder, die mindestens 90 Std. in Anwesenheit der Tumorzelllinie Colo357 mit oder ohne TZR-Stimulus vorinkubiert wurden
RespV(Panc89):	Responder, die mindestens 90 Std. in Anwesenheit der Tumorzelllinie Panc89 mit oder ohne TZR-Stimulus vorinkubiert wurden
RespV(Med):	Responder, die mindestens 90 Std. nur in KM mit oder ohne TZR-Stimulus vorinkubiert wurden
RespCFSE:	CFSE markierte, frisch isolierte Responder, die in den Suppressionsansatz eingesetzt wurden

1 Einleitung

Das Immunsystem ist unter anderem wichtig für die Erkennung und Bekämpfung von Tumoren. Bedenkt man das hohe Krebsrisiko, dem immunsupprimierte Individuen wie HIV-Patienten oder Organtransplantierte ausgesetzt sind, so lässt sich diese Aussage leicht beweisen (Aguilar et al., 2011). Das Immunsystem verfügt über eine Reihe von Mechanismen, die Tumorzellen erkennen und bekämpfen können wie z.B. natürliche Killerzellen (NK-Zellen), $\gamma\delta$ T-Zellen oder auch Zytokine wie z.B. Interferon- γ (IFN- γ). Gegenstand der heutigen Forschung ist es zu verstehen, wie es Tumore trotz der vorhandenen Immunüberwachungsmechanismen schaffen, verborgen zu bleiben und sich weiter zu entwickeln.

1.1 T-Zellen

T-Lymphozyten oder auch T-Zellen sind morphologisch durch ihren großen Zellkern, ein kleines Zytoplasma mit vielen Ribosomen, mehreren Mitochondrien, einem kleinen Golgiapparat und nur wenigen Lysosomen charakterisiert (Heath, 1998). T-Zellen gehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervor, während sich ihre Ausreifung im Thymus, dem sie ihren Namen verdanken, vollzieht.

T-Zellen im peripheren Blut lassen sich über Oberflächenmarker differenzieren. Der wichtigste Marker ist hierbei der T-Zellrezeptor/CD3-Komplex (TZR). Über ihn können die Zellen prozessierte Antigene, d.h. Peptidfragmente erkennen. Bei über 90% der Blut T-Zellen besteht er aus einer α - und einer β -Kette. Die restlichen T-Zellen exprimieren alternativ eine γ - und eine δ -Kette. Die Rezeptoren zeichnen sich dabei durch eine hohe Diversität ihrer Antigenbindungsstelle aus, die aus der somatischen Rekombination verschiedener Gensegmente während der T-Zellreifung resultiert. Dadurch erlangen die variablen Regionen des Rezeptors, welche für die Antigenbindung maßgebend sind, durch den Prozess der Rekombination eine hochpolymorphe Ausprägung und definieren die Antigenspezifität (Davis et al., 1998). Der $\alpha\beta$ TZR erkennt Peptide im Kontext mit dem „major histocompatibility complex“ (MHC). CD4 T-Zellen erkennen dabei Peptide in Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen (beim Menschen Humane Leukozyten Antigene (HLA)-DR) und CD8 T-Zellen mit MHC-Klasse-I-Molekülen (beim Menschen HLA A-B-C). Die MHC-Moleküle binden sowohl endogene als auch exogene Peptide. Alle kernhaltigen Körperzellen und somit auch Tumorzellen besitzen MHC-Klasse-I-Moleküle, wohingegen z.B. Erythrozyten diese nicht exprimieren (Murphy et al., 2009a).

T-Lymphozyten lassen sich in T-Helferzellen (T_H -Zellen) und zytotoxische T-Zellen unterscheiden, was mit der unterschiedlichen Expression der Korezeptoren CD4 bzw. CD8

korreliert. Das CD8 Molekül ist kennzeichnend für zytotoxische T-Zellen, die endogene virale Peptide im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen und sowohl virusinfizierte Zellen als auch Tumorzellen durch Zelllyse und Apoptose abtöten können (Murphy et al., 2009b). MHC-Klasse-II-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie beispielsweise Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen exprimiert. Solche APZ nehmen exogene Antigene auf, die intrazellulär in den MHC-Klasse-II Präsentationsweg eingeschleust werden. Erkennt der TZR einer naiven CD4⁺ T-Zelle ein Antigen in Verbindung mit dem MHC-Klasse-II-Molekül auf einer APZ, wird dadurch das 1. Aktivierungssignal vermittelt. Für eine vollständige Aktivierung benötigt die T-Zelle darüber hinaus kostimulatorische Signale, die zur Proliferation und Differenzierung führen und nach wiederholter Stimulation die Apoptose der T-Zelle induzieren können. Diese kostimulatorischen Signale werden durch unterschiedliche Rezeptor-Liganden-Interaktionen vermittelt. Hierfür müssen unter anderem die Oberflächenliganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die sich auf den APZ befinden, an CD28 Rezeptoren auf naiven T-Zellen binden. Ein negatives kostimulatorisches Signal wird durch die Interaktion von CD80 bzw. CD86 mit den „cytotoxic T-lymphocyte antigen 4“ (CTLA-4) Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen vermittelt. Als gemeinsame Bezeichnung für aktivierte als auch naive CD4⁺ T-Zellen wird der Begriff „Responder“ in dieser Arbeit benutzt, der jedoch explizit CD4 exprimierende regulatorische T-Zellen (Treg) ausschließt (Responder, siehe auch Glossar).

Naive CD4⁺ T-Zellen verfügen über die Fähigkeit zur Differenzierung, so dass sie in verschiedene Subpopulationen unterschieden werden können. Die CD4⁺ T-Zellen können funktionell u.a in Follikuläre T-Zellen, Treg, T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen unterteilt werden. Dabei ist die Unterscheidung durch die unterschiedlich exprimierten Zytokinmuster, durch die verschiedenen Lokalisationen der T_H-Zellen und durch die unterschiedlichen Zielzellen begründet (Zhu und Paul, 2010).

T_H1-Zellen bekämpfen im Wesentlichen intrazelluläre Erreger, produzieren hauptsächlich IFN- γ und sind damit wichtig für die Aktivierung von Makrophagen (Szabo et al., 2003). T_H2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13, die unter anderem eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Becherzellen aktivieren. IL-4 ist beispielsweise der Switchfaktor für IgE. Insbesondere eine wirkungsvolle Immunität gegenüber parasitären Würmern ist auf T_H2-Zellen angewiesen (Koyasu und Moro, 2012). T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen können für mehrere Krankheiten verantwortlich sein. Die Fehlfunktion von T_H1-Zellen führt in erster Linie zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen, während T_H2-Zellen bei Asthma und bei anderen allergischen Erkrankungen fehlreguliert sind (Zhu und Paul, 2010). T_H17-Zellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen. Beispiele sind unter anderem IL-17, IL-22 und IL-21. Sie sorgen für die Immunität und die damit verbundene Erhaltung der Schleimhäute, insbesondere die der Haut, Lunge und des Gastrointestinaltraktes. T_H17-Zellen sind von entscheidender Bedeutung bei

chronischen Entzündungen und Entstehung von Autoimmunität. (Rendon und Choudhry, 2012).

Die erst vor kurzer Zeit neu entdeckten folliculären T-Zellen unterscheiden sich von anderen T-Helferzellen in erster Linie durch ihre enge Interaktion mit B-Zellen, wodurch sie die humorale Immunantwort modulieren (Yang, 2012).

1.1.1 Regulatorische T-Zellen

Die Aufgabe von regulatorischen T-Zellen ist unter anderem die Inhibition von potenziell schädlichen T_H -Zellen, wodurch sie die Immunantwort regulieren. Damit kann unter anderem eine höhere Toleranz des Immunsystems gegenüber den eigenen Körperzellen, die Unterdrückung von Asthma und Allergien und die mütterliche Toleranz gegenüber dem Fetus gewährleistet werden (Sakaguchi et al., 1995; Wang et al., 2007; Piao et al., 2008; Curotto de Lafaille et al., 2001; Aluvihare et al., 2004). Die immunregulatorischen Eigenschaften der Treg bestehen in der Inhibition der Aktivierung und Proliferation von anderen T-Zellen um damit die Differenzierung in Effektor-Zellen zu verhindern. Treg benötigen zur Entfaltung ihrer suppressiven Wirkung Antigen-Kontakt (Corthay, 2009). Die suppressive Aktivität von Treg kann durch sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), die von „toll-like receptors“ (TLRs) erkannt werden, beeinflusst werden. TLRs befinden sich im hohen Maße auf Zellen des angeborenen Immunsystems, darüber hinaus aber auch auf T-Lymphozyten. Bei Aktivierung von TLR2 durch die entsprechenden TLR2-Liganden oder durch TLR8-Liganden kam es beispielsweise zur Aufhebung der Suppression durch Treg (Oberge et al., 2011; Peng et al., 2005).

Der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) wird als zuverlässigster Marker für regulatorische T-Zellen angesehen (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003; Fontenot et al., 2005). FoxP3 wird in natürlichen Treg (nTreg) während der Entwicklung im Thymus induziert, wenn der TZR eine hohe Avidität zu Selbst-Antigenen aufweist (Fontenot et al., 2005). Bei Mutationen des FoxP3 Gens kann es beim Menschen zu Autoimmunerkrankungen wie dem „X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome“ (XLAAD) oder zu dem „immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome“ (IPEX) kommen, was die grundlegende Bedeutung von FoxP3 für die Homöostase des Immunsystems veranschaulicht (Chatila et al., 2000; Wildin et al., 2001; Bennett et al., 2001). Weiterhin wurde belegt, dass der retrovirale Transfer von FoxP3 suppressive Fähigkeiten in T-Zellen induzieren kann (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003). Da FoxP3 ein intrazelluläres Molekül ist und ohne Fixierung nicht nachgewiesen werden kann, ist das Oberflächenmolekül CD25 zur durchflusszytometrischen Isolierung von funktionellen Treg aus dem peripheren Blut am besten geeignet. Treg exprimieren CD25 in besonders hoher Intensität. CD25, die IL-2-Rezeptor α -Kette, ist für die Bildung und den Erhalt von nTreg

notwendig (Pahwa et al., 2010). Dabei hat das Zytokin Interleukin-2 (IL-2), ein Wachstumsfaktor, eine entscheidende Bedeutung bei der klonalen Expansion von T-Zellen. Neben FoxP3 gelten CTLA-4, „glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor–related protein“ (GITR) und „lymphocyte activation gene-3“ (LAG-3) als weitere Marker für Treg (Corthay, 2009). CTLA-4 interagiert mit den Liganden CD80 und CD86. Es besitzt eine höhere Affinität zu den Liganden als CD28 und ist durch diese Eigenschaft für die Selbsttoleranz mitverantwortlich, indem T-Zellen durch die CTLA-4/CD80/86-Interaktion negativ reguliert werden (Sarnaik und Weber, 2009). Sowohl CTLA-4 als auch GITR werden verstärkt von nTreg exprimiert. Durch den GITR-Liganden (GITRL) wird GITR aktiviert, der seinerseits vorrangig von APZ und Endothelzellen exprimiert wird. Das GITR/GITRL System hat eine proinflammatorische Wirkung, die unter anderem auf der Aktivierung von angeborenen Immunzellen und T-Zellen sowie auf einem negativ regulierenden Effekt auf Treg beruht (Krausz et al., 2007). LAG-3 wird ebenfalls als Marker für regulatorische T-Zellen angesehen. LAG-3 ist zudem für die suppressive Aktivität von Treg mitverantwortlich (Huang et al., 2004). Zusätzlich kann CD127, die IL-7-Rezeptor α -Kette, zur besseren Identifikation von Treg dienen. CD127 wird auf Treg vermindert bis gar nicht exprimiert, während es auf anderen T-Helferzellen vermehrt vorkommt, womit CD127 ein „negativer Marker“ für Treg ist (Liu et al., 2006).

In der Peripherie können sich aus CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen induzierte Treg (iTreg) bilden. Die iTreg können in regulatorische T-Zellen von Typ 1 (Tr1) und T_H3-Zellen unterteilt werden. Tr1 lassen sich durch das Zytokin Interleukin-10 (IL-10) induzieren und wirken über IL-10 selbst und/oder TGF- β suppressiv (Groux et al., 1997; Battaglia et al., 2006). Werden Treg in der Peripherie oder *in vitro* durch TGF- β und einem TZR-Stimulus induziert, so werden sie als T_H3-Zellen bezeichnet. T_H3-Zellen wirken durch die Freisetzung von TGF- β suppressiv (Workman et al., 2009; Chen et al., 2003). Während nTreg grundsätzlich FoxP3 exprimieren, benötigen T_H3-Zellen und Tr1 einen TZR-Stimulus zur FoxP3 Expression (Selvaraj und Geiger, 2007; Battaglia et al., 2006). Nach Untersuchungen von Thornton et al. (2010) lassen sich nTreg und FoxP3 exprimierende iTreg wiederum bisher nur durch die Expression des Transkriptionsfaktor Helios oder anhand des Methylierungsmusters des FoxP3 Gens unterscheiden (Thornton et al., 2010; Floess et al., 2007). Hierbei ist die Treg spezifische Demethylierungsregion (TSDR) in nTreg komplett demethyliert, während die TSDR in aktivierten oder nicht aktivierten Respondern methyliert bleibt (Huehn et al., 2009).

1.1.2 FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen in Tumorgewebe

Treg spielen in der Tumorentstehung eine wichtige Rolle. Dabei können sowohl zu viele als auch zu wenige Treg die Tumorentstehung beeinflussen. Die Depletion von Treg führt zu einem reduzierten Tumorwachstum des Tumorgewebes in Mausmodellen und zu einer verstärkten Immunantwort, wohingegen die Expansion und Aktivierung von Treg wiederum die

Immunantwort gegen einen Tumor verschlechtert (Dannull et al., 2005; Litzinger et al., 2007; Curiel et al., 2004; Nishikawa et al., 2003). Eine erhöhte Anzahl von FoxP3⁺ Treg im Tumorgewebe von Patienten wurde in verschiedenen Studien beobachtet (Ha, 2009).

Diese Studienergebnisse werden mit mehreren Mechanismen begründet:

1. Regulatorische T-Zellen im peripheren Blut exprimieren den CC-Chemokin-Rezeptor 4 (CCR4). Bei Bindung von CCR4 an den CC-Chemokin-Liganden 22 (CCL22) führt dies zur Einwanderung der Treg in das umliegende Gewebe. Tumorzellen und tumorinfiltrierende Makrophagen exprimieren vermehrt CCL22 und könnten auf diese Weise die Akkumulation von Treg in die Tumormikroumgebung vermitteln (Curiel, et al., 2004; Gobert, et al., 2009).
2. Weiterhin rekrutieren Tumorzellen Dendritische Zellen, die ihrerseits durch die Freisetzung von TGF- β die Proliferation von Treg im Tumorgewebe hervorrufen könnten, wie Ghiringhelli und Kollegen im Ratten- und Mausmodell zeigten (Ghiringhelli et al., 2005).
3. Überdies besitzen Tumorzellen die Fähigkeit in CD4⁺ T-Helferzellen regulatorische Aktivität zu induzieren. So berichteten Moo-Young und Mitarbeiter, dass Tumorzellen durch die Freisetzung von TGF- β die Konversion von CD4⁺CD25⁻ Respondern zu regulatorischen T-Zellen im Mausmodell direkt bewirkten (Moo-Young et al., 2009).

In der Literatur werden verschiedene Abläufe geschildert, auf welche Art und Weise die Induktion von regulatorischen T-Zellen erfolgen kann. Beispielsweise scheint die Notch-Signalgebung in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein. Notch-1 und seine Liganden wie z.B. Jagged-1 sind für die Differenzierung und Regulation von CD4⁺ T-Zellen mitverantwortlich. Wird die Notch-Signalgebung pharmakologisch mit γ -Sekretase Inhibitoren (GSI) inhibiert, wird dadurch die Induktion von regulatorischen T-Zellen unterbunden, wie Samon und Kollegen zeigen konnten (Samon et al., 2008). CD4⁺CD25⁻ exprimierten kein FoxP3 und zeigten keine Suppressivität, wenn sie zusätzlich zu TGF- β auch mit GSI inkubiert wurden (Samon et al., 2008). Zudem führte eine Überexpression von Jagged-1 in antigenpräsentierenden Zellen zu einer Konversion von Respondern zu iTreg, die in der Lage sind, T-Zellproliferation zu unterbinden (Vigouroux et al., 2003). Die Induktion von Treg kann auch über die Interaktion zwischen CD80 und CTLA-4 bewirkt werden. Wird CD86 auf APZ durch Antikörper oder Fusionsproteine blockiert, so kann CTLA-4 nicht mehr an CD86 binden und interagiert stattdessen mit CD80. T-Zellen werden auf diesem Wege zu einer hypoproliferativen Zellpopulation, die andere aktivierte T-Zellen in ihrer Proliferation inhibieren können (Perez et al., 2008).

1.2 Immunescapemechanismen beim duktalem Pankreasadenokarzinom

Die weitgehende Resistenz gegenüber bekannten Chemo- und Strahlentherapien ist bei duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) mit einer sehr schlechten Prognose verbunden, die weitere Forschungsanstrengungen zu diesem malignen Krankheitsbild erfordert. Neue immunologische Therapieansätze könnten zu einer besseren Therapierbarkeit führen, setzen aber eine genaue Kenntnis der immunologischen Situation bei PDAC voraus. Hinz und Mitarbeiter hatten diese unter anderem an den beiden PDAC-Zelllinien Colo357 und Panc89 untersucht (Hinz et al., 2007). Aus ihren Ergebnissen schlussfolgerten sie, dass PDAC-Zelllinien immunsuppressiv auf T-Zellen wirken, wodurch sie einer Bekämpfung durch das Immunsystem entgehen. Dieses wird offenbar durch ein „Mimikry“ der Treg Funktion ermöglicht. So zeigten alle getesteten PDAC-Zelllinien eine FoxP3 Expression. In Anwesenheit der Tumorzelllinien wurde die Proliferation der Responder nach TZR-Stimulation supprimiert, wozu ein direkter Zellkontakt der Tumorzellen mit den T-Zellen erforderlich war (Hinz et al., 2007). Wurde die FoxP3 Expression der PDAC-Zelllinien hingegen durch siRNA unterdrückt, so konnte die Inhibition der Responder Zellproliferation partiell wieder aufgehoben werden. Hinz und Kollegen führten dies auf einen direkten Effekt der Tumorzellen auf die Responder zurück. Eine Induktion von Treg aus Respondern, die eine Rolle bei der beobachteten Suppression spielt, konnte nicht gezeigt werden (Hinz et al., 2007).

1.3 $\gamma\delta$ T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killerzellen in der Tumorbilogie

Mit Hinblick auf die Entwicklung von Immuntherapien zur Behandlung von Tumorerkrankungen ist es sinnvoll, neben $\alpha\beta$ T-Lymphozyten auch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, B-Zellen und NK-Zellen zu betrachten, da alle drei Zellpopulationen über Funktionen verfügen, um Tumore *in vivo* zu bekämpfen.

1.3.1 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

$\gamma\delta$ T-Lymphozyten stellen einen kleinen Anteil der T-Lymphozyten im peripheren Blut dar und besitzen statt einer α - und β -Kette eine γ - und δ -Kette als TZR, die ebenfalls mit CD3 assoziiert sind. Der $\gamma\delta$ TZR erkennt grundsätzlich andere Antigene als der $\alpha\beta$ TZR. Dabei lassen sich $\gamma\delta$ T-Lymphozyten hinsichtlich des Rezeptoraufbaus überwiegend in V δ 1 und V δ 2 T-Zellen unterteilen (Holtmeier und Kabelitz, 2005). V γ 9/V δ 2 T-Zellen bilden die Mehrzahl aller $\gamma\delta$ T-Zellen mit einem Anteil von 50-70 %, das heißt, dass sie 0,5-7 % aller CD3⁺ Zellen im Blut ausmachen (Kunzmann et al., 2009). Sie erkennen bakterielle Phosphoantigene, Alkylamine und indirekt auch synthetische Aminobisphosphonate (Kunzmann et al., 2000; Holtmeier und Kabelitz, 2005; Kabelitz et al., 2007). Im Unterschied dazu erkennen V δ 1 T-Zellen stressinduzierte, MHC assoziierte Moleküle wie das „major histocompatibility antigen related chain“ (MIC) A (Groh et al., 1999). *In vitro* kann die Stimulation genutzt werden, um

eine Proliferation der Zellen auszulösen, indem den $\gamma\delta$ T-Lymphozyten statt den natürlich vorkommenden Phosphoantigenen synthetisch hergestellte Pyrophosphate wie z.B. Bromohydrinpyrophosphat (BrHPP) präsentiert werden (Espinosa et al., 2001). $\gamma\delta$ T-Zellen sind neben anderen Immunzellen wie z.B. NK-Zellen in der Lage eine Vielzahl an unterschiedlichen Tumorentitäten zu lysieren (Wrobel et al., 2007). Jüngste Veröffentlichungen zeigen, dass $\gamma\delta^+$ T-Lymphozyten eine immer größere Rolle in der T-Zell-basierten Immuntherapie spielen (Braza & Klein, 2013; Dieli et al., 2007; Meraviglia et al., 2010; Kabelitz et al., 2013). Im Unterschied zu konventionellen $\alpha\beta$ T-Lymphozyten erkennen $V\gamma9V\delta2$ -exprimierende $\gamma\delta$ T-Lymphozyten HLA-unabhängig Nicht-Peptide und können Antigene erkennen und präsentieren (Himoudi et al., 2012; Fournié et al., 2013). Da sie hierbei nur minimale Reaktivität gegenüber nicht entarteten Zellen aufweisen, wie Kabelitz und Mitarbeiter berichteten, könnten sie ggf. in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika Anwendung finden (Kabelitz et al., 2007). Inwiefern Treg sowie andere immunsuppressive Zellen im Tumor-Mikromilieu oder Tumorresistenz-Mechanismen selbst eine effektive Immunabwehr und somit eine $\gamma\delta$ T-Zellabwehr inhibieren können, ist Bestandteil laufender Untersuchungen der Arbeitsgruppe Wesch/Kabelitz. Andere Arbeitsgruppen konnten einen negativen Einfluss von Treg aus dem peripheren Blut bzw. aus mesenchymalen Stammzellen auf die Effektorfunktion von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten zeigen (Kunzmann et al., 2009; Merati et al., 2001). Neuere Publikationen der Arbeitsgruppe Wesch/Kabelitz zeigen, dass die zytotoxische Aktivität von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten durch den Einsatz neu entwickelter bispezifischer Antikörper (*Bi-specific T-cell engagers*) verbessert werden kann (Oberg et al., 2014).

1.3.2 B-Zellen

B-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems und weisen im Vergleich zu T-Lymphozyten große funktionelle Unterschiede auf. Im Gegensatz zu T-Zellen erkennen sie Antigene mit dem B-Zellrezeptor, der einem membrangebundenem IgM entspricht, unabhängig von der Präsentation über MHC-Moleküle. Im aktivierten Zustand sind sie in der Lage ihren Rezeptor in löslicher Form als Antikörper (Ak) bzw. Immunglobulin (Ig) freizusetzen. Therapeutische Ak befinden sich bereits in der klinischen Anwendung bei der Behandlung von malignen Erkrankungen wie beispielsweise dem Mammakarzinom. Dort können im Falle der Überexpression von „human epidermal growth factor receptor“ (HER2) monoklonale Ak wie Trastuzumab gegen HER2 genutzt werden (Slamon et al. 2001). Darüber hinaus unterstützen die B-Lymphozyten die T-Zellimmunantwort durch die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, ermöglichen „tertiary lymphoid structures“ (TLSs) und dienen als APZ, wie dies bei Autoimmunerkrankungen und nach Organtransplantationen beobachtet wurde (Nelson, 2010). Letztlich geht das gehäufte Vorkommen von B-Zellen in menschlichen Tumoren mit einer günstigeren Prognose einher (Nelson, 2010).

1.3.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören dem angeborenen Immunsystem an, da sie nur invariante Rezeptoren besitzen, die entweder aktivierend oder inhibierend auf die NK-Zellen wirken. Die aktivierenden Rezeptoren sind sie in der Lage Oberflächenmoleküle auf virusinfizierten oder maligne entarteten Zellen zu erkennen, was bei den NK-Zellen wiederum zur Ausschüttung von zytotoxischen Granula führt. Diese Ausschüttung leitet ihrerseits den programmierten Zelltod in der Zielzelle ein. Unter anderem bindet der aktivierende NKG2D Rezeptor der NK-Zelle an stressinduzierte Moleküle wie MIC A, die auf Tumorzellen exprimiert werden (Chitadze et al., 2013). NK-Zellen exprimieren weiterhin auf ihrer Zelloberfläche Fc γ -Rezeptoren mit denen sie den Fc-Teil von Ak binden. Binden Ak an den spezifischen Liganden auf der Zielzelle, so wird die Ak markierte Zelle durch NK-Zellen abgetötet, was die „antibody dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC) auslöst. Inhibierende Moleküle sind beispielsweise die MHC-Klasse-I-Moleküle, die eine Aktivierung der NK-Zelle, und damit die Ausschüttung von zytotoxischer Granula, verhindern (Murphy et al., 2009c). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen in der Lage sind sowohl Metastasen als auch das lokale Tumorstadium unter Kontrolle zu bringen. Die Freisetzung von IFN- γ durch NK-Zellen stellte sich in diesem Zusammenhang als ebenfalls äußerst wichtig heraus, da das immunstimulatorische Zytokin IFN- γ durch mehrere Mechanismen zytotoxisch auf einen Tumor einwirkt. So inhibiert es die Zellproliferation und Angiogenese, fördert die Apoptose, stimuliert das adaptive Immunsystem und steigert Antigenprozessierung und –präsentation (Levy et al., 2011).

1.4 Immunsystem und Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist eine der durch Krebs verursachten Haupttodesursachen bei Frauen. Bei über 70% der Patientinnen, die selbst mit Chemotherapeutika wie Paclitaxel und auf Platin basierenden Substanzen behandelt wurden, erweist sich die Krankheit als therapierefraktär (Gavalas et al., 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei dem metastasierten Ovarialkarzinom liegt heutzutage immer noch bei nur 30%, so dass weiterhin nach wirkungsvolleren Therapiemöglichkeiten gesucht wird, die als Erweiterung der bisher zur Verfügung stehenden chemotherapeutischen und chirurgischen Ansätze dienen könnten (Cubillos-Ruiz et al., 2010). Man nimmt an, dass die schlechte Prognose von Ovarialkarzinomen unter anderem auf die lokale Immunsuppression wie auch auf eine Immunescapefunktion zurückzuführen ist (Santin et al., 2004). Die Progression des Tumors in die Peritonealhöhle und das regelmäßige Auftreten von Aszites prädestiniert diesen Tumor als Ausgangspunkt zur Erforschung verschiedener Immunzellpopulationen. Sowohl Aszites als auch peritoneale Metastasen können leicht durch Parazentese, Laparoskopie oder auch durch die offene Operation gewonnen werden. Die dabei anfallenden Zellen können dann mit zahlreichen Methoden

untersucht werden, wie beispielsweise mit der Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie (Gavalas et al., 2010).

1.5 Aszites bei Malignomen

Aszites ist eine pathologische Vermehrung der Peritonealflüssigkeit. Anhand des spezifischen Gewichts, des Eiweißgehalts und des Serum/Aszites-Albumin-Gradienten kann zwischen einem Transsudat und Exsudat unterschieden werden. Eine peritoneale Flüssigkeitsansammlung kann hinsichtlich der zugrunde liegenden Erkrankung in einen portalen, kardialen, entzündlichen, pankreatogenen oder hypoalbuminämischen Aszites unterschieden werden. In bis zu 10 % der Fälle handelt es sich um malignen Aszites, für den der Nachweis von Tumorzellen charakteristisch ist (Herold, 2010; Tamsma et al., 2001). Der Hauptgrund für die Entstehung des malignen Aszites stellt die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität der Tumervaskularisation dar (Adam und Adam, 2004). Aszites führt zu einem erhöhten intraabdominalen Druck, der wiederum Schmerzen, Anorexia, Dyspnoe, verminderte Mobilität und pseudoobstruktive Symptome auslösen kann. Außer in Mamma- und Ovarialkarzinomen ist Aszites immer ein Symptom des Endstadiums einer Tumorerkrankung und ist ein Indikator für eine schlechte Prognose (Adam und Adam, 2004). Bei Ovarialkarzinomen ist in mindestens einem Drittel der Fälle maligner Aszites nachweisbar. Der zelluläre Anteil des malignen Aszites besteht hier hauptsächlich aus Lymphozyten, Mesothelzellen und Ovarialkarzinomzellen. Letztere könnten für die bei diesem Krankheitsbild häufig beobachtete Metastasenbildung im Bauchraum mitverantwortlich sein (Puiffe et al., 2007).

Da bei der symptomatischen Therapie von Aszites die Drainage der Peritonealflüssigkeit angewendet wird, bietet dies eine gute Möglichkeit an Forschungsmaterial zu gelangen, was dieser Arbeit zugute kam.

2 Fragestellung

In einer Kooperation zwischen dem Institut für Immunologie und der Sektion für Molekulare Onkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) konnte ein möglicher Immunescapemechanismus anhand von PDAC-Zelllinien *in vitro* nachgestellt werden (Hinz et al., 2007). Sie beobachteten, dass CD4⁺ T-Zellen nach TZR-Stimulation in der Gegenwart von FoxP3⁺ PDAC-Zelllinien nicht mehr proliferieren konnten, wohingegen physiologischerweise die klonale Expansion eine Voraussetzung für eine wirkungsvolle Immunantwort ist (Hinz et al., 2007).

Die vorliegende Arbeit baut auf den Ergebnissen von Hinz und Mitarbeitern auf und untersucht den bisher nicht geklärten Sachverhalt, ob die Tumorzellen die Inhibition der T-Lymphozyten direkt hervorrufen oder ob dafür die Induktion von regulatorischen T-Zellen erforderlich ist.

Des Weiteren konzentriert sich die Arbeit auf Ovarial- und Mammakarzinome, wobei die schlechte Prognose von Ovarialkarzinomen wie auch der Pankreaskarzinome unter anderem mit einer lokalen Immunsuppression begründet wird. Die Progression der Ovarialkarzinome in die Peritonealhöhle, die mit häufigem Auftreten von Aszites verbunden ist, prädestiniert diese Tumore als Ausgangspunkt zur Erforschung verschiedener Immunzellpopulationen wie NK-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und B-Zellen im Aszites. Daraus sollen Rückschlüsse auf die immunologische Situation der Tumorerkrankung gezogen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Medien, Medienzusätze und Puffer

RPMI Zellkulturmedium (KM) mit 5% bzw. 10% Fötale Kälberserum (FKS)

RPMI-1640 Fertigmedium mit	500 ml	Life Technologies, Karlsruhe
HEPES	25 mM	
L-Glutamin	2 mM	
Streptomycin	100 µg/ml	Biochrom AG, Berlin
Penicillin	100 U/ml	Biochrom AG, Berlin
FKS	25 ml bzw. 50 ml/500 ml	Life Technologies, Karlsruhe
(für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)		

IL-2	50-100 IU	Novartis, Nürnberg
------	-----------	--------------------

x-vivo-15 (Serum-freies Medium)		Lonza, Köln
---------------------------------	--	-------------

Einfriermedium

Zellkulturmedium mit 20% FKS

DMSO (Dimethylsulfoxid)	10% (v/v)	Merck, Darmstadt
-------------------------	-----------	------------------

Dynal Puffer

pH 7,2 PBS (sulfat buffer saline)

BSA (bovine serum albumin)	0,1 % (w/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
----------------------------	-------------	----------------------------

Fixations/Permeabilisations (Fix/Perm) Puffer

Fix/Perm Concentrate	25%	eBioscience, Frankfurt/Main
----------------------	-----	-----------------------------

Fix/Perm Diluent	75%	eBioscience, Frankfurt/Main
------------------	-----	-----------------------------

“Magnetic activated cell sorting” (MACS)-Waschpuffer

PBS pH 7,2		CellConcepts, Umkirch
BSA	0,5% (w/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	2 mM	Merck, Darmstadt

Waschpuffer für Immunfluoreszenz

BSA	1% (w/v)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
NaN ₃ (Natriumacid)	0,1% (w/v)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
PBS		CellConcepts, Umkirch

Fixierpuffer für Immunfluoreszenz

Paraformaldehyd	1% (w/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS		CellConcepts, Umkirch

Eosin Lösung für Zellzahlbestimmung (500 ml)

Eosin	2 g	Serva Electrophoresis, Heidelberg
NaN ₃	0,25 g	Serva Electrophoresis, Heidelberg
NaCl Lösung	0,9%ig 450 ml	Merck, Darmstadt
FKS	50 ml	Life Technologies, Karlsruhe

Ficoll Trennlösung

Biocoll Separationslösung	1,077 g/ml	Biochrom AG, Berlin
---------------------------	------------	---------------------

Trypsin Fertiglösung (10x)

Trypsin	0,5%	Biochrom AG, Berlin
EDTA	0,2%	Merck, Darmstadt

Accutase Fertiglösung (1x)

		PAA, Pasching, Österreich
BrHPP	300 nM	Innate Pharma, Marseilles, Frankreich
rIL-2 (rekombinates Interleukin 2)	50 IE/ml	Novartis, Basel

Vitalfarbstoffe

CFDA-SE

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

DDAO-SE

Life Technologies, Karlsruhe

3.1.2 Zellmaterialien**3.1.2.1 Buffy coats (Leukozytenkonzentrate)**

„Buffy coats“ entstehen durch die Abzentrifugation einer Vollblutspende und wurden von dem Institut für Transfusionmedizin des UKSH Kiel/Lübeck bezogen. Die Verwendung in der Forschung wurde von der Ethikkommission unter der Nummer D405/10 genehmigt und die Spender wurden über den Verbleib informiert. Ein buffy coat von 50 ml stellte den Restbestand einer 500 ml Vollblutspende dar, der Erythrozyten und Plasma schon überwiegend entzogen worden war.

3.1.2.2 Aszites Spender

Spendernummer	Karzinomerkkrankung	Art des Patientenmaterials
K1289	Invasives duktales Mammakarzinom	1000 ml Aszites
K1290	Ovarialkarzinom	500 ml Aszites
K1291	Adenokarzinom des Ovars	6000 ml Aszites
K1292	Serös papilläres Ovarialkarzinom	1800 ml Aszites
1293	Exulzeriertes Mammakarzinom	400 ml Pleuraerguss
1294	Ovarialkarzinom	780 ml Aszites

Der Aszites wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. Mundhenke, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am UKSH, Campus Kiel, zur Verfügung gestellt.

3.1.2.3 Tumorzelllinien

Verwendete Tumorzellen	Spezifität	Herkunft/Referenz
MeWo1	Malignes Melanom Lymphknotenmetastase	M. Zöller, Heidelberg Carey et al., 1976
PT45P1	Duktales Pankreaskarzinom Primärtumor	H. Kalthoff über F. Gieseler, Kiel Moore et al., 2001
HCC-15	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	F. Gieseler, Kiel Virmani et al., 1998
Daudi	Humanes Burkitt Lymphom	ATCC Klein et al., 1968
PancTu-1	Duktales Pankreasadenokarzinom Primärtumor	H. Kalthoff, Kiel Moore et al., 2001
Colo357	Duktales Pankreaskarzinom Lymphknotenmetastase	H. Kalthoff, Kiel Morgan et al., 1980
Panc89	Duktales Pankreasadenokarzinom	H. Kalthoff, Kiel
PCI	Hypopharynx Karzinom	B. Wollenberg, Lübeck Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, USA
K1290	Ovarialkarzinom	Charakterisierung der Zelllinie durch das Institut für Hämatopathologie Hamburg

Alle Tumorzelllinien wurden in KM mit 10% FKS kultiviert.

Die duktales Pankreasadenokarzinom-Zelllinien, die freundlicherweise von Prof. H. Kalthoff (Molekulare Onkologie, UKSH, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt wurden, sind

immunhistochemisch und anhand ihres Mutationstatus charakterisiert (Sipsos et al., 2003). Zudem wird der Genotyp dieser Linien regelmäßig mit Hilfe der „Short Tandem Repeat Analysis“ überprüft.

3.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

3.1.3.1 Spezifische Antikörper

Antikörper	Klon	Konjugat	Spezies	Bezugsquelle
anti-human Jagged-1	188331	Biotin	Maus-IgG _{2b}	R&D Systems
anti-human Notch-1	A6	unkonjugiert	Maus-IgG _{2b}	Lab Vision Corporation
anti-human TZR $\alpha\beta$	BMA031	-FITC -Biotin	Maus-IgG _{2b}	Life Technologies
anti-human TZR $\gamma\delta$	11F2	-FITC -PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human V δ 1	TS8.2	-FITC	Maus-IgG ₁	Endogen
anti-human V δ 2	Immu389	-FITC	Maus-IgG ₁	Immunotech
anti-human CD3	SK7	-FITC -PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD4	SK3	-FITC -PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD4	RPA-T4	-FITC	Mouse IgG _{1, k}	Natutec
anti-human CD8	OKT8	unkonjugiert	Maus-IgG ₁	ATCC
anti-human CD14	MpP9	-FITC -PE	Maus-IgG _{2b}	BD Biosciences
anti-human CD16 (Leu-11c)	Leu-11c	-PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD19	4G7	-FITC	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD25	2A3	-FITC -PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD25	BC96	-APC	Maus IgG _{1, k}	eBioscience
anti-FoxP3	PCH101	-PE	Ratten IgG _{2a}	eBioscience
anti-human CD28	L293	-PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD40	BE-1	-Biotin	Maus-IgG ₁	Ancell
anti-human CD56	MY31	-FITC	Maus-IgG _{2b}	BD Biosciences
anti-human CD45 RA	L48	-FITC	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD45 RO	UCHL-1	-PE	Maus-IgG _{2a}	BD Biosciences
anti-human CD80	L307.4	-PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-human CD86	2331(FUN1)	-PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences

3.1.3.2 Isotypkontrollen

Antikörper	Klon	Konjugat	Spezies	Bezugsquelle
anti-Maus IgG ₁	X40	-PE	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-Maus IgG ₁	X40	-FITC	Maus-IgG ₁	BD Biosciences
anti-Maus IgG _{2a}	X39	-FITC	Maus-IgG _{2a}	BD Biosciences
anti-Maus IgG _{2a}	X39	-PE	Maus-IgG _{2a}	BD Biosciences
anti-Ratte IgG _{2a}	G155-228	-FITC	Ratte-IgG _{2a}	eBiosciences
anti-Maus IgM	G155-228	-FITC	Maus-IgM	BD Biosciences

3.1.3.3 Sekundär-Reagentien

Reagenz	Konjugat	Bezugsquelle
Streptavidin	-PE	BD Biosciences
goat anti-mouse	-PE	Caltag (Life Technologies)

3.1.4 Test-Kits

CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Dynal CD4 ⁺ CD25 ⁺ T Cell Kit	Life Technologies, Karlsruhe
Dynabeads CD25	Life Technologies, Karlsruhe
CD25 MicroBeads II	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Beads CD3/CD28)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Dynabeads Human Treg Expander (Dynabeads CD3/CD28)	Life Technologies, Karlsruhe
Human Regulatory T Cell Staining Kit	eBioscience, Frankfurt am Main

3.1.5 Membranen und Filter

Sterilfilter Steritop 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
MACS Pre-Separationsfilter	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Färbeplatten 96-Vertiefung (Spitzboden)	nerbe plus, Winsen/Luhe
---	-------------------------

Falcon-Röhrchen 2054	BD Biosciences, Heidelberg
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen (Einfrierröhrchen)	Nunc, Wiesbaden
Latexhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
MACS-LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MACS-LD-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Pasteurpipetten ungestopft	Assistent, Sondheim
Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50ml)	Greiner BioOne, Frickenhausen
Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner BioOne, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 50 ml	Greiner BioOne, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 250 ml	Greiner BioOne, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 650 ml	Greiner BioOne, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6- und 24-Vertiefungen)	Greiner BioOne, Frickenhausen
Zellkulturplatten 96-Vertiefungen (Rund-; Flachboden)	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitze (10µl; 20µl; 100µl; 200µl; 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.7 Geräte

Biofuge 15R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Bunsenbrenner	Schuett-biotec, Göttingen
CO ₂ -Begasungsbrutschrank Typ Heracell 240	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Durchflußzytometer (FACSCalibur) mit CellQuestPro II Software	BD Biosciences, Heidelberg
Dynal MPC-1	Life Technologies, Karlsruhe
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Magnet-aktivierter Zellsorter	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
Pipetten (Ein- und 12-Kanal)	Eppendorf, Hamburg
Rollenmischer RM5	Assistent, Sondheim

Rotator MACSmix	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Rüttler	IKA, Staufen
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Wasserbad	GFL, Großburgwedel

3.2 Methode

3.2.1 Gewinnung von mononukleären Zellen aus einem buffy coat

Mit Hilfe eines Dichtegradienten lassen sich aus einem Lymphozytenkonzentrat „buffy coat“ oder aus Vollblut mononukleäre Zellen (MNZ) isolieren. Werden die MNZ, wie in diesen Abschnitt beschrieben, aus dem peripheren Blut isoliert, so spricht man auch von „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMC). Dazu wurde der buffy coat zuerst mit PBS 1:2 verdünnt und anschließend wurden davon 35 ml vorsichtig über 15 ml Ficoll geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 „rounds per minute“ (rpm) (Multifuge 3S-R) für 20 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur (RT). Zellen, die eine höhere Dichte wie Ficoll haben, wie z.B. Erythrozyten, tote Zellen oder Granulozyten, wanderten durch das Ficoll und sedimentierten am Boden des Röhrchens. Die PBMC, die sich aus Lymphozyten und Monozyten zusammensetzen, sammelten sich mit ihrer geringeren Dichte hingegen an der Phasengrenze zum Ficoll und bildeten den Interphasering, der mit einer 10 ml Pipette abgezogen wurde. Zum Entfernen vom zelltoxischen Ficoll und verbliebenen Thrombozyten wurden die PBMC einmal für 5 min bei 1600 rpm und zweimal für 10 min bei 1000 rpm (Multifuge 3S-R) gewaschen. Hierbei entstandene Überstände wurden verworfen, das Zellpelett in KM 10% FKS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.5).

3.2.2 Aufarbeitung von Aszites

Aszites wurde von der Klinik für Gynäkologie des UKSH, Campus Kiel, bereitgestellt und stammte von Patienten mit Ovarial- oder Mammakarzinomen. Zur Aufarbeitung wurde der Aszites auf 50 ml Röhrchen verteilt und für 10 min bei 1600 rpm (Multifuge 3S-R) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, auf 15 und 50 ml Röhrchen verteilt und zum überwiegenden Teil weggefroren. 2×10^7 Zellen wurden zur Tumorzelliniengenerierung verwendet und die verbliebenen Zellen wurden über eine Ficoll-Dichtegradienten-

Zentrifugation aufgearbeitet. Die daraus gewonnenen MNZ wurden anschließend weggefroren oder standen nun für weitere Anwendungen zur Verfügung.

3.2.3 Generierung von Tumorzelllinien

Tumorzellen haben gegenüber normalen Körperzellen einen Wachstumsvorteil, so dass nach einer Kultur über Monate reine Tumorzelllinien entstanden. Dazu wurden 2×10^7 Aszites-Zellen in einer 250 ml Kulturflasche mit KM 10% FKS bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden nach mikroskopischer Beurteilung der Zelldichte alle 3-5 Tage mit Trypsin Fertiglösung abgelöst. Nach einmaliger Zentrifugation wurde die Hälfte der Zellen wieder erneut in der Flasche ausgesät und in KM 10% FKS mit 10% (v/v) autologem Aszites-Überstand kultiviert. Die erste zytopathologische Beurteilung der Zellen erfolgte nach ca. zwei Monaten Kultur durch das Institut für Hämatopathologie, Hamburg.

3.2.4 Tumorzellkultur

Die bereits etablierten Tumorzelllinien wurden in einer 250 ml Kulturflasche mit KM 10% FKS bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Die adhärent wachsenden Tumorzellen wurden nach mikroskopischer Beurteilung der Zelldichte alle 2-3 Tage mit Trypsin Fertiglösung abgelöst. Trypsin spaltet die Aminosäuren Lysin und Arginin, die wichtige Bestandteile der Zelladhäsionsmoleküle sind. Da Mg_2^+/Ca_2^+ Trypsin inhibieren, wurde zur verstärkten Wirkung von Trypsin EDTA eingesetzt, das als Chelator Mg_2^+/Ca_2^+ binden kann. Nach einmaliger Zentrifugation wurde ein Viertel bis ein Achtel der Zellen wieder in der Flasche ausgesät und mit KM 10% FKS kultiviert.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Membranläsionen toter Zellen ermöglichen dem Farbstoff Eosin in die Zellen zu diffundieren und sie so als tot zu markieren und von lebenden Zellen zu unterscheiden. Zu diesem Zweck wurde eine Eosinlösung mit der Zellsuspension vermischt und in eine Neubauerkammer gegeben. In dem bekannten Kammervolumen konnte die Zellzahl bestimmt werden, wozu zwei Eckquadranten ausgezählt wurden. Zur Bestimmung der Zellkonzentration pro ml wurde mit dem Kammerfaktor 10^4 und der jeweiligen Verdünnung der Zellen multipliziert und durch die Anzahl der ausgezählten Eckquadranten dividiert.

3.2.6 Kryokonservierung

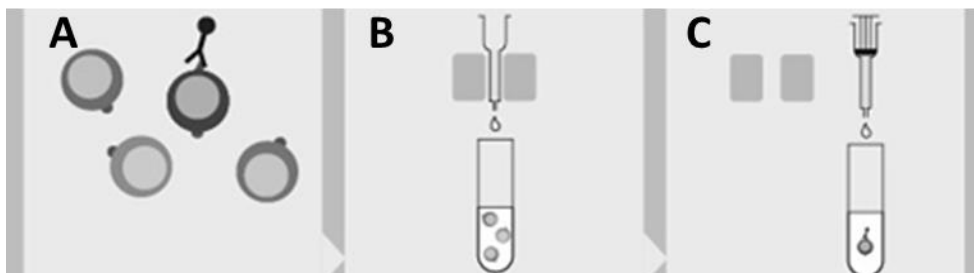
Die Kryokonservierung ermöglicht die Verwahrung von Zellen über einen fast unbegrenzten Zeitraum. Beim Einfrieren bilden sich normalerweise intrazellulär Eiskristalle, die die Zellmembran zerstören. DMSO, das Bestandteil des Einfriermediums ist, verhindert die Eiskristallbildung. Dazu wurden Zellen für 5 min bei 1300 rpm (Multifuge 3S-R) zentrifugiert, in Einfriermedium aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Die maximale Zellzahl pro ml Einfriermedium bzw. Kryoröhrchen betrug bei T-Zellen 30×10^6 bzw. 5×10^6 bei Tumorzellen.

Die Zellen wurden zunächst für 20 min bei -20 °C gelagert. Hinterher erfolgte eine weitere Zwischenlagerung bei -70 °C für mindestens einen Tag und maximal sieben Tage. Danach wurden die Zellen bei ca. -160 °C in der Stickstoff-Gasphase endgelagert.

Zu einem späteren Zeitpunkt konnten die Zellen wieder aufgetaut werden. Das Auftauen fand in einem 37 °C warmen Wasserbad für 1 min statt. Die zügige Zugabe von 10 ml KM 10% FKS zu den Zellen und die zwei folgenden Waschschrte für je 5 min bei 1300 rpm (Multifuge 3S-R) mit 10 ml KM 10% FKS gewährleisteten die Elimination von DMSO, das unter Zellkulturbedingungen zelltoxisch wirkt. Die Zellzahl und Vitalität wurde mittels Eosinfärbung bestimmt (siehe 3.2.5).

3.2.7 Magnetische Zellisolierung

Zur magnetischen Zellisolierung wurden sowohl das Dynal als auch das Miltenyi System verwendet. Die zu isolierenden Zellen wurden mit Ak, die an paramagnetische Moleküle (Beads) gebunden waren, inkubiert (Abb. 1A). Die markierte Zellsuspension wurde anschließend einem magnetischen Feld ausgesetzt. Wurde die Isolierung mit Hilfe des „magnetic activated cellsorter“ von Miltenyi durchgeführt, verblieben die Zellen, die mit Ak markiert worden waren, im magnetischen Feld einer Säule, während die unmarkierten Zellen durchfließen konnten (negative Selektion) (Abb. 1B). In einem weiteren Schritt konnten die markierten Zellen aus der Säule durch einen Stempel eluiert werden (positive Selektion) (Abb. 1C). Die hindurchgeflossenen Zellen wurden als negativ und die im magnetischen Feld verbliebenen als positiv selektioniert bezeichnet.



Quelle: www.miltenyibiotec.com abgerufen am 3.7.2011

Abbildung 1: Magnetische Zellisolierung nach Miltenyi

(A) Die gewünschten oder unerwünschten Zellen wurden mit spezifischen Ak markiert, die mit magnetischen Nanopartikeln gekoppelt waren. (B) Als zweiter Schritt durchliefen die Zellen ein magnetisches Feld, in dem die markierten Zellen verblieben und das die unmarkierten Zellen durchlaufen konnten (negative Selektion). (C) Sobald die markierten Zellen nicht mehr dem magnetischen Feld ausgesetzt waren, konnten sie unter Zuhilfenahme eines Stempels eluiert werden (positive Selektion).

Bei der magnetischen Isolierung mittels Dynabeads wurde die Zellsuspension in einem ersten Schritt mit Dynabeads markiert. Wurde die Zellsuspension einem Magnetfeld ausgesetzt, sammelten sich die markierten Zellen an der Röhrenwand, während die unmarkierten Zellen

nach wie vor in der Zellsuspension gelöst waren. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Pipette abgezogen und die markierten Zellen verblieben im Röhrchen.

Zunächst wurden aus PBMC CD4⁺ T-Zellen negativ isoliert. Dazu wurden alle unerwünschten Zellen markiert und eliminiert. Für die Isolierung wurde das „CD4⁺ T Cell Isolation Kit II“ der Firma Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland) gemäß der Anleitung eingesetzt. Die angegebenen Mengen an Waschpuffer und Ak beziehen sich auf 1 x10⁸ Zellen. 1 x10⁸ PBMC wurden in 400 µl Waschpuffer aufgenommen, mit 50 µl Biotin-Ak Cocktail versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Biotin-Ak Cocktail war gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glycophorin A gerichtet. Im Anschluss wurden 300 µl Waschpuffer und 100 µl Anti-Biotin Microbeads zu den PBMC gegeben und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Inkubation wurde durch 10 ml MACS Waschpuffer und anschließender Zentrifugation für 7 Minuten bei 1300 rpm (Multifuge 3S-R) bei 4 °C beendet. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 500 µl MACS Waschpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde über einen Präseparationsfilter auf eine MACS LS Säule, die im Magnetfeld eines MACS Separators integriert war, gegeben. Über eine MACS LS Säule durften maximal 2 x10⁸ PBMC gegeben werden. Die Säule wurde dreimal mit jeweils 1 ml MACS Waschpuffer gespült. Das Eluat enthielt die CD4⁺ Zellen.

3.2.8 Isolierung von CD4⁺CD25⁺ Treg Zellen und CD4⁺CD25⁻ Respondern

Aus den CD4⁺ T-Zellen wurden die Treg positiv über das Oberflächenantigen CD25 mit CD25 Dynabeads isoliert.

Es wurden 15 x10⁷ negativ isolierte CD4⁺ T-Zellen mit 100 µl CD25 Dynabeads versetzt und auf einem Rotator 25 min bei 4 °C in einem Röhrchen inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 2 min an einem Magneten fixiert, um die mit Dynabeads markierten Zellen zurückzuhalten. Die vom Magneten unbeeinflusste restliche Zellsuspension enthielt die nicht gebundenen CD4⁺CD25⁻ Zellen (Responder, siehe auch Glossar). Die vom Magneten gebundenen CD4⁺CD25⁺ Treg Zellen wurden außerhalb des Magneten mit 15 ml Dynalpuffer resuspendiert und wiederum für 2 min dem Magnetfeld ausgesetzt um weitere kontaminierende CD4⁺CD25⁻ Responder zu entfernen. Die unmarkierten Responder wurden ebenfalls ein zweites Mal dem Magnetfeld ausgesetzt, um entsprechend kontaminierende CD25⁺ Treg zu entfernen. Die gereinigten Responder wurden nach einer Zentrifugation bei 1300 rpm (Multifuge 3S-R) für 7 min im serumfreien Medium x-vivo-15 aufgenommen. In einem weiteren Schritt wurden die CD25 Dynabeads von den CD4⁺CD25⁺ Treg Zellen entfernt, wozu der Treg Zellsuspension pro 50 µl verwendeter CD25 Dynabeads 20 µl DetachaBead Ak hinzugesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde für 55 min bei RT auf einem Rotator gemischt. DetachaBead Ak erkannten die antigenbindende Region der CD25 Dynabeads und verdrängten die Dynabeads CD25 auf diese Weise von den Treg. Die Zellsuspension wurde anschließend an einen Magneten gehalten, um die Dynabeads von den Zellen zu trennen. Der

Überstand, in dem die Treg waren, wurde mit einer Pipette abgezogen. Die so gewonnenen Treg wurden in einem mit FKS beschichteten 15 ml Röhrchen gesammelt, mit KM 5% FKS bei 1300 rpm (Multifuge 3S-R) für 7 min gewaschen und anschließend in x-vivo-15 Medium aufgenommen. Auf diese Weise wurden Responder und Treg gleichzeitig mit hoher Reinheit aufgearbeitet. Alternativ wurden CD4⁺CD25⁻ Responder durch Depletion der Treg unter Verwendung der CD25 MicroBeads von Miltenyi gewonnen. Die angegebenen Mengen an benutzten Ak und Puffern beziehen sich auf 1 x10⁷ CD4⁺ Zellen und wurden gemäß dem Protokoll verwendet. Zu den negativ isolierten CD4⁺ Zellen wurde 80 µl MACS Puffer und 20 µl CD25 MicroBeads gegeben und bei 4 °C für 15 min inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml MACS Puffer bei 1300 rpm (Multifuge 3S-R) für 10 min. Das Zellpellet wurde anschließend in 500 µl MACS Puffer resuspendiert und über eine LD Säule gegeben, die an einen Magneten gekoppelt war. In der Säule verblieben die an die CD25 MicroBeads gebundenen CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen, während die CD4⁺CD25⁻ Responder das Eluat bildeten und in einem Röhrchen aufgefangen wurden. Die Responder wurden nach zweimaligem Waschen in x-vivo-15 Medium aufgenommen.

3.2.9 T-Zellstimulation

Für die T-Zellaktivierung wurden anti-CD3/anti-CD28 gekoppelte Beads, die *in vitro* einen TZR-Stimulus und Kostimulus einer APZ imitieren, verwendet (Trickett und Kwan, 2003).

Dynabeads CD3/CD28 kamen bei der Responder Stimulation in der Tumorzellkokultur zur Anwendung (siehe Kapitel 3.2.12). Dynabeads sind superparamagnetische polystyrene Beads, die mit monoklonalen Ak gegen die Zelloberflächenantigene CD3 und CD28 kovalent gekoppelt sind und aus dem „Dynabeads Human Treg Expander Kit“ (Life Technologies, Karlsruhe) stammten. Vor Gebrauch mussten die Dynabeads gewaschen werden. Dazu wurden 1,6 x10⁶ Dynabeads CD3/CD28 in 300 µl x-vivo-15 Medium aufgenommen, an einen Magneten gehalten und der Überstand mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Die gewaschenen Dynabeads CD3/CD28 konnten als TZR-Stimulus für Responder in der Tumorzellkokultur verwendet werden.

Insbesondere für den Suppressionstest wurden Miltenyi anti-Biotin MACSiBead aus dem „T Cell Activation/Expansion Kit“ (Miltenyi Biotech) benutzt, da diese individuell mit biotinylierten Ak gegen CD3 und CD28 gekoppelt werden konnten. Die MACSiBeads wurden vor Gebrauch gemäß dem Protokoll des Miltenyi „T Cell Activation/Expansion Kit“ mit biotinylierten Ak gegen CD3 und CD28 besetzt, bevor die CD3/CD28 MACSiBeads im Suppressionansatz verwendet werden konnten (siehe Kapitel 3.2.13). Zur Generierung von 1 x10⁷ CD3/CD28 MACSiBeads wurden 10 µl anti-CD3-Biotin (10 µg/ml Beads), 10 µl anti-CD28-Biotin (10 µg/ml Beads), 50 µl anti-Biotin MACSiBead Partikel und 30 µl PBS in ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben und für 2 Stunden auf einem Rollenmischer bei 4 °C inkubiert. Anschließend konnten die anti-

CD3/anti-CD28 gekoppelten MACSiBeads, ohne gewaschen zu werden, in dem Suppressionsansatz eingesetzt werden.

3.2.10 Etablierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien

Für die Etablierung von $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zelllinien wurden PBMC selektiv mit dem Phosphoantigen Bromohydrin Pyrophosphat (BrHPP, 200 nM; Innate Pharma, Marseille) in Anwesenheit von rekombinantem IL-2 (rIL-2, 50 IU/ml; Novartis, Basel) in KM 10% FKS stimuliert. Diese Primärkultur wurde 14 Tage nach selektiver Expansion von $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zellen in zwei Wochenabständen mit dem Antigen BrHPP oder Phytohämagglutinin (PHA) in Anwesenheit bestrahlter PBMC und Epstein-Barr transformierten B-Zellen als Fütterzellen und mit rIL-2 restimuliert. Wenn nötig wurden verbleibende nicht $\gamma\delta$ T-Zellen wie $CD4^+$ - oder $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen oder $CD56^+$ NK-Zellen mit Hilfe der MACS-Technologie (Miltenyi Biotec) depletiert. Durch Restimulation mit Fütterzellen und dem Mitogen PHA wurden die $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zellen in rIL-2-haltigem Kulturmedium expandiert. Tote Zellen wurden 3-5 Tagen nach Restimulation durch Dichtegradientenzentrifugation entfernt. Zehn Tage nach Stimulation wurden die $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zelllinien durchflußzytometrisch mit anti-CD3-PE und anti-TZR $\gamma\delta$ -FITC auf ihre Reinheit hin untersucht.

3.2.11 Durchflußzytometrische Messungen

Durchflußzytometrische Messungen können Rückschlüsse auf die Größe, die intrazelluläre Struktur und über zelluläre Makromoleküle einer Zelle geben. Hierfür wurden die Zellen einem laminaren Flüssigkeitsstrom zugeführt, bezeichnet als hydrodynamische Fokussierung. Diese ermöglichte die Erfassung jeder einzelnen Zelle durch einen Lichtstrahl, der von einem Laser erzeugt wurde. Traf die Zelle auf den Laserstrahl, kam es zur Emission von Streu- und fluoreszierendem Licht. Die Lichtstreuung einer Zelle gab Aufschluss über die Größe, gemessen im „forward scatter“ (FSC), und die Granularität, gemessen im „side scatter“ (SSC), einer Zelle. Mit Hilfe einer spezifischen Markierung durch an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Ak konnten die Zellen über bekannte Antigene näher charakterisiert werden. Photorezeptoren registrierten die Stärke des emittierten Lichts und setzten es in digitale Signale um, die verstärkt und akkumuliert wurden und schließlich als Punktwolke oder Histogramm dargestellt wurden (Tanke und van der Keur, 1993).

3.2.11.1 Markierung von Zelloberflächenantigenen

$1-2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in eine 96 Spitzbodenplatte gegeben und bei 4°C für 4 min mit 1000 rpm (Multifuge 3S-R) abzentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit $150 \mu\text{l}$ Waschpuffer für Immunfluoreszenz bei 4°C für 4 min mit 1000 rpm (Multifuge 3S-R). Nach jedem Waschschrte wurde das Zellpellet durch Rütteln gelöst. Im Anschluss wurden die Zellen mit $5-10 \mu\text{l}$ der Ak Suspension resuspendiert und für 25 Minuten inkubiert. Bei den verwendeten Farbstoffen, die

an die Ak gekoppelt waren, handelte es sich vornehmlich um Fluoreszeinisothiocyanat (FITC; entspricht Fluoreszenz 1) und Phycoerythrin (PE; entspricht Fluoreszenz 2). Wurden die beiden Konjugate mit einem Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm im Durchflusszytometer angeregt, emittierte PE Licht bei 563-587 nm und FITC bei 520-540 nm (Rabinovitch et al., 1986). Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die markierten Zellen in 100 µl Fixierpuffer für die Durchflusszytometrie aufgenommen.

Bei biotinylierten oder unkonjugierten Ak folgte ein zweiter Färbeschritt mit 10 µl PE-konjugierten Streptavidin oder mit „goat anti-mouse“ (GAM)-PE Ak für 15 Minuten bei 4 °C. Daraufhin wurden die Zellen zweimal gewaschen und in Fixierpuffer aufgenommen. Die Zellen konnten nun durchflusszytometrisch gemessen und mit der CellQuest Pro Software ausgewertet werden.

3.2.11.2 Intrazelluläre FoxP3-Färbung

Zur besseren Charakterisierung der Treg Zellen wurden die isolierten oder kultivierten CD4⁺ T-Zellen auf CD25 und FoxP3 Expression hin überprüft. Da FoxP3 ein intrazelluläres Molekül ist, wurde durch die Verwendung eines Fix/Perm Puffers eine Durchlässigkeit für Ak ermöglicht (Permeabilisation). Die Struktur der Zelle konnte trotz des dadurch eingetretenen Zelltods ebenfalls durch den Puffer erhalten werden (Fixation).

Für die intrazelluläre FoxP3 Färbung wurde das „Human Regulatory T Cell Staining Kit“ (eBioscience, Frankfurt am Main) gemäß dem Protokoll angewendet. Dazu wurden 1– 2 x10⁵ Zellen in eine Vertiefung einer 96 Spitzbodenplatte gegeben, einmal mit 200 µl Staining Puffer bei 1000 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min gewaschen und mit 5 µl anti-human CD4-FITC zusammen mit anti-human CD25-APC Ak für 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurde das entstandene Zellpellet mit einem Rüttler aufgelockert, mit Fix/Perm Puffer resuspendiert und für eine Stunde im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte bei 1000 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit 200 µl Staining Puffer bei 1000 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min gewaschen und zweimal mit 250 µl Permeabilisation Puffer bei 1000 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min gewaschen. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurde das Zellpellet anschließend mit 25 µl 2% Rattenserum für 15 min inkubiert. Daraufhin wurden 5 µl anti-human FoxP3-PE Ak hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 250 µl Permeabilisation Puffer bei 1000 rpm (Multifuge 3S-R) für 4 min wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen, am Durchflusszytometer gemessen und mit der CellQuest Pro Software analysiert.

3.2.11.3 CFSE Färbung

Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester (CFSE) ist ein grün fluoreszierender Farbstoff und ermöglicht die Proliferationsbestimmung einer Zellpopulation. Die Vorstufe Carboxyfluoreszein

Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) diffundiert passiv in die Zellen, wo die Acetat-Gruppen von intrazellulären Esterasen gespalten werden. Die Spaltung bewirkt die Freisetzung von hoch fluoreszierendem CFSE, das mit Aminen reagiert und somit intrazellulär fixiert wird. CFSE hat Emissionspitzen bei 494 nm und 515 nm, wenn es bei 488 nm von einem Laser eines Durchflusszytometers angeregt wird. Bei Teilung der Zelle wird der Farbstoff jeweils zur Hälfte auf die Tochterzellen weitergegeben. So kann durchflusszytometrisch durch Bestimmung der Fluoreszenzabnahme die Proliferation einer Zellpopulation bestimmt werden. Die zu markierenden Zellen wurden dazu bei 37 °C für 10 min mit 5 µM CFSE inkubiert. Dieser Prozess wurde durch die Zugabe von 5 ml 4 °C kaltem KM 10% FKS gestoppt und die Zellen wurden weitere 5 min auf Eis belassen. Es folgten drei Waschschriffe mit 5 ml KM 10% FKS für 7 min bei 1600 rpm (Multifuge 3S-R). Nach dem letzten Waschschriff wurden die nun markierten Zellen in x-vivo-15 Medium aufgenommen.

3.2.11.4 DDAO-SE Färbung

“9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one-7-yl)-succinimidyl ester“ (DDAO-SE) ist ein Farbstoff, dessen Succinimidyl Ester kovalente Bindungen sowohl mit intra- als auch extrazellulären Proteinen eingeht. Der Farbstoff wird bei 633/635 nm vom Laser eines Durchflusszytometers angeregt und emittiert Licht im roten Farbbereich. Bei Teilung der Zelle nimmt die Fluoreszenz der Tochterzellen ab, was mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt werden kann. Die Färbung der Zellen folgte analog der oben beschriebenen Markierung mit CFSE (Kapitel 3.2.11.3). Es wurde 1 µM DDAO-SE zur Färbung der Zellen verwendet.

3.2.11.5 Tumorzellfärbung

Damit die Tumorzellen mit Ak gefärbt werden konnten, mussten die adhärenen Zellen von der Kulturflaschenoberfläche gelöst werden.

Dazu wurden $0,8 \times 10^6$ Tumorzellen, die in 250 ml Kulturflaschen kultiviert wurden, mit Trypsin Fertiglösung abgelöst und in neue 50 ml Kulturflaschen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 5 Minuten mit 2 ml Accutase bei 37 °C inkubiert. Die zu diesem Zweck verwendete Accutase wirkte in Hinblick auf Vitalität und Proliferationsfähigkeit der Zellen schonender als Trypsin, wie Bajpai und Kollegen an humanen embryonalen Stammzellen zeigten (Bajpai, et al., 2008). Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 1300 rpm (Multifuge 3S-R) wurden die Zellen in Waschpuffer aufgenommen und mit anti-Jagged-1, anti-Notch-1, anti-CD80 und anti-CD86 markiert (siehe Kapitel 3.2.11.1).

3.2.11.6 Aszites-Zell-Färbung

Nachdem MNZ über die Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aus Aszites isoliert worden waren (siehe Kapitel 3.2.2), wurden die MNZ mit fluoreszierenden Ak (jeweils 10 µl) in folgender Kombination markiert.

1. IgG1-PE, IgG1-FITC, IgG2-PE, IgG2-FITC (BD Biosciences, je 1:5)
2. CD3-PE (BD Biosciences, 1:5) – TZR $\gamma\delta$ -FITC (BD Biosciences, 1:3)
3. TZR $\gamma\delta$ -PE (BD Biosciences, pur) – V δ 1-FITC (Endogen, 1:5)
4. TZR $\gamma\delta$ -PE (BD Biosciences, pur) – V δ 2-FITC (Immunotech, 1:2)
5. CD3-PE (BD Biosciences, 1:5) – TZR $\alpha\beta$ -FITC (Life Technologies, 1:8)
6. CD4-PE (BD Biosciences, 1:5) – CD8-FITC (BD Biosciences, 1:5)
7. CD8-PE (BD Biosciences, 1:5) – CD56-FITC (BD Biosciences, 1:5)
8. IgG1-PE (BD Biosciences, 1:2) - CD4-FITC (BD Biosciences, 1:5)
9. CD25-PE (BD Biosciences, 1:2 oder Miltenyi, 1:4) – CD4-FITC (BD Biosciences, 1:5)
10. CD45RO-PE (BD Biosciences, 1:2) – CD45RA-FITC (BD Biosciences, 1:2)
11. CD45RO-PE (BD Biosciences, 1:2) – TZR $\gamma\delta$ -FITC (BD Biosciences, 1:3)
12. CD45RO-PE (BD Biosciences, 1:2) – TZR $\alpha\beta$ -FITC (Life Technologies, 1:8)
13. CD28 (BD Biosciences, 1:5) – TZR $\gamma\delta$ -FITC (BD Biosciences, 1:3)
14. CD28 (BD Biosciences, 1:5) – TZR $\alpha\beta$ -FITC (Life Technologies, 1:8)
15. IgG1-FITC (BD Biosciences, 1:5)
16. CD19-FITC (BD Biosciences, 1:5)
17. IgG2-FITC (BD Biosciences, 1:5)
18. CD14-FITC (BD Biosciences, 1:5)

3.2.12 Tumorzellkultur

Vor Beginn der Kokultur (Tag 0) wurden 2×10^5 Zellen/Vertiefung der Tumorzelllinie Panc89 und 3×10^5 Zellen/Vertiefung der Tumorzelllinie Colo357 in einer 6-er Platte ausgesät und pro Vertiefung mit 2 ml KM 10% FKS versorgt.

Am ersten Tag (Tag 1) wurde das KM 10% FKS Kulturmedium entfernt und durch x-vivo-15 Medium ersetzt und 2×10^6 frisch isolierte unmarkierte Responder bzw. CFSE markierte Responder pro Vertiefung hinzugegeben. CFSE markierte Responder dienen lediglich der späteren Proliferationsbestimmung in der Kokultur mit Tumorzellen. Die unmarkierten Responder waren für den am Tag 5 der Kokultur beginnenden Suppressionsansatz bestimmt. Am zweiten Tag (Tag 2) wurden zu den Kokulturen 250000 Dynabeads CD3/CD28 gegeben um die Responder zu aktivieren. Die Zahl der Beads richtete sich hierbei nach der Anzahl der Responder, so dass ein Verhältnis von 8 Responder/1 Bead gewährleistet war.

Am fünften Tag (Tag 5) wurden die kokultivierten Responder (RespV) von den Tumorzellen getrennt (RespV, siehe auch Glossar). Dazu wurde das Kulturmedium vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Durch Resuspendieren mit frischem x-vivo-15 Medium wurden die Responder von den Tumorzellen abgewaschen. Die Dynabeads CD3/CD28 wurden von den RespV entfernt, indem die Zellsuspension gegen einen Magneten gehalten wurde. Während die Dynabeads

CD3/CD28 vom Magneten gebunden wurden, stellte der Überstand die RespV dar. Die RespV wurden dem Magneten ein zweites Mal ausgesetzt, um alle Dynabeads CD3/CD28 sicher von den RespV zu entfernen. Anschließend konnte die Proliferation der CFSE markierten RespV im Durchflusszytometer bestimmt werden. Die unmarkierten RespV wurden entweder direkt in einem nachfolgenden Suppressionsansatz eingesetzt oder wurden für weitere 7 Tage alleine kultiviert, bevor sie in den Suppressionsansatz eingesetzt wurden (erweiterte Kultur).

3.2.13 Suppressionsansatz

RespV, die entweder zuvor alleine oder mit Tumorzellen in einer Zellkultur waren, wurden zusammen mit frisch isolierten Respondern, die mit CFSE markiert worden waren (RespCFSE, siehe auch Glossar), in einer Vertiefung einer 96er Zellkulturplatte kokultiviert. Pro Kokultur wurden $1-2 \times 10^5$ RespV oder frisch isolierte Treg zusammen mit RespCFSE eingesetzt. Die Kokulturen wurden in einem Verhältnis von einem MACSiBead CD3/CD28 zu einer RespCFSE Zelle stimuliert. Nach circa 110 Stunden wurden die Zellen aus den Vertiefungen entnommen und die Proliferation anhand der CFSE-Verteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

3.2.14 Statistik

Zur Messung der statistischen Signifikanz wurde ein einseitiger ungepaarter Student-t-Test mit ungleicher Varianz in Gruppen mit $n \geq 4$ verwendet. Als statistische Signifikanz wurde $p \leq 0.05$ gewertet, als hochsignifikant $p \leq 0.01$. Signifikante Experimente wurden mit einem Stern gekennzeichnete, hochsignifikante Experimente mit zwei Sternen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Tumorzellen

In der Literatur werden verschiedene Antigene beschrieben, die bei der Regulation und/oder Induktion von Treg eine Rolle spielen könnten. Hierzu gehören unter anderem CD80, CD86, Jagged-1 und Notch-1 (Perez et al., 2008; Vigouroux et al., 2003; Samon et al., 2008). In diesem Zusammenhang wurden in unseren Experimenten unterschiedliche Tumorzellen auf die Expression von CD80, CD86, Notch-1 und Jagged-1 hin untersucht. Bei der Charakterisierung zeigte sich, dass auf der Tumorzelllinie Daudi CD86 und Notch-1 am stärksten und CD80 und Jagged-1 ausschließlich auf Daudi exprimiert wurden. Keine der vier PDAC-Zelllinien wie auch die Tumorzelllinien PCI, HCC15 und Mewo1 waren für Jagged-1 und CD80 positiv (Tab. 1). Die aus Aszites generierte Ovarialkarzinomzelllinie K1290 exprimierte keine der untersuchten Oberflächenmoleküle. Von den vier PDAC-Zelllinien Panc89, Colo357, PT45P1 und PancTu-I exprimierte Colo357 Notch-1 und FoxP3 am stärksten, während Panc89 am deutlichsten CD86 exprimierte (Tab. 1 und Abb. 2).

Tabelle 1: CD80, CD86, Notch-1, Jagged-1 und FoxP3 Expression auf unterschiedlichen Tumorzelllinien

	Tumorzelllinien								
	Panc89	Colo357	PT45P1	PancTu-I	K1290	Daudi	Mewo1	PCI	HCC15
Antigen									
CD80	0 (3)	0 (3)	0 (5)	0 (3)	0 (1)	61 (3)	0 (5)	0 (1)	0 (2)
CD86	8 (3)	4 (3)	4 (5)	1 (3)	0 (1)	280 (3)	3 (5)	n.g.	10 (2)
Notch-1	6 (3)	19 (3)	2 (5)	3 (3)	2 (1)	33 (3)	2 (5)	1 (1)	1 (2)
Jagged-1	0 (3)	0 (3)	0 (5)	0 (3)	1 (1)	17 (3)	0 (5)	0 (1)	0 (2)
FoxP3	19 (2)	29 (2)	27 (1)	18 (1)	33 (1)	2 (1)	39 (1)	24 (1)	23 (1)

Gezeigt ist der Mittelwert des Median der Fluoreszenzintensität abzüglich des Median der entsprechenden Isotypkontrolle. In Klammern ist die Anzahl der Färbungen angegeben.

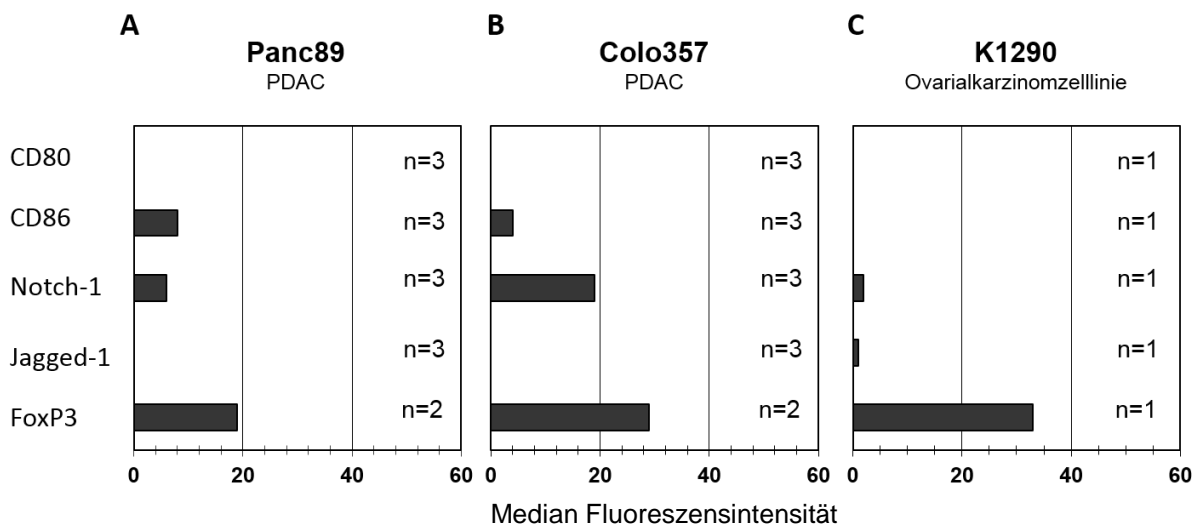


Abbildung 2: Die PDAC-Zelllinien Panc89 und Colo357 exprimierten Notch-1, CD86 und FoxP3 2×10^5 Tumorzellen wurden mit anti-Jagged-1, anti-Notch-1, anti-CD80 oder anti-CD86 gefärbt, durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert und mit der CellQuestPro II Software ausgewertet. Der mittlere Median der Fluoreszenzintensität ist abzüglich des mittleren Medians der entsprechenden Isotypkontrolle in n unabhängigen Färbungen für (A) Panc89, (B) Colo357 und (C) K1290 als Balkendiagramm dargestellt.

Mit Hilfe der intrazellulären Färbung konnte FoxP3 in allen untersuchten Tumorzelllinien bis auf Daudi in unterschiedlichen Intensitäten nachgewiesen werden (Tab. 1, Abb. 2 und 3). Die histogrammische Darstellung der FoxP3 Expression ist exemplarisch für Panc89, Colo357 -- auf die sich die weiteren Untersuchungen konzentrierten-- und K1290 in Abb. 3 gezeigt.

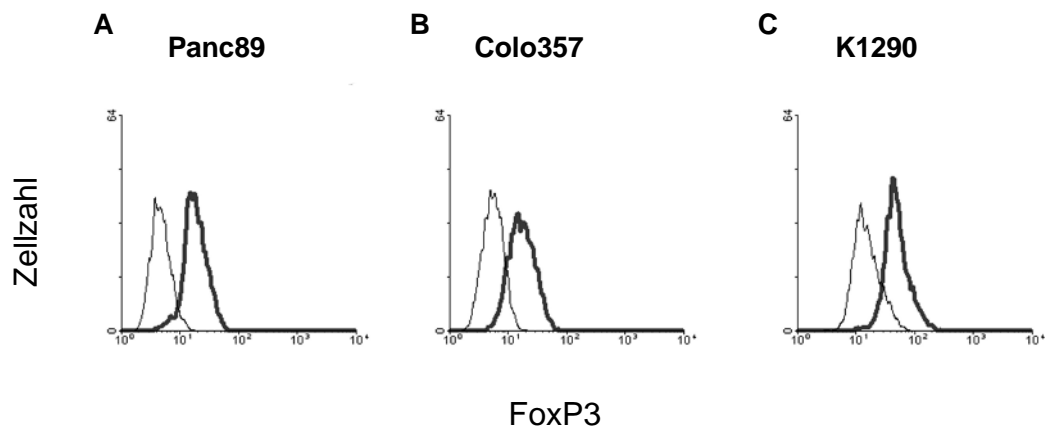


Abbildung 3: FoxP3 Expression in den Tumorzelllinien Panc89, Colo357 und K1290

2×10^5 Tumorzellen wurden intrazellulär mit dem FoxP3 mAK (PCH101) gefärbt, durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert und mit der CellQuestPro II Software ausgewertet. Exemplarisch sind die Histogramme für (A) Panc89, (B) Colo357 und (C) K1290 dargestellt; die graue Linie entspricht der Isotypkontrolle, die fette schwarze Linie der FoxP3-Färbung. Gezeigt ist jeweils eine exemplarische Färbung.

4.2 Proliferationsinhibition von Responder-Zellen durch Tumorzellen

Hinz und Mitarbeiter beobachteten, dass FoxP3⁺ Tumorzellen in der Lage sind die Proliferation von TZR-stimulierten Respondern zu verhindern. Dieser suppressive Effekt ist für die PDAC-Zelllinien Panc89, Colo357 und PancTu-I beschrieben worden (Hinz et al., 2007). Zunächst galt es den experimentellen Aufbau, wie von Hinz und Kollegen beschrieben, für die vorliegende Doktorarbeit zu etablieren, da dieser auch als Basis für weiterführende Experimente (siehe nächster Abschnitt) diente (Hinz et al., 2007).

Die nachfolgenden Experimente wurden mit Panc89, Colo357 und K1290 durchgeführt. In Abb. 4 ist ein exemplarisches Experiment gezeigt, in dem Responder mit den Tumorzelllinien Panc89 und Colo357 kokultiviert wurden, wobei diese Responder im Weiteren RespV(Colo357) (Abb. 4A/B, Mitte) bzw. RespV(Panc89) (Abb. 4A/B, unten) genannt werden.

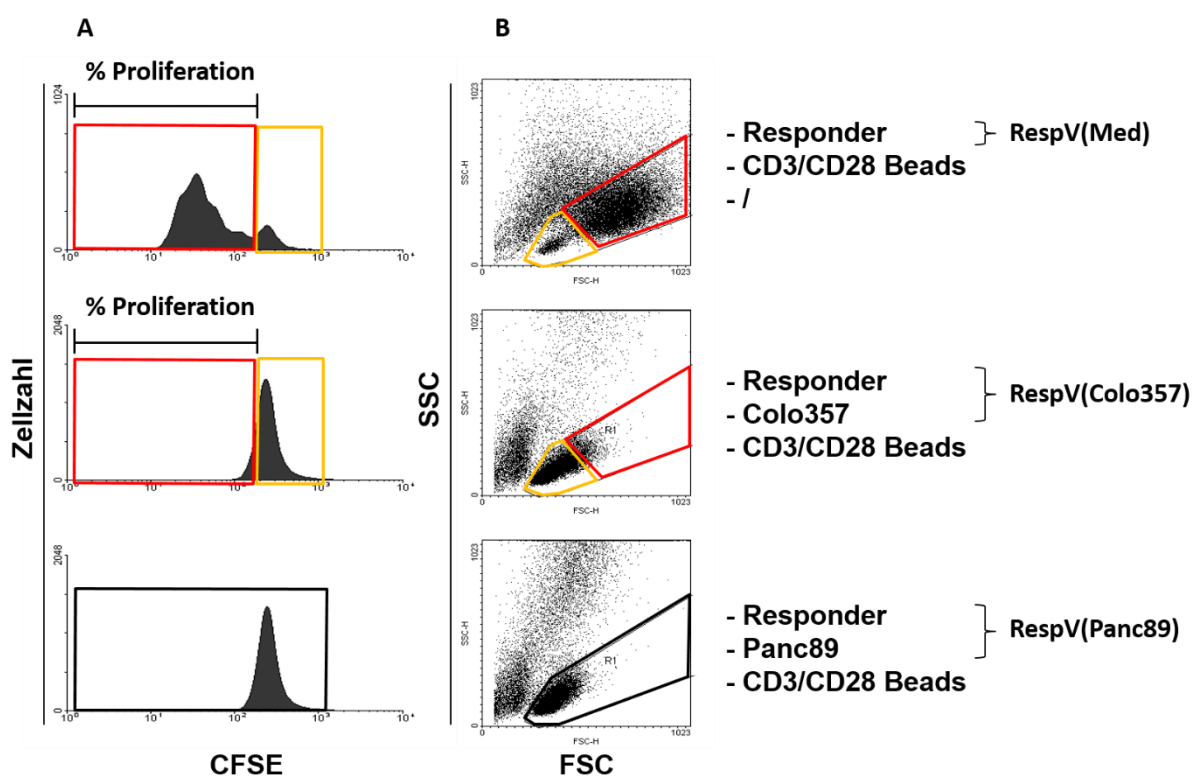


Abbildung 4: Beispiel zur Demonstration der Proliferationsbestimmung von frisch isolierten Respondern in Kokultur mit Panc89 und Colo357

CFSE markierte, frisch isolierte Responder wurden mit CD3/CD28 Beads für 72 Std. stimuliert, während sie alleine [RespV(Med)], mit Panc89 [RespV(Panc89)] oder mit Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden kokultiviert wurden. Die (A) CFSE Fluoreszenzintensität und die (B) Größe und Granularität der Zellen wurde zur Proliferationsbestimmung durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert und mit der CellQuestPro II Software ausgewertet. Zur Veranschaulichung der Responder Proliferation wurden die einzelnen Messbereiche in den abgebildeten (A) Histogrammen und (B) Punktwolken farblich dargestellt: rot kennzeichnet den Messbereich für proliferierende und gelb den für nicht proliferierende Responder (obere und mittlere Reihe). In der unteren Reihe ist das gewählte Fenster zur CFSE-Proliferationsbestimmung in der Punktwolke schwarz hervorgehoben.

Responder, die im Medium alleine kultiviert wurden, werden als RespV(Med) bezeichnet (siehe auch Glossar). Zur Quantifizierung wurde die Proliferation durchflusszytometrisch mit Hilfe der CFSE-Markierung bestimmt. Die Analyse zeigt in dem exemplarischen Experiment,

dass der TZR-Stimulus, vermittelt durch Dynabeads CD3/CD28, eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz, das heißt Zunahme der Proliferation, auslösen konnte (Abb. 4A, oben). Da proliferierende Zellen an Größe und Granularität zunehmen, wurden diese Parameter ebenfalls als Indikator für Proliferation mit Hilfe einer Punktwolke dokumentiert (Abb. 4B). Die Größe wurde mit dem „forward scatter“ (FSC) und die Granularität mit dem „side scatter“ (SSC) bestimmt. 72 Stunden nach TZR-Stimulation mit CD3/CD28 Beads blieben die Fluoreszenzabnahme sowie die Zunahme der Größe und Granularität in Anwesenheit der Tumorzellen Panc89 und bzw. Colo357 aus, womit eine Proliferationsinhibition aufgezeigt wurde (Abb. 4A/B, Mitte und unten).

Insgesamt wurden bis zu acht Proliferationsinhibitionsexperimente mit den PDAC-Zelllinien Panc89, Colo357 und der selbst generierten Tumorzelllinie K1290 durchgeführt (Abb. 5). Bei einem Teil dieser Experimente wurden später Suppressionsansätze angeschlossen. Es zeigt sich sowohl bei der Proliferationsbestimmung durch CFSE (Abb. 5A) als auch bei FSC/SSC Messung (Abb. 5B), dass die Proliferation von TZR-stimulierten frisch isolierten Respondern in der Kokultur mit Colo357 im Vergleich zu Panc89 und K1290 am besten inhibiert wurde. Colo357 konnte in 7 von 8 Versuchen die Proliferation der Respondern inhibieren. In der Kokultur mit K1290 wurde die Proliferation der Responder gar nicht und im Falle von Panc89 nur in 3 von 8 Versuchen inhibiert.

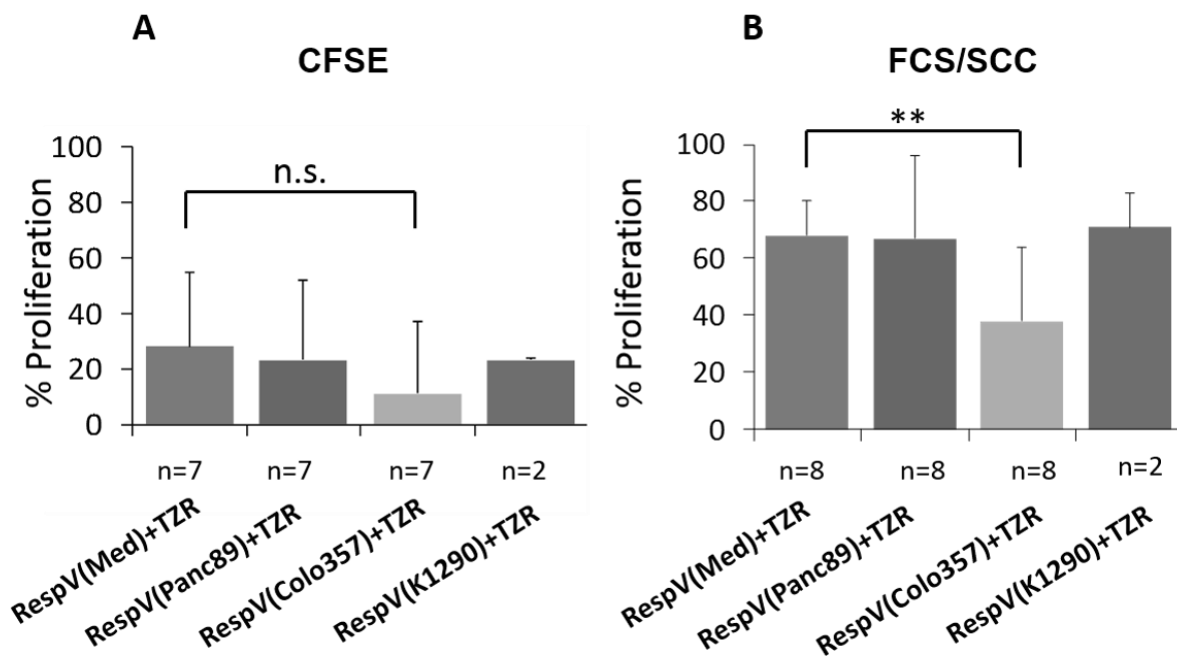


Abbildung 5: Die Proliferationsinhibition war in der Kokultur mit Colo357 am deutlichsten

CFSE markierte, frisch isolierte Responder wurden mit CD3/CD28 Beads (TZR) für 72 Std. stimuliert, während sie alleine [RespV(Med)], mit Panc89 [RespV(Panc89)], mit Colo357 [RespV(Colo357)] oder mit K1290 [RespV(K1290)] für 100 Stunden kokultiviert wurden. Die Daten der (A) CFSE-Fluoreszenz und des (B) forward/side scatter wurden durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert und mit der CellQuestPro II Software ausgewertet. Im Balkendiagramm ist der Mittelwert inklusive einer Standardabweichung von (n) Experimenten als Balkendiagramm dargestellt. **: $p \leq 0.01$, n.s. : nicht signifikant

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob durch die Kokultur mit Tumorzellen T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp induziert werden können. FoxP3 gilt als Marker für suppressive Zellen und kann auch als Indiz für induzierte Treg gelten. Daher wurde zur Charakterisierung der RespV am Tag nach der Kokultur sowohl für stimulierte (Abb. 6A) als auch für unstimulierte RespV (Abb. 6B) die intrazelluläre Färbung zum Nachweis von FoxP3 durchgeführt.

Die Expression von FoxP3 war bei TZR-stimulierten Respondern, die mit Colo357 kokultiviert wurden (Abb. 6A, hellgrauer Balken) geringer als die FoxP3 Expression bei den Respondern, die alleine (Abb. 6A, mittelgrauer Balken) oder in Gegenwart von Panc89 stimuliert wurden (Abb. 6A, schwarzer Balken).

Im Vergleich zu den TZR-stimulierten RespV war die FoxP3 Expression bei den unstimulierten RespV insgesamt niedriger (Abb. 6B). Geringfügig mehr FoxP3 konnte bei RespV(Panc89) nachgewiesen werden. Die FoxP3 Expression von RespV(Med) und RespV(Colo357) war etwa gleich stark (Abb. 6B).

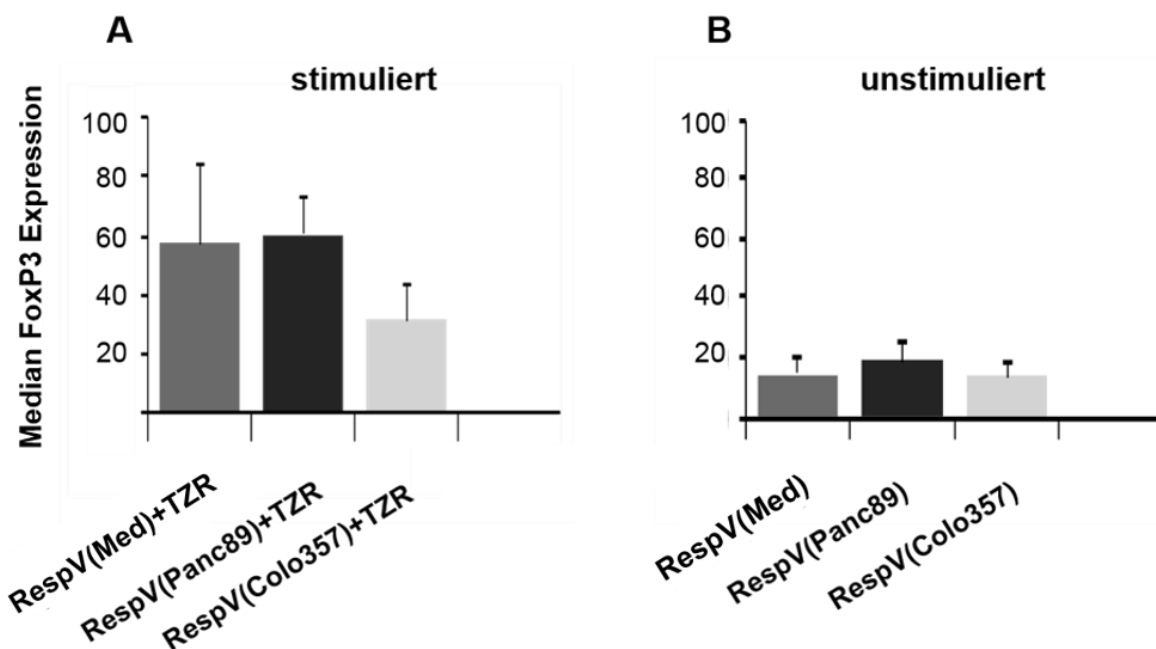


Abbildung 6: FoxP3 Expression in TZR-stimulierten und -unstimulierten RespV

CFSE markierte, frisch isolierte Responder wurden (A) mit CD3/CD28 Beads (TZR) für 72 Std. stimuliert und (B) nicht stimuliert, während sie alleine [RespV(Med)], mit Panc89 [RespV(Panc89)] oder mit Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden kokultiviert wurden. Die Zellen wurden nach den ca. 100 Stunden intrazellulär mit dem FoxP3 mAk (PCH101) gefärbt und durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert und mit der CellQuestPro II Software ausgewertet. Der aus vier Experimenten ermittelte Mittelwert des Median der Färbung abzüglich dem ermittelten Mittelwert des Median der entsprechenden Isotypkontrolle ist mit Standardabweichung als Balkendiagramm dargestellt.

In Abb. 7 ist ein repräsentatives Experiment für die FoxP3 Expression von unstimulierten RespV aus der Kokultur gezeigt. RespV(Panc89) (Abb. 7, rote Linie) zeigten die stärkste FoxP3 Expression, während RespV(Colo357) FoxP3 am geringsten exprimierten (Abb. 7,

blaue Linie). Hierbei sollte untersucht werden, ob die Kokultur mit den Tumorzellen ausreicht um FoxP3 in unstimulierten RespV zu induzieren.

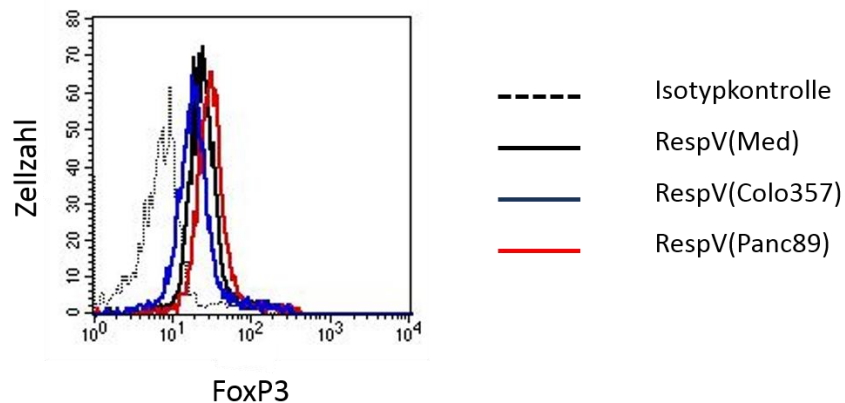


Abbildung 7: FoxP3 Expression von unstimulierten RespV

Frisch isolierte Responder wurden alleine [RespV(Med)], mit Panc89 [RespV(Panc89)] oder mit Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Std. kokultiviert. Die Zellen wurden nach der Kokultur intrazellulär mit dem FoxP3 mAk (PCH101) gefärbt und durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert und mit der CellQuestPro II Software ausgewertet.

4.3 Suppressionsansatz mit kokultivierten Responder-Zellen

Die Suppression von Respondern durch die Kokultur mit Tumorzellen ließ die Frage aufkommen, auf welche Weise die Responder an der Proliferation gehindert wurden. Entweder wurde die Suppression der Responder durch einen direkten Effekt der Tumorzellen auf die Responder ausgelöst oder durch einen indirekten Effekt, bei welchem die Tumorzellen eine Konvertierung der Responder (eventuell eine bestimmte Subpopulation) in suppressive T-Zellen vermittelten, die dann ihrerseits andere Responder in der Proliferation inhibieren konnten. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein CFSE-Suppressionsansatz etabliert, in dem die Proliferation von CFSE markierten, frisch isolierten Respondern (RespCFSE) nach TZR-Stimulation durch MACSiBead CD3/CD28 (Abb. 8A und F, rote Umrandung) durch frisch isolierte nTreg inhibiert wurde (Abb. 8E, grüne Umrandung, Positivkontrolle des Suppressionsansatzes). Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte nun überprüft werden, ob Responder, die mit den PDAC-Zelllinien Colo357 [=RespV(Colo357)] oder Panc89 [=RespV(Panc89)] kokultiviert wurden, suppressive Eigenschaften erlangt haben. Abb. 8 zeigt, dass 45% der RespCFSE nach TZR-Stimulation proliferierten (Abb. 8F). In der Punktwolke in Abb. 8A ist der proliferierende Anteil der RespCFSE und die damit einhergehende Fluoreszenzabnahme in Abb. 8F mit rot gekennzeichnet. Die nicht proliferierenden Zellen sind in der Punktwolke Abb. 8B gelb hervorgehoben, die in dem entsprechenden CFSE Histogramm (Abb. 8G) mit der gezeigten Spitze gleichzusetzen sind. Frisch isolierte RespCFSE, die in Gegenwart von RespV(Med) kultiviert wurden, wiesen eine Proliferation von über 43% auf (Abb. 8B und G). Wurden RespV(Panc89) und RespV(Colo357) in den

Suppressionsansatz eingesetzt, so wurde die Proliferation von den RespCFSE auf 10% oder 16% inhibiert (Abb. 8C und H bzw. D und I). Frisch isolierte nTreg reduzierten die Proliferation auf 10 % (Abb. 8E und J).

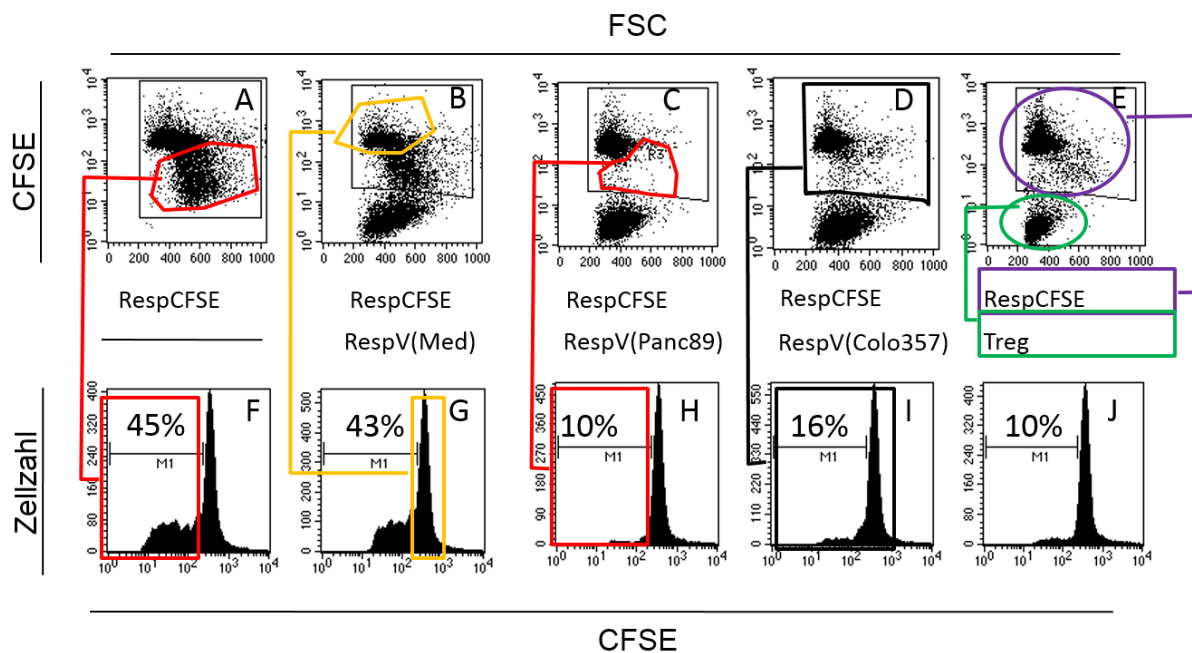


Abbildung 8: Proliferation von frisch isolierten Respondern in Kokultur mit vorinkubierten Respondern

1×10^5 CFSE markierte, frisch isolierte Responder (RespCFSE) wurden mit MACSiBead CD3/CD28 für 113 Std. alleine, in Anwesenheit von vorinkubierten Respondern (RespV) oder mit Treg kokultiviert. Die RespV wurden zuvor in Medium alleine [RespV(Med)] oder in Anwesenheit von Panc89 [RespV(Panc89)] oder Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden ohne TZR-Stimulation kokultiviert. Die CFSE-Fluoreszenzintensität wurde am FACSCalibur bestimmt, mit der CellQuestPro II Software analysiert und sowohl (A-E) als Punktwolke (FSC gegen CFSE) als auch (F-J) als Histogramm dargestellt. Die Fluoreszenzabnahme wurde als Prozent Proliferation in den Histogrammen angegeben. Zur Illustration der RespCFSE Proliferation sind einzelne Messbereiche farblich markiert: rot kennzeichnet den Messbereich für proliferierende und gelb den für nicht proliferierende RespCFSE. In D ist das gewählte Fenster zur CFSE-Proliferationsbestimmung der Punktwolken B-D schwarz hervorgehoben. In E sind die gemessenen RespCFSE lila und Treg grün gekennzeichnet.

4.4 Optimierung der Differenzierung von Respondern durch DDAO-SE

Bei der Kokultur von CFSE markierten, frisch isolierten Respondern und vorinkubierten RespV zeigte sich, dass die Differenzierung zwischen CFSE markierten und unmarkierten Zellen nicht immer eindeutig geklärt werden konnte. Die proliferierenden RespCFSE (rote Umrandung in Abb. 9A und C) wiesen eine ähnlich hohe CFSE-Fluoreszenz wie die RespV (blaue Umrandung in Abb. 9B und C) auf. Die Zuordnung der gemessenen Zellen fiel schwierig aus (Schnittmenge aus blau und rot umrandeten Bereich in Abb. 9C). Die Abgrenzung der RespCFSE von RespV (Abb. 9D) lieferte keine ausreichende Aussage über die mittels CFSE-Fluoreszenzabnahme bestimmte Proliferation (nicht gezeigt). Befanden sich statt der RespV Treg in der Kokultur, war die Differenzierung problemlos möglich (Abb. 9E).

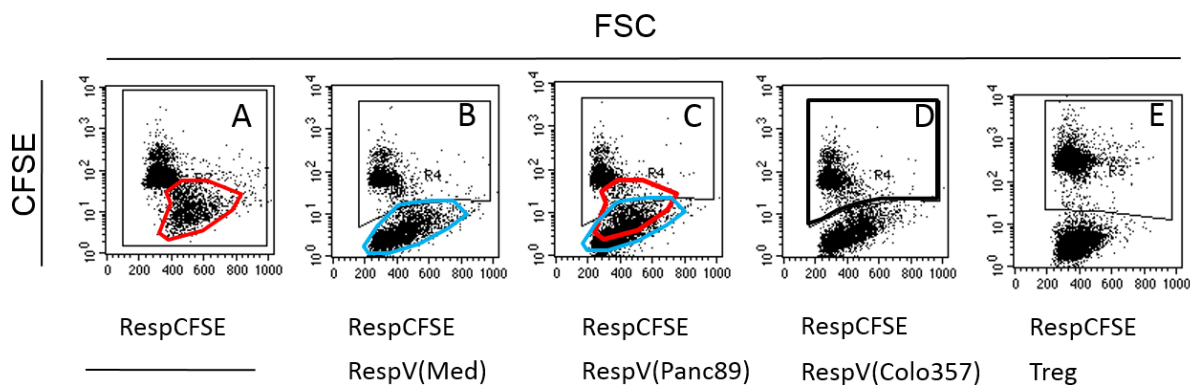


Abbildung 9: Die Proliferationsbestimmung von frisch isolierten Respondern in Kokultur mit vorinkubierten Respondern gelingt nicht immer

1×10^5 CFSE markierte, frisch isolierte Responder (RespCFSE) wurden mit MACSiBead CD3/CD28 für 113 Std. alleine, in Anwesenheit von vorinkubierten Respondern (RespV) oder mit Treg kokultiviert. Die RespV wurden zuvor in Medium alleine [RespV(Med)] oder in Anwesenheit von Panc89 [RespV(Panc89)] oder Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden ohne TZR-Stimulation kokultiviert. Die CFSE-Fluoreszenzintensität wurde am FACSCalibur bestimmt, mit der CellQuestPro II Software analysiert und (A-E) als Punktwolke (FSC gegen CFSE) dargestellt. Zur besseren Darstellung der proliferierenden RespCFSE und der RespV sind einzelne Messbereiche farblich illustriert: (A und C) rot kennzeichnet den Messbereich für proliferierende RespCFSE und (B und C) blau den für RespV. In D ist das gewählte Fenster zur CFSE-Proliferationsbestimmung der Punktwolken B-D schwarz hervorgehoben.

Der experimentelle Aufbau wurde daher dahingehend erweitert, dass die RespV mit dem rot fluoreszierenden DDAO-SE, das sich vergleichbar dem CFSE verhält, markiert wurden. Diese Doppelmarkierung verbesserte die Differenzierung zwischen beiden Zellpopulationen. Bei einer Versuchslänge von mehr als fünf Tagen in unseren Experimenten wurde der Fluoreszenzfarbstoff CFSE manchmal an andere Zellen übertragen. Dies wurde bei der Kokultur mit DDAO-SE markierten Zellen deutlich (Abb. 10B, braunes Quadrat). Aufgrund des zusätzlichen Fluoreszenzverlusts von CFSE und DDAO-SE bei der Zellproliferation war die Differenzierung nur eingeschränkt möglich, wie in Abb. 10C deutlich wird. Hier gab es Überschneidungen der proliferierenden CFSE markierten RespCFSE (Abb. 10C, rotes Quadrat) mit den proliferierenden DDAO markierten RespV(Panc89) (Abb. 10C, blaue Umrandung). Vergleichbar schwierig war die Beurteilung der Situation mit RespV(Med) und RespV(Colo357) (Abb. 10B bzw. D). nTreg konnten problemlos abgegrenzt werden (Abb. 10E, grünes Quadrat).

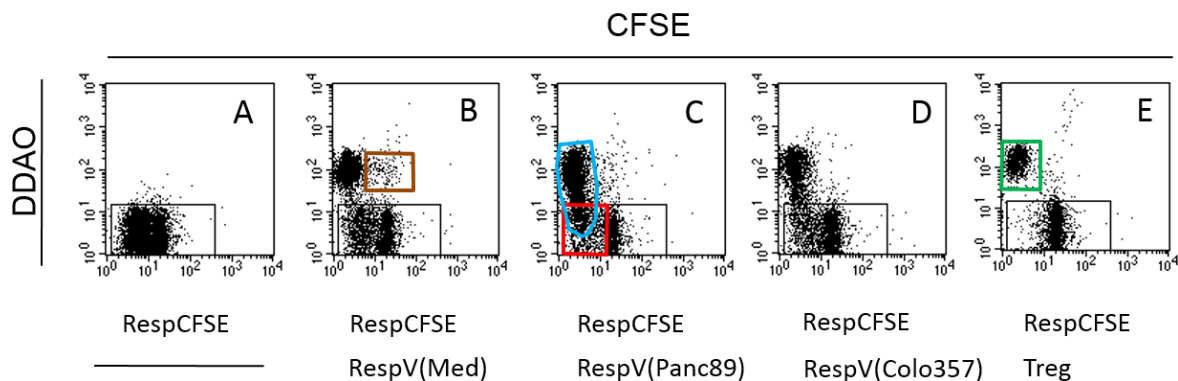


Abbildung 10: Proliferation von frisch isolierten Respondern in Kokultur mit vorinkubierten DDAO-SE markierten Respondern

1×10^5 CFSE markierte, frisch isolierte Responder (RespCFSE) wurden mit MACSiBead CD3/CD28 für 119 Std. alleine, in Anwesenheit von vorinkubierten, DDAO-SE markierten Respondern (RespV) oder mit DDAO-SE markierten Treg kokultiviert. Die RespV wurden zuvor in Medium alleine [RespV(Med)] oder in Anwesenheit von Panc89 [RespV(Panc89)] oder Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden ohne TZR-Stimulation kokultiviert. Die CFSE und DDAO-SE-Fluoreszenzintensität wurde am FACSCalibur bestimmt, mit der CellQuestPro II Software analysiert und (A-E) als Punktwolke (CFSE gegen DDAO-SE) dargestellt. Zur besseren Darstellung der proliferierenden RespCFSE und der RespV sind einzelne Messbereiche farblich illustriert: (C) rot kennzeichnet den Messbereich für proliferierende RespCFSE, (C) blau den für DDAO markierte RespV und (E) DDAO markierte nTreg sind grün umrandet. Das braune Kästchen kennzeichnet in B doppelt positive DDAO-SE und CFSE markierte Zellen.

4.5 Suppression von Resp(CFSE) durch TZR-stimulierte RespV

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Experimenten, in welchen die Responder nicht über den TZR aktiviert wurden, zeigte sich ein anderes Bild, wenn die RespV in der initialen Kokultur alleine oder mit Tumorzellen einen TZR-Stimulus erhalten hatten. Wie in Abb. 11 dargestellt, zeigten die CFSE markierten, frisch isolierten Responder (RespCFSE) mit 45% eine sehr deutliche Proliferation (Abb. 11A und F), die in Anwesenheit von Treg mit einer Proliferationsrate von 10% nahezu komplett inhibiert wurde (Abb. 11E und J). Auch in Gegenwart von RespV(Panc89) (Abb. 11C und H) und RespV(Colo357) (Abb. 11D und I) konnte eine starke Reduktion der Proliferation von RespCFSE in dem Suppressionsansatz von 8% bzw. 11% beobachtet werden. Im Unterschied zu den unstimulierten RespV(Med) (Abb. 8B und G), die die RespCFSE nicht inhibierten, wurde die Proliferation durch TZR-stimulierte RespV(Med) deutlich von 45% auf 7% inhibiert (Abb. 11B und G). Anhand des FSC konnte man ebenfalls eine deutliche Größenzunahme der RespV erkennen (11B bis D).

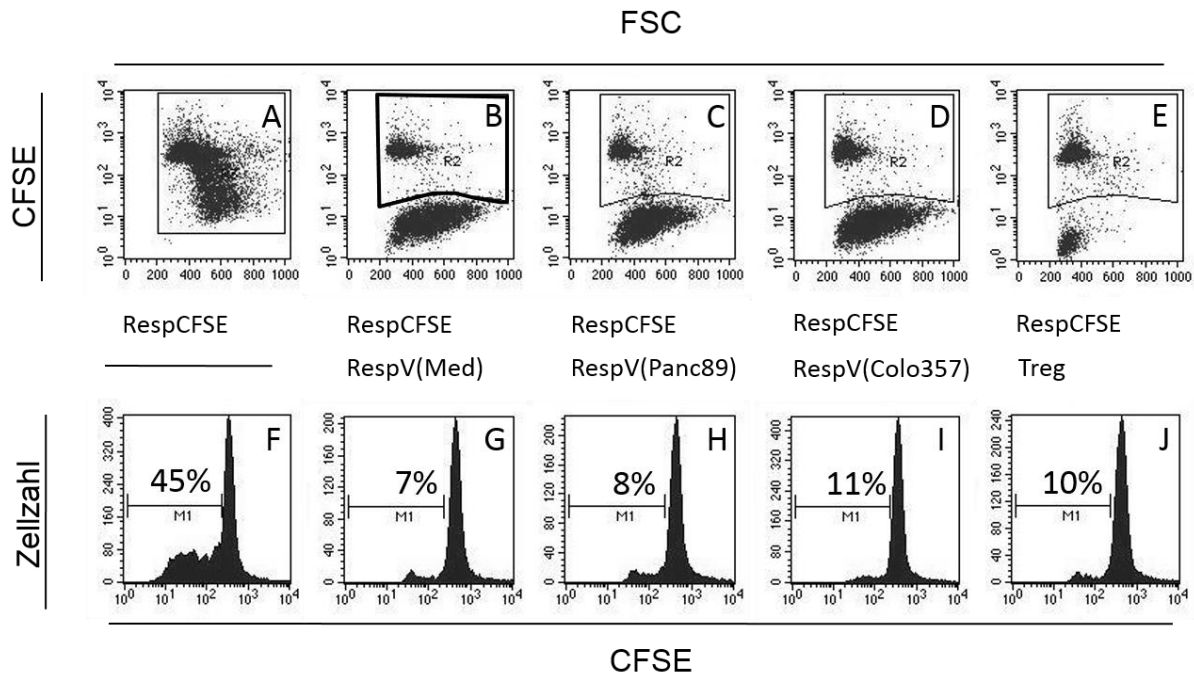


Abbildung 11: Proliferation von frisch isolierten Respondern in Kokultur mit vorinkubierten stimulierten Respondern

1×10^5 CFSE markierte, frisch isolierte Responder (RespCFSE) wurden mit MACSiBead CD3/CD28 für 113 Std. alleine, in Anwesenheit von vorinkubierten Respondern (RespV) oder mit Treg kokultiviert. Die RespV wurden mit CD3/CD28 Beads für 72 Std. stimuliert, während sie alleine [RespV(Med)], mit Panc89 [RespV(Panc89)] oder mit Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden kokultiviert wurden. Die CFSE-Fluoreszenzintensität wurde am FACSCalibur bestimmt, mit der CellQuestPro II Software analysiert und (A-E) als Punktwolke (FSC gegen CFSE) und (F-J) als Histogramm dargestellt. Die Fluoreszenzabnahme wurde als Prozent Proliferation in den Histogrammen angegeben. In B ist das gewählte Fenster zur CFSE Proliferationsbestimmung (B-E) der Punktwolken schwarz hervorgehoben.

Die FoxP3 Expression wurde, wie auch schon in den unstimulierten, in den TZR-stimulierten RespV untersucht. Die TZR-stimulierten RespV exprimierten verstärkt FoxP3 (Abb. 12). Insbesondere ist hier der Unterschied zu den RespV vom gleichen Spender ohne TZR-Stimulus zu sehen (vergleiche auch Abb. 7 und 12).

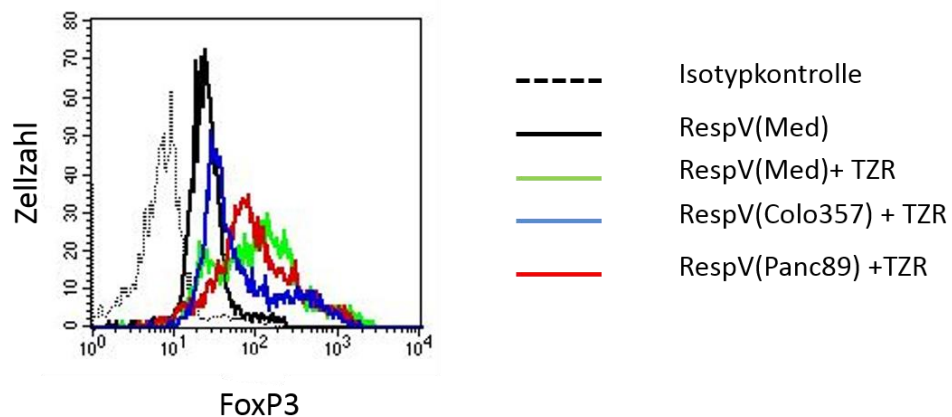


Abbildung 12: FoxP3 Expression in stimulierten RespV

Frisch isolierte Responder wurden mit CD3/CD28 Beads (TZR) für 72 Std. stimuliert, während sie alleine [RespV(Med)], mit Panc89 [RespV(Panc89)] oder mit Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden kokultiviert wurden. Die Zellen wurden nach der Kokultur intrazellulär mit dem FoxP3 mAk (PCH101) gefärbt und durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur analysiert und mit der CellQuestPro II Software ausgewertet.

Aufgrund der vorherigen Suppressionsansätze stellte sich die Frage, ob die Suppressivität der TZR-stimulierten RespV mit einem IL-2-Entzug durch die voraktivierten RespV zu erklären ist. Daher wurde ein verlängerter Suppressionsansatz durchgeführt. Dazu wurden die TZR-stimulierten RespV nach der Kokultur für weitere sieben Tage alleine weiter kultiviert (erweiterte Kultur), bevor sie in den Suppressionsansatz eingesetzt wurden (Abb. 13). Der supprimierende Effekt der TZR-stimulierten RespV(Colo357) (3%, Abb. 13D) und RespV(Panc89) (2%, Abb. 13C) auf die RespCFSE fiel stärker aus als der durch nTreg (9%, Abb. 13E) oder RespV(Med) (11%, Abb. 13B). Es wurden wesentlich mehr langzeitkultivierte RespV(Colo357) (Abb. 13D, blauer Kreis) als RespV(Med) (Abb. 13B, blauer Kreis) und RespV(Panc89) (Abb. 13C, blauer Kreis) gemessen. Die RespV hatten im Vergleich zu frisch isolierten nTreg (Abb. 13E, grüner Kreis) eine niedrigere DDAO-SE-Fluoreszenzintensität (vergleiche 13B, C, D mit 13E). Hierdurch war im Fall der RespV(Med) und RespV(Panc89) nur eine eingeschränkte Differenzierung gegenüber den RespCFSE möglich.

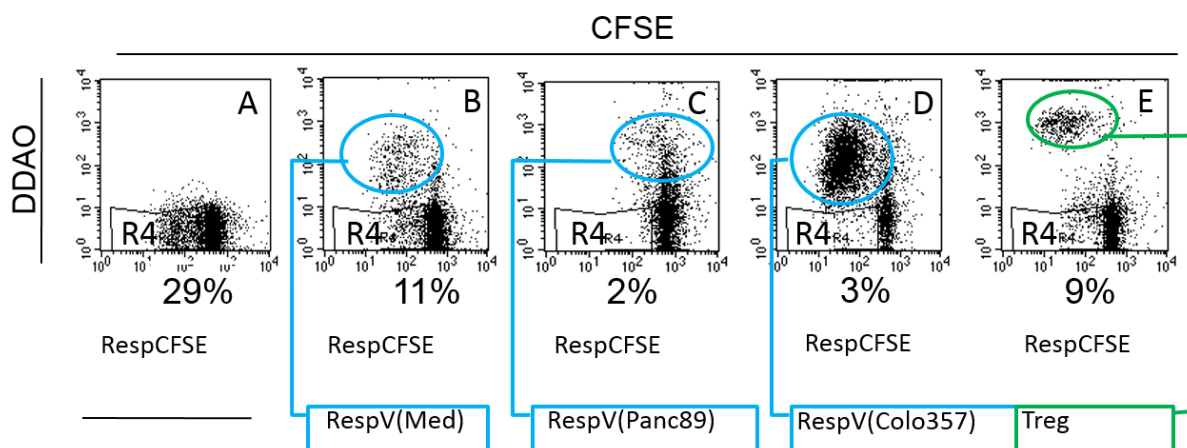


Abbildung 13: Proliferation von frisch isolierten Respondern in Kokultur mit Langzeit TZR-stimulierten Respondern

1×10^5 CFSE markierte, frisch isolierte Responder (RespCFSE) wurden mit MACSiBead CD3/CD28 für 119 Std. alleine, in Anwesenheit von vorinkubierten DDAO-SE markierten Respondern (RespV) oder mit DDAO-SE markierten Treg kultiviert. Die RespV wurden mit Dynal CD3/CD28 Beads für 72 Std. stimuliert, während sie alleine [RespV(Med)], mit Panc89 [RespV(Panc89)] oder mit Colo357 [RespV(Colo357)] für 100 Stunden kokultiviert wurden. Nach Entfernung der Beads wurden die RespV für weitere sieben Tage alleine kultiviert bevor sie mit DDAO-SE markiert wurden. Die CFSE und DDAO-SE-Fluoreszenzintensität wurde am FACSCalibur bestimmt, mit der CellQuestPro II Software analysiert und (A-E) als Punktwolke (CFSE gegen DDAO-SE) dargestellt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die im Fenster R4 ausgegrenzten proliferierenden Zellen. In der Punktwolke B sind die RespV(Med), in C die RespV(Panc89), in D die RespV(Colo357) blau und in E die nTreg grün umrandet.

Zusammenfassend konnten Hinweise auf induzierte suppressive Eigenschaften von Respondern gewonnen werden, die zuvor mit PDAC-Zelllinien inkubiert worden waren. Diese suppressiven Eigenschaften fanden sich sowohl bei bereits in der Kokultur mit PDAC-Zelllinien stimulierten Respondern als auch bei kokultivierten unstimulierten Respondern.

4.6 Reduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen im Aszites

Als weitere wichtige Immunzellen neben Treg spielen in der Tumorbilogie $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen eine entscheidende Rolle, da sie in der Lage sind Tumorzellen selbst zu bekämpfen. Diese Zellen könnten damit einen Ansatzpunkt für zukünftige zellbasierte Immuntherapien darstellen, sofern ihre Immunantwort nicht durch Treg inhibiert wird.

Eine entscheidende Frage war, in welchem Maße $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen bei tumorerekrankten Patienten vorkommen. Hierfür wurden Zellen *ex vivo* aus Aszites im Unterschied zum Blut der Patienten untersucht. Da es im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit nicht möglich war an Aszites von PDAC Patienten zu gelangen, wurde Aszites von Patienten mit vergleichbarem immunsuppressivem Tumormilieu untersucht.

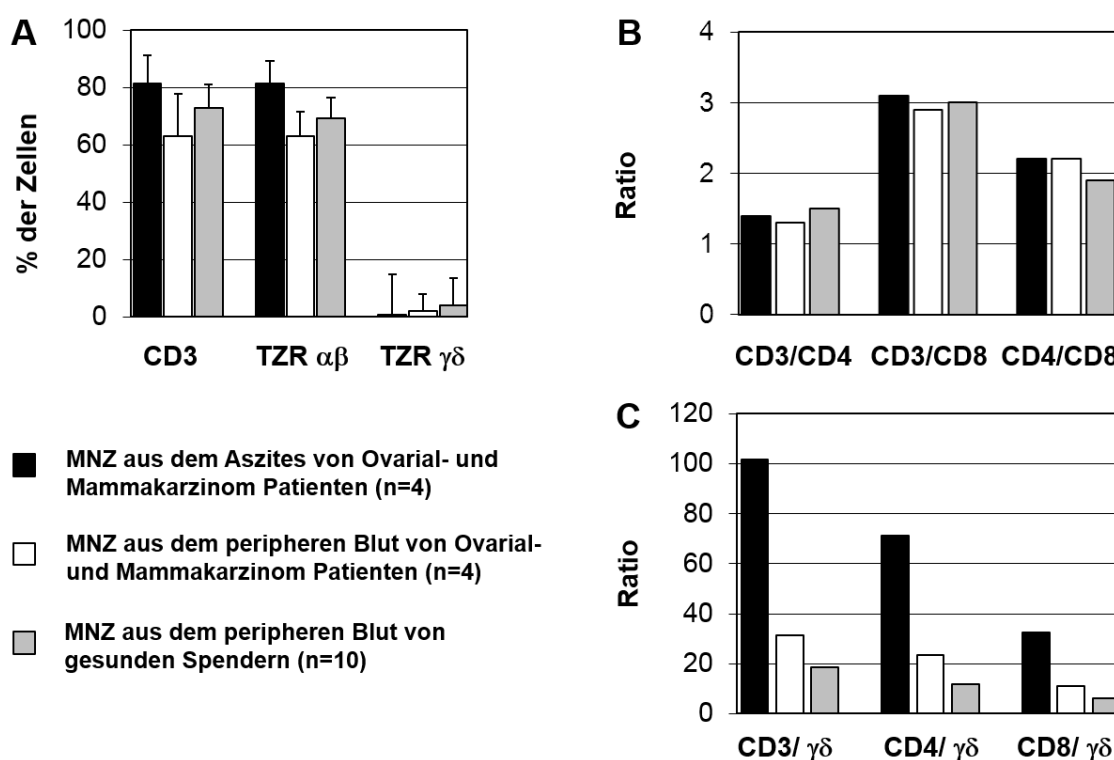


Abbildung 14: $\gamma\delta$ T-Zellen sind im Blut und Aszites von Tumorpatienten reduziert

Der prozentuale Anteil an der $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, TZR $\alpha\beta^+$ und TZR $\gamma\delta^+$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch in den MNZ bestimmt, die aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern und aus dem peripheren Blut oder aus Aszites von Ovarial- und Mammakarzinompatienten gewonnen worden waren. Der Anteil an $CD3^+$, $\alpha\beta^+$ T-Zellen und $\gamma\delta^+$ T-Zellen ist in A als Balkendiagramm dargestellt. Zur Bestimmung der Ratio $CD3/CD4$, $CD3/CD8$ und $CD4/CD8$ in B und $CD3/TZR\text{-}\gamma\delta$, $CD4/TZR\text{-}\gamma\delta$ und $CD8/TZR\text{-}\gamma\delta$ in C wurden die jeweiligen MNZ-Anteile zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Balken in A, B und C zeigen den Mittelwert aus den Experimenten mit 10 gesunden Spendern und 4 Karzinompatienten.

Mononukleäre Zellen (MNZ) wurden zur phänotypischen Charakterisierung aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern und aus dem peripheren Blut oder Aszites von Ovarial- oder Mammakarzinompatienten isoliert. Beim Vergleich der prozentualen Anteile von $CD3^+$ T-Zellen, $\alpha\beta^+$ T-Zellen und $\gamma\delta^+$ T-Zellen in den drei unterschiedlichen MNZ-Frakturen,

wurden keine großen Unterschiede deutlich (Abb. 14A). Ebenfalls sind die Verhältnisse CD3/CD4, CD3/CD8 und CD4/CD8 aus den drei Isolaten vergleichbar (Abb. 14B). Wurden $\gamma\delta$ T-Zellen jedoch im Verhältnis zu CD3, CD4 und CD8 betrachtet, so zeigte sich, dass $\gamma\delta$ T-Zellen am geringsten im Aszites nachzuweisen waren (Abb. 14C). Der größte Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen wurde im Blut von gesunden Spendern gemessen.

NK-Zellen (CD56⁺) und B-Zellen (CD19⁺) waren zu einem geringeren Anteil in den MNZ aus Aszites als in den MNZ aus dem peripheren Blut vertreten (Abb. 15A). Ebenso war das Verhältnis von CD3/CD56 und CD3/CD19 im Aszites erhöht, was auf eine Reduktion von NK-Zellen und B-Zellen im Aszites gegenüber dem peripheren Blut derselben Patienten und dem peripheren Blut gesunder Spender hindeutet (Abb. 15B).

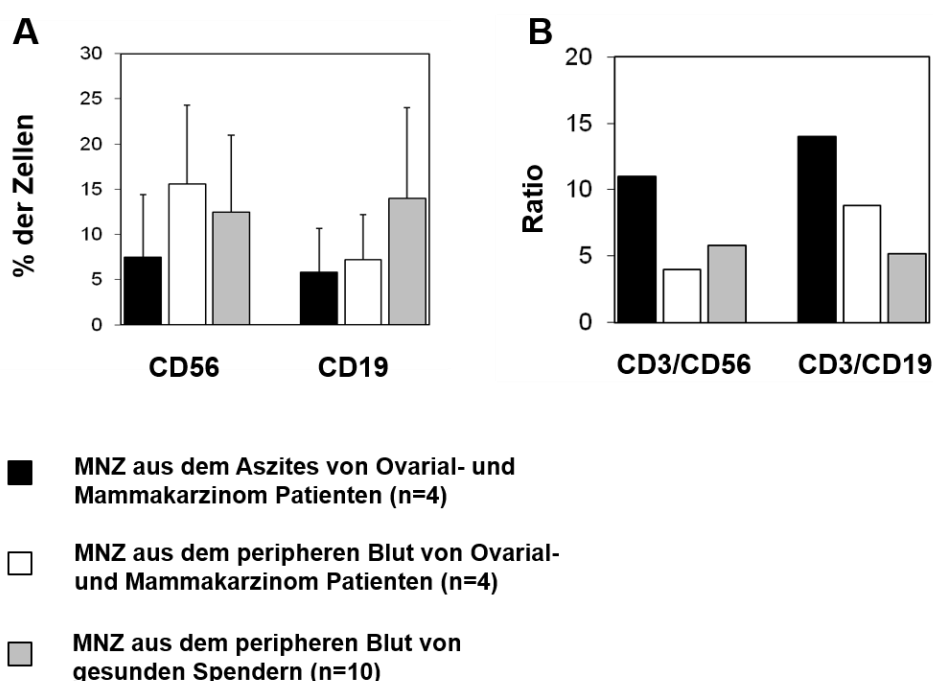


Abbildung 15: Reduktion von NK-Zellen und B-Zellen im Aszites von Ovarial- und Mammakarzinompatienten

Der prozentuale Anteil der Oberflächenmarkern CD3⁺, CD56⁺ und CD19⁺ Zellen wurde durchflusszytometrisch in MNZ bestimmt, die aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern und aus dem peripheren Blut oder aus Aszites von Ovarial- und Mammakarzinompatienten gewonnen worden waren. Der Anteil an CD3⁺, CD56⁺ und CD19⁺ ist in A als Balkendiagramm dargestellt. Zur Bestimmung der Ratio CD3/CD56 und CD3/CD19 wurden die jeweiligen MNZ-Anteile zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Balken in A und B zeigen den Mittelwert von 10 gesunden Spendern und 4 Karzinompatienten.

4.7 Proliferationsvermögen von $\gamma\delta$ T-Zellen aus Aszites

Es wurde weiterhin untersucht, in welchem Ausmaß $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut oder aus dem Aszites von Karzinompatienten *in vitro* expandiert werden können. Dazu wurden MNZ mit BrHPP und IL-2 stimuliert. Nach zehn Tagen wurde der Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen in den MNZ durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem

Aszites im Gegensatz zu den $\gamma\delta$ T-Zellen aus den MNZ derselben Patienten in 4 von 5 Fällen nur sehr eingeschränkt auf die Stimulation reagierten (Abb. 16; siehe auch Shojaei et al. 2009). Ebenso fiel die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut geringer aus als bei gesunden Spendern. Im Falle der Mammakarzinompatienten K1289 zeigten $\gamma\delta$ T-Zellen aus Aszites eine vergleichsweise erhöhte Proliferation gegenüber den $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut. Wurden nTreg aus den MNZ gesunder Spender depletiert, konnte im Vergleich mit den undepletierten MNZ eine leicht gesteigerte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation gemessen werden, wohingegen die Treg Depletion der MNZ aus Aszites zu keiner verbesserten Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen führte (Daten nicht gezeigt).

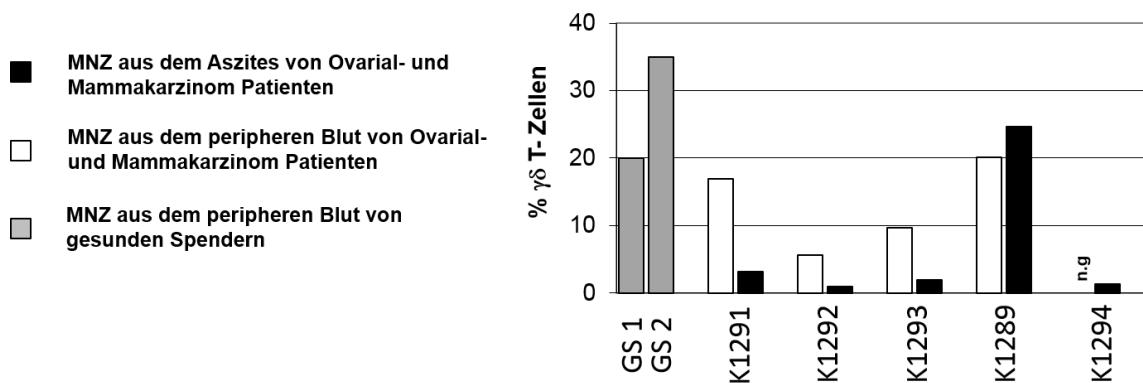


Abbildung 16: Aus Aszites stammende $\gamma\delta$ T-Zellen können nicht proliferieren

MNZ wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern und aus dem peripheren Blut oder aus Aszites von Ovarial- und Mammakarzinompatienten isoliert. MNZ wurden mit BrHPP in Gegenwart von IL-2 stimuliert. Der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde nach zehn Tagen in einer Färbung mit anti-TZR- $\gamma\delta$ durchflusszytometrisch bestimmt. Gesundspender (GS), Ovarial- und Mammakarzinompatienten (K1289-K1294).

5 Diskussion

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind phänotypisch und funktionell gut charakterisierte T-Zellen, die sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und die Hochexpression der IL-2-Rezeptor α -Kette (CD25) sowie funktionell durch die Suppression anderer Effektorzellen auszeichnen. Ihre Bedeutung für die Homöostase des Immunsystems und die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wurde in den letzten beiden Jahrzehnten immer offenkundiger. So spielen Treg eine Rolle bei dem Erhalt der peripheren Toleranz, allergischen Reaktionen, bei Transplantatabstoßung und Schwangerschaft wie auch bei der Tumorentwicklung (Sakaguchi et al., 1995; Wang et al., 2007; Piao et al., 2008; Curotto de Lafaille et al., 2001; Aluvihare et al., 2004; Ha, 2009). Insbesondere scheint hierbei eine Akkumulation bzw. Induktion von Treg im Tumor ein Zeichen für eine schlechte Prognose zu sein, da die Reaktivität tumorspezifischer Effektorzellen durch die Treg unterbunden werden kann (Zou, 2005).

Neben dieser Treg vermittelten Suppression ist von Hinz und Mitarbeitern ein direkter suppressiver Effekt durch FoxP3⁺ Tumorzellen auf die Proliferation frisch isolierter T-Zellen gezeigt worden, der offensichtlich von der FoxP3 Expression abhängig ist (Hinz et al., 2007). In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob dieser suppressive Effekt nicht auch indirekt über die Induktion von Treg vermittelt werden kann.

In einer Kokultur von Respondern und Tumorzellen wurde in dieser Arbeit zuerst die suppressive Funktion der Tumorzellen gegenüber Respondern eingehend untersucht. Eine nähere Charakterisierung der kokultivierten Responder erfolgte über die Bestimmung der CD25 und FoxP3 Expression. Ferner wurde die Expression der Antigene CD80, CD86, Notch- und Jagged-1 auf den Tumorzellen analysiert. Für die vier letztgenannten Antigene ist in der Literatur beschrieben worden, dass sie eine Rolle bei der Induktion von Treg spielen können oder sie, wie im Falle von FoxP3, für die Suppressivität einer Zellpopulation verantwortlich sind (Perez et al., 2008; Vigouroux et al., 2003; Hinz et al., 2007). Es zeigte sich nun, dass CD80 und Jagged-1 nur auf der Burkittlymphomzelllinie Daudi nachgewiesen werden konnte, während FoxP3 von allen anderen untersuchten Tumorzelllinien exprimiert wurde (Tab. 1). Aufgrund der deutlichen Expression von FoxP3 und der gesteigerten Expression von Notch-1 auf Colo357 sowie der erhöhten Expression von CD86 auf Panc89 wurden diese beiden PDAC-Zelllinien in den meisten Experimenten eingesetzt. Hierbei spielte weiterhin eine Rolle, dass bereits Hinz und Kollegen sowohl bei Panc89 als auch Colo357 eine suppressive Funktion gegenüber Respondern nachgewiesen hatten (Hinz et al., 2007).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Colo357 eine wesentlich stärkere Suppression der Responder bewirkte als Panc89 (Abb. 5). Colo357 supprimierte in 6 von 8 Experimenten die Proliferation der Responder, bei Panc89 wurde nur in 3 von 8 Experimenten eine Suppression

der Responder gesehen. In den Experimenten, in denen Panc89 und Colo357 suppressiv wirkten, war die suppressive Wirkung gegenüber den Respondern allerdings sehr ausgeprägt (siehe auch Oberg et al., 2011). Colo357 wirkte nicht nur häufiger suppressiv, sondern zeigte auch in den suppressiven Experimenten eine stärkere Suppression als Panc89 (Oberg et al., 2011). Diese Erkenntnisse deckten sich mit denen der Gruppe um Hinz, die ebenfalls durch Colo357 die deutlichste Suppression beobachteten (Hinz et al., 2007). Ein Grund für die fehlende suppressive Funktion von den Tumorzelllinien könnte sein, dass in den einzelnen Experimenten Responder von unterschiedlichen Spendern verwendet wurden. Ein zu großer Unterschied zwischen dem HLA-Muster des Tumors und den Respondern könnte die inhibitorische Wirkung der Tumorzellen unterbunden haben. Um dies nachzuweisen müsste das HLA-Muster der Tumorzellen und der entsprechenden Responder im Nachhinein bestimmt werden oder neue Experimente mit HLA-typisierten Spendern durchgeführt werden. Beides war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Die selbst generierte Ovarialkarzinomzelllinie K1290 konnte in keinem der durchgeführten Experimente eine Suppression der CD4⁺CD25⁻ Zellen bewirken. Ebenfalls zeigte sie nur eine marginale oder fehlende Expression von den Oberflächenmarkern CD80, CD86, Notch- und Jagged-1, während FoxP3 von der Tumorzelllinie deutlich exprimiert wurde. In 9 von 10 Tumorzelllinien konnte FoxP3 nachgewiesen werden (Tab. 1). Dieses Ergebnis allein spricht jedoch noch nicht für eine bedeutende Rolle von FoxP3 in Tumorzellen. So berichten Chen und Kollegen über ihre Ergebnisse im Mausmodell, dass FoxP3 in Epithelien von vielen verschiedenen Organen des Körpers exprimiert wird (Chen, et al., 2008). In unseren Daten wurde kein Anhaltspunkt dafür gefunden, dass die FoxP3 Expression in Tumorgewebe generell mit einer Suppressivität gegenüber Respondern einhergehen muss. So konnte die Ovarialkarzinomzelllinie K1290 die Responder in ihrer Proliferation nicht einschränken, obwohl sie FoxP3 exprimierte. Hinz und Kollegen berichteten hingegen, dass die FoxP3 Expression maßgeblich für die Suppressivität der PDAC-Zelllinien von Bedeutung ist. So verloren dort die Tumorzellen ihre suppressive Funktion, wenn FoxP3 durch siRNA herunterreguliert wurde (Hinz et al., 2007). Des Weiteren wurde FoxP3 in Pankreasadenokarzinomen im Vergleich mit gesundem Pankreasgewebe gesteigert exprimiert. Die Gruppe um Karanikas untersuchte ebenfalls die FoxP3 Expression in verschiedenen Tumorzelllinien und kam zu dem Ergebnis, dass die FoxP3 mRNA und Protein Expression mit der Expression von TGF- β 1 und IL-10 in den Tumorzelllinien korrelierte (Karanikas et al., 2008). Dies ist insofern interessant, weil TGF- β 1 und IL-10 immunsuppressive Zytokine darstellen und die Suppressivität von FoxP3⁺ Tumorzelllinien gegenüber Respondern erklären könnte.

Mittlerweile sind andere Forschergruppen zu gänzlich gegensätzliche Ansichten bezüglich der Rolle von FoxP3 in Tumorgewebe gekommen. Bereits Hinz und Kollegen schlossen nicht aus, dass die FoxP3 Expression auch deshalb in Tumorgewebe nachgeweisbar sein könnte, falls

sie den Tumoren einen Überlebensvorteil bieten würde (Hinz et al., 2007). So reguliert FoxP3 intrazellulär die Phosphodiesterase 3B (PDE3B) in Treg herunter, was entscheidend für die Vitalität der Treg ist. Die Re-Expression von PDE3B führte zur negativen Beeinflussung der Biosynthese der Treg sowie der FoxP3 abhängigen Proliferation und Genexpression (Gavin et al., 2007). FoxP3 wird allerdings auch in Karzinomen als Tumorsuppressorgen angesehen (Redpath et al., 2011). So führten FoxP3 Keimbahnmutationen zu einer gesteigerten Anzahl an Tumoren, insbesondere zu Mammakarzinomen, im Mausmodell (Zuo et al., 2007). In gesunden Brustepithelzellen oder Prostataadrüsen wird FoxP3 exprimiert, während es in Mamma- oder Prostatakarzinomen herunterreguliert ist (Zuo et al., 2007; Wang et al., 2009). Eine fehlende Expression von FoxP3 in Ovarialkarzinomen und eine gesteigerte Expression in gesundem Ovarialgewebe beobachteten ebenfalls die Gruppe um Zhang (Zhang und Sun, 2010). Darüber hinaus berichteten sie, dass die FoxP3 Hochregulation die Zellproliferation, Zellmigration und Zellinvasion inhibiert hat (Zhang und Sun, 2010).

Neben der Charakterisierung der Tumorzellen wurden in den Versuchsreihen der vorliegenden Studie auch die Responder auf deren Expression von CD25 und FoxP3 nach der Kokultur untersucht. Die Charakterisierung der kokultivierten Responder, die über den TZR stimuliert wurden, zeigte eine deutliche Expression von FoxP3 (Abb. 6A und Abb. 12) wie auch von CD25 (Daten nicht gezeigt). Dabei exprimierten RespV(Med) und RespV(Panc89) FoxP3 und CD25 in ähnlich starkem Ausmaß, während die Expression bei RespV(Colo357) geringer ausfiel. Die Aktivierung durch den TZR-Stimulus könnte hierbei die CD25 und FoxP3 Expression in den vormals CD25⁻ und FoxP3⁻ T-Zellen induziert haben (Walker et al., 2003; Ziegler, 2006; Wang et al., 2007). Die beobachtete CD25 Expression korreliert mit der FoxP3 Expression positiv, wie bereits Walker und Kollegen beschrieben haben (Walker et al., 2003). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass FoxP3 unter anderem auch ein Transkriptionsaktivator für CD25 darstellt, wie Chen und Mitarbeiter berichteten, und somit die vorgefundene Korrelation erklären würde (Chen et al., 2006). Die stimulierten RespV wiesen in unseren Experimenten mit der Expression von CD25 und FoxP3 die klassischen Marker für nTreg auf. Die Gruppe um Walker schloss des Weiteren aus ihren Experimenten, dass im peripheren Blut zirkulierende CD4⁺CD25⁺ T-Zellen funktionelle Ähnlichkeit zu *in vitro* TZR stimulierten CD4⁺CD25⁻ haben (Walker et al., 2003). Die verminderte Expression von FoxP3 und CD25 der RespV(Colo357) im Vergleich mit RespV(Panc89) und RespV(Med) lässt den Schluss zu, dass es in unserer Versuchsreihe zu einer unzureichenden Zellaktivierung von RespV(Colo357) durch den TZR-Stimulus gekommen ist. Diese würde auch die beobachtete Proliferationsinhibition von RespV(Colo357) durch Colo357 erklären. Hinz und Kollegen berichteten hingegen von einer Aktivierung der RespV(Panc89), wenn die Responder durch Panc89 supprimiert wurden (Hinz et al., 2007). Wir haben leider keine Daten zur FoxP3 und CD25 Expression von RespV(Panc89) zu den drei Experimenten, in denen Panc89 eine

Suppression bewirkte, sondern nur zu den Experimenten, bei denen keine Suppression durch Panc89 gemessen wurde. Bei Letzterem kam es sowohl zu einer deutlichen FoxP3 (Abb. 6A und 12) als auch CD25 Expression auf RespV(Panc89) (nicht gezeigt). Die Suppressivität von Panc89 scheint somit nicht auf einer unzureichenden Zellaktivierung der RespV, wie vermutlich bei Colo357, zu beruhen.

Die weiterhin durchgeführte Bestimmung von CD28 auf den RespV belegte, dass RespV(Colo357) und RespV(Panc89) nach einem TZR-Stimulus im Gegensatz zu RespV(Med) keine oder keine gesteigerte CD28 Expression aufwiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob die RespV(Panc89) oder RespV(Colo357) supprimiert worden waren. In T-Zellen nimmt CD28 eine wichtige Funktion für die Aktivierung der Zellen ein. So versorgt CD28 naive T-Zellen mit einem kostimulatorischen Signal, das sie zur Produktion von IL-2 anregt, Anergie und Zelltod verhindert und für T-Zellexpansion verantwortlich ist (Salomon und Bluestone, 2001). Weiterhin zeigte die Gruppe um Semple kürzlich, dass eine zu starke CD28 Kostimulation die Induktion von iTreg durch TGF- β in Mausexperimenten verhindern kann (Semple et al., 2011). Da in unseren Versuchsreihen die fehlende CD28 Expression der Responder unabhängig von der Suppressivität der Tumorzellen war, scheint die verminderte Expression von CD28 nicht für die Suppression der RespV(Colo357) und RespV(Panc89) verantwortlich gewesen zu sein. Erhielten die Responder in der Kokultur keinen TZR-Stimulus, so exprimierten RespV(Colo357) und RespV(Med) nur geringfügig FoxP3 oder CD25 (Abb. 6B und 7, Daten für CD25 nicht gezeigt). Unstimulierte Resp(Panc89) zeigten im Gegensatz zu RespV(Colo357) und RespV(Med) die stärkste FoxP3 Expression (Abb. 6B). Interessanterweise wird jedoch in der Literatur ein TZR-Stimulus als unabdingbar für eine Induktion von FoxP3 vorausgesetzt (Selvaraj und Geiger, 2007). Die MHC-Klasse-II-Moleküle sind unter physiologischen Bedingungen für die Aktivierung von CD4⁺ Respondern notwendig und werden normalerweise von APZ oder aktivierten T-Zellen exprimiert. MHC-Klasse-II-Moleküle werden auch von Colo357 exprimiert (Daten nicht gezeigt), aber nicht von Panc89, so dass nur eine T-Zellaktivierung durch Colo357 stattgefunden haben könnte. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die Kokultur mit Respondern die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf Panc89 triggern könnte. Dies steht lediglich zur Diskussion und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt.

Neben der Charakterisierung von RespV wurde weiterhin untersucht, ob diese Zellen möglicherweise eine suppressive Funktion gegenüber frisch isolierten CD4⁺CD25⁻ Zellen besitzen, was für eine Induktion von iTreg sprechen würde. Unter dieser Fragestellung wurde daraufhin ein Suppressionsansatz etabliert, der sich zeitlich an die Tumorzellkokultur anschloss. Responder, die zuvor ohne TZR-Stimulus mit Panc89 oder Colo357 in Kokultur oder alleine im Medium waren, wurden dazu in einem Suppressionsansatz mit frisch isolierten

CD4⁺CD25⁻ T-Zellen auf ihre suppressive Eigenschaft hin getestet. Es wurde besonderer Wert auf einen gewährleisteteten Zellkontakt im Suppressionsansatz gelegt, da Hinz und Kollegen diesen als Voraussetzung für die von ihnen beobachtete Suppressivität von Panc89 und Colo357 ansahen (Hinz et al., 2007). Sowohl Panc89 wie auch Colo357 produzierten zwar immunsuppressives TGF- β , doch wurde die Suppression der Responder durch Tumorzellen aufgehoben, sobald sich eine semipermeable Membran zwischen den einzelnen Zellpopulationen befand. In diesen sogenannten Transwellexperimenten zeigten Hinz und Mitarbeiter die Notwendigkeit des zellulären Kontaktes zwischen Tumorzellen und Respondern für die suppressive Funktion der Tumorzellen (Hinz et al., 2007). In einem Experiment, in dem die Responder in der Tumorzellkokultur einen TZR-Stimulus erhielten (Abb. 13), und in einem Experiment ohne TZR-Stimulus zeigten sich in vorliegender Arbeit deutliche Hinweise für eine Induktion von iTreg (Abb. 8; siehe auch Oberg et al., 2011). In Abb. 8 ist die Suppression der frisch isolierten Resp(CFSE) Zellen durch RespV(Colo357) und RespV(Panc89) zu sehen, wobei die RespV zuvor in der Tumorzellkokultur keinen TZR-Stimulus erhalten hatten. RespV(Med) wiesen diese suppressive Funktion nicht auf. Es galt nun zu eruieren, um welche Art von suppressiven T-Zellen es sich bei RespV(Colo357) und RespV(Panc89) in Abb. 8 handeln könnte. In der Literatur werden iTreg in Tr1 und T_H3-Zellen unterteilt (Workman et al., 2009). Eine Induktion von T_H3-Zellen geht mit einer Expression von CD25 und FoxP3 einher (Chen et al., 2003). Weder RespV(Colo357) noch RespV(Panc89) wiesen jedoch eine starke Expression von CD25 und FoxP3 auf (Abb. 6B und 7). Werden aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen Tr1 induziert, so zeigen diese Tr1 hingegen keine verstärkte Expression von FoxP3 (Vieira et al., 2004). Levings und Kollegen beobachteten hingegen, dass die FoxP3 Expression von Tr1 nach einer Kokultur mit IL-10 produzierenden APZ gegenüber frisch isolierten Respondern erhöht war, was auf eine Zellaktivierung zurückgeführt wurde (Levings et al., 2005). Die FoxP3 Expression war so deutlich wie bei frisch isolierten nTreg (Levings et al., 2005). Zudem können Responder durch IL-10 und einen TZR-Stimulus, durch eine Kokultur mit IL-10 produzierenden APZ oder durch eine Kokultur mit nTreg und TZR-Stimulus zu Tr1 konvertiert werden (Battaglia et al., 2006; Levings et al., 2005; Dieckmann et al., 2002). Ob Colo357 oder Panc89 IL-10 produzieren ist bisher noch nicht untersucht worden. Interessanterweise beschrieben von Bernstorff und Kollegen, dass Pankreastumore neben TGF- β auch vermehrt IL-10 sezernieren (von Bernstorff et al., 2001). Fraglich bleibt zu diesem Zeitpunkt, ob die strikte Notwendigkeit für einen TZR-Stimulus für die Induktion von Tr1 oder T_H3-Zellen besteht, da der TZR-Stimulus, wie oben bereits beschrieben, nach bisherigem Verständnis nicht in der Kokultur mit Panc89 ohne exogen zugeführte TZR-Stimuli ablaufen konnte. Wäre ein TZR-Stimulus in der Kokultur erfolgt, hätte man zudem auch eine höhere FoxP3 Expression erwartet. Für weitere Untersuchungen der potenziellen iTreg sollte die Zytokinsekretion, insbesondere von IL-10 und TGF- β , im Vordergrund stehen. Über das

Zytokinfreisetzungsmuster könnten die RespV einem der bisher bekannten Subpopulationen von iTreg zugeordnet werden. Dies könnte man in weiterführenden Experimenten näher untersuchen.

Es muss weiterhin in Erwägung gezogen werden, dass die beschriebene Suppression der RespV(Panc89) und RespV(Colo357) nicht durch regulatorische Funktionen der T-Zellen, sondern durch methodische Einflüsse bedingt gewesen sein könnte. So könnten sich im Suppressionansatz unerwünschte Tumorzellen befunden und einen Effekt auf die Proliferation der frisch isolierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen gehabt haben. Um die RespV aus der Tumorzellkokultur zu isolieren, mussten die RespV von den adhärent wachsenden Tumorzellen abgespült werden. Bei diesem Prozess könnte es zu einer stellenweisen Ablösung von Tumorzellen gekommen sein, so dass die Tumorzellen ebenfalls in den Suppressionsansatz gelangten. Die Menge an abgelösten Tumorzellen dürfte jedoch keine relevante Größenordnung gehabt haben, da der Suppressionsansatz regelmäßig mikroskopisch kontrolliert wurde. Hier war keine Ansammlung von Tumorzellen, die sich auch aufgrund ihrer Größe von T-Zellen unterscheiden, zu beobachten. Zudem konnten nur sehr geringe Mengen kontaminierender Tumorzellen bei der durchflusszytometrischen Analyse in der FSC/SSC-Punktwolke detektiert werden. Insgesamt kann der Einfluss durch Tumorzellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Die größte Herausforderung an die Reproduktion der Ergebnisse war vielmehr die Messung der Proliferation/Suppression des CFSE-Suppressionsansatzes. So konnten die RespV und RespCFSE nicht in jedem Experiment sicher voneinander abgegrenzt werden, was jedoch für die Proliferationsbestimmung der RespCFSE zwingend erforderlich war. Zur Markierung der RespCFSE wurde CFSE verwendet, das sich bei Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterpopulationen verteilt und durch die damit einhergehende Fluoreszenzabnahme eine Proliferationsmessung ermöglichte (Abb. 4). Jedoch sank die Fluoreszenzintensität des CFSE über den mehr als vier Tage dauernden Experimentenzeitraum teilweise in dem Maße ab, dass die nicht markierten RespV über eine ähnlich hohe Eigenfluoreszenz verfügten wie die CFSE markierten RespCFSE (Abb. 9). Zur Lösung dieses methodischen Problems wurden die RespV mit dem Farbstoff DDAO-SE markiert. DDAO-SE verhält sich ähnlich dem CFSE, aber emittiert statt grünem rotes Licht. Die Doppelmarkierung innerhalb der Kokultur lieferte die bisher nicht publizierte aber problematische Erkenntnis, dass entweder CFSE oder DDAO-SE sich nicht nur auf die Tochterpopulationen verteilte, sondern auch auf andere, nicht markierte Zellen in einer Kokultur übertragen wurde (Abb. 10B), insbesondere, wenn die Kokultur länger als vier Tage andauerte. Um eine alternative und hinreichende Differenzierung mit DDAO-SE zu gewährleisten, war andererseits eine solch hohe Konzentration an DDAO-SE notwendig, so dass der Farbstoff zelltoxisch wirkte (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Falle von zwei frisch isolierten Zellpopulationen in der Kokultur, wie beispielsweise frisch isolierten RespCFSE und

frisch isolierten nTreg, konnten die Populationen immer klar voneinander abgegrenzt werden (Abb. 8E und 9E). Ebenfalls war eine Differenzierung der Zellpopulationen möglich, wenn die Responder bereits in der vorhergehenden Kokultur mit Tumorzellen eine TZR-Stimulation erhalten hatten (Abb. 11). In diesem Fall scheint die beobachtete starke Suppressivität der stimulierten RespV gegenüber den RespCFSE zur besseren Differenzierung beigetragen zu haben.

Responder, die in der Vorkultur über den TZR stimuliert wurden, zeigten in allen Suppressionsansätzen eine gesteigerte Proliferation und zugleich eine starke Suppression der RespCSFE. Diese Suppression war unabhängig davon, ob die RespV zuvor mit oder ohne Tumorzellen kultiviert worden sind (Abb. 11). Wie bereits erläutert, exprimierten alle RespV, die in der Kokultur mit Tumorzellen einen TZR-Stimulus erhalten hatten, FoxP3 und CD25, wobei das Ausmaß der Expression von der jeweiligen Tumorzellkokultur abhängig war (Abb. 6A und 12). Unterschiede zwischen aktivierten T-Zellen und nTreg konnten in unserer Methodik nur in Bezug auf die Proliferation festgestellt werden. Periphere, im Blut zirkulierende CD4⁺CD25⁺ Treg stellten eine anerge Zellpopulation dar, während die TZR-stimulierten RespV eine deutliche Zellproliferation zeigten, was aus der Größenzunahme im FSC geschlussfolgert werden konnte (Abb. 11B bis D). Die gemessene Suppressivität der aktivierten RespV kann damit begründet werden, dass die vorinkubierten RespV das Zytokin IL-2 wesentlich besser verarbeiten konnten als frisch isolierte Responder. Der IL-2-Rezeptor besteht aus drei Komponenten, einer α -Kette, einer β -Kette und einer γ -Kette. Die α -Kette, auch CD25 genannt, macht den IL-2-Rezeptor aber erst hoch affin zu IL-2 (Boyman et al., 2006). Die RespV, die in der Kokultur bereits einen TZR-Stimulus erhalten hatten, exprimierten CD25 sehr ausgeprägt und konnten somit IL-2 wesentlich besser binden, wie dies auch von Malek berichtet wurde (Malek, 2008). Gleichzeitig entzogen sie aber auch den RespCFSE IL-2. Da CD4⁺ T-Zellen IL-2 als Wachstumsfaktor benötigen, kann deren Proliferationsinhibition mit dem Entzug von IL-2 begründet werden. Dieser Mechanismus lässt sich beispielsweise dadurch beweisen, indem man dem Suppressionsansatz exogenes IL-2 hinzufügt, woraufhin die suppressive Funktion der aktivierten RespV aufgehoben wird. Auch Treg können CD4⁺ T-Zellen unter anderem über den Entzug von IL-2 supprimieren. Treg verfügen im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen aber über weitere suppressive Funktionen wie z. B die Sekretion von IL-10 und TGF- β (Feinerman et al., 2010; von Boehmer, 2005). Zum Nachweis, ob der Entzug von IL-2 verantwortlich für die Suppression war, wurde die Methodik dahingehend erweitert, dass die voraktivierten RespV, nachdem sie aus der Tumorzellkokultur isoliert worden sind, für weitere sieben Tage alleine weiter kultiviert wurden (erweiterte Kultur). Erst anschließend wurden die RespV in den Suppressionansatz eingesetzt. Aktivierte Responder exprimieren CD25 nur transient. Wird CD25 nicht mehr von den TZR stimulierten RespV exprimiert, so sollte der IL-2-Entzug einen geringeren Einfluss auf die Proliferation der RespCFSE besitzen. Allan und seine Mitarbeiter

bestimmten die Expression von FoxP3 in zuvor stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach sieben und nach 14 Tagen, wobei eine deutliche Abnahme der FoxP3 und CD25 Expression festzustellen war (Allan et al., 2007). Interessanterweise wiesen im Suppressionsansatz der vorliegenden Arbeit nicht mehr alle RespV, die aus der erweiterten Kultur kamen, eine suppressive Funktion auf. Während die RespV(Med) keine Inhibition der RespCFSE mehr bewirkten, blieb der suppressive Effekt durch RespV(Colo357) und RespV(Panc89) bestehen (Abb. 13).

Eine bemerkenswerte Beobachtung ist weiterhin, dass sowohl die RespV(Med) wie auch die RespV(Panc89) im Gegensatz zu RespV(Colo357) kaum noch zu detektieren waren. Zur Erklärung dieser Beobachtung müssen verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen werden. So sind die fehlenden RespV(Med) und RespV(Panc89) dadurch zu erklären, dass die Zellen durch den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) gestorben sein könnten, nachdem sie mehr als 17 Tage in Kultur waren und wiederholt stimuliert wurden. T-Zellen benötigen kontinuierlich Überlebenssignale in Form von Zytokinen (Rathmell und Thompson, 2002). Diese Zytokine waren vermutlich nicht mehr im ausreichenden Umfang vorhanden. Wang und Kollegen haben festgestellt, dass bereits seit einer Woche stimulierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach erneuter Stimulation nur noch sehr vermindert Zytokine wie IL-2, TNF- α und INF- γ ausschütteten (Wang et al., 2007). Die hohe Anzahl an RespV(Colo357) im Suppressionsansatz kann mit einer fehlenden Aktivierung in der Tumorzellkultur begründet werden. Im späteren Suppressionsansatz könnten viele ResV(Colo357) erst durch den hier erneut präsentierten TZR-Stimulus aktiviert worden sein und proliferiert haben. Eine Folge der erst im Suppressionsansatz erfolgten Aktivierung und Proliferation von ResV(Colo357) könnte die gemessene, weiterhin erhöhte Anzahl an RespV(Colo357) gewesen sein (Abb. 13D).

Die beobachtete Suppression der RespCFSE kann sicherlich zum Teil auf die Apoptose der RespV zurückgeführt werden. Im Suppressionsansatz fehlten diesbezüglich phagozytierende Zellen, die die apoptotischen Zellen hätten aufnehmen können. Apoptotische Zellen können sich negativ auf die Proliferation und die Zellfunktionen vitaler Zellen auswirken. So berichteten Gregory und Mitarbeiter, dass apoptotische Zellen die Antikörperproduktion von B-Zellen stark inhibierten und die Antikörperproduktion durch die Entfernung der apoptotischen Zellen verdoppelt werden konnte, was unter anderem auf eine Zellwachstumsinhibition durch die apoptotischen Zellen auf die benachbarten Zellen zurückgeführt wurde (Gregory et al., 2009; Gregory und Pound, 2010). Es ist auch vorstellbar, dass apoptotische Prozesse *in vitro* sogar zur Zelltodinduktion führen. Allerdings erklären die apoptotischen Zellen nicht, warum die RespCFSE nicht durch RespV(Med) in ihrer Proliferation inhibiert wurden, da die RespV(Med) ebenfalls apoptierten (Abb. 13B). RespV(Med) wurden durchflusszytometrisch ebenfalls nur noch in einer deutlich reduzierten Anzahl gemessen. Man kann davon ausgehen, dass RespV(Colo357) und RespV(Panc89) in der erweiterten Kultur über suppressive Funktionen

verfügten, die sich nicht mit IL-2-Entzug begründen lassen, womit sie als iTreg bezeichnet werden könnten. Da die beschriebenen RespV(Colo357) und RespV(Panc89) in der Kokultur über den TZR stimuliert wurden, könnten eine Reihe von Mechanismen für die Induktion zu iTreg verantwortlich gemacht werden. So könnten Responder zu T_H3-Zellen durch TGF- β und TZR-Stimulation oder zu Tr1 durch IL-10 und TZR-Stimulation konvertiert worden sein. Auch hier wäre ein Zytokinexpressionsmuster die aufschlussreichste Möglichkeit die Zellen näher zu charakterisieren.

Gegen die Induktion von iTreg in den RespV(Colo357) spricht die möglicherweise erst im Suppressionsansatz erfolgte Aktivierung der RespV(Colo357). Somit könnte ein größerer Anteil von RespV(Colo357) noch in dem Suppressionsansatz CD25 exprimiert haben, was nach wie vor die Suppression der RespCFSE über den IL-2-Entzug ermöglicht hätte. Abschließend galt zu klären, ob eine etwaige Induktion von iTreg für die beobachtete Suppressivität der PDAC-Zelllinien gegenüber Respondern in den Kokulturexperimenten verantwortlich war. iTreg, die durch Panc89 induziert wurden, können nur unter Einschränkungen für die Suppressivität von Panc89 verantwortlich gemacht werden. So wäre zu erwarten, dass keine Induktion von iTreg zu beobachten ist, wenn Panc89 unfähig ist Responder zu supprimieren. Doch in den Experimenten, wo eine mögliche Induktion von iTreg durch Panc89 gesehen wurde, wurden die Responder des gleichen Spenders in der Kokultur zuvor von Panc89 nicht supprimiert. Die Diskrepanz zwischen der fehlenden Tumorsuppressivität von Panc89 und gleichzeitiger Induktion von iTreg war unabhängig davon, ob die iTreg mithilfe exogen zugeführten TZR-Stimuli generiert wurden oder nicht.

In den Experimenten, in welchen eine Induktion von iTreg durch Colo357 gesehen wurde, konnte auch eine Suppression von Respondern durch Colo357 in der Kokultur beobachtet werden, was eine große Relevanz der iTreg für die Suppressivität von Colo357 nahelegt. Dies mag aber auch damit begründet sein, dass Colo357 regelmäßiger eine Suppression zeigte. Es ist anzunehmen, dass ein Teil der Suppressivität, insbesondere von Colo357, über die Induktion von iTreg vermittelt wird, dass aber die PDAC-Zelllinien darüber hinaus über weitere direkte suppressive Funktionen verfügen.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auch auf gynäkologische Tumore, im Speziellen auf Ovarialkarzinome, deren schlechte Prognose unter anderem ebenfalls mit einer lokalen Immunsuppression einhergehen könnte, wie Santin und Kollegen berichteten (Santin et al., 2004). Zur Untersuchung der immunologischen Situation in Ovarial- und Mammakarzinomen wurden von vier Ovarialkarzinompatienten und zwei Mammakarzinompatienten Pleuraergüsse oder Aszites gewonnen und die zellulären Bestandteile untersucht. Dabei wurde insbesondere das Vorkommen von $\gamma\delta$ T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und B-Zellen in den Patientenmaterialien ermittelt, da alle drei Zellpopulationen in der Lage sind Tumore *in vivo* zu bekämpfen. Außerdem wurden die

proliferativen Fähigkeiten von isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen aus Aszites und peripherem Blut sowohl von gesunden als auch von Krebspatienten untersucht um Rückschlüsse auf die Suppressivität von gynäkologischen Tumoren zu ziehen. Bei Patienten mit Ovarial- und Mammakarzinomen konnten wir zeigen, dass das Verhältnis von CD3, CD4 und CD8 T-Zellen zu $\gamma\delta$ T-Zellen im Aszites im Vergleich zum peripheren Blut der Patienten und von gesunden Spendern am größten war (Abb. 14C). Dies bedeutete, dass $\gamma\delta$ T-Zellen im Aszites und im Blut von Ovarial- und Mammakarzinompatienten unterrepräsentiert waren (siehe auch Shojaei et al., 2009). Die Gruppe um Kunzmann konnte bei der Untersuchung des Prozentsatzes an $V\delta 2^+$ T-Zellen im peripheren Blut von 336 unterschiedlichen Tumorpatienten und gesunden Spendern keinen Unterschied feststellen (Kunzmann et al. 2009). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit handelte es sich bei den von Kunzmann und Kollegen untersuchten Tumoren jedoch um keine Ovarialkarzinome und um nur vier Brustkarzinompatienten. In der Studie von Kunzmann sind zudem die dort beschriebenen Tumorentitäten über mindestens drei Monate nicht chemotherapeutisch behandelt worden, während sich in den hier diskutierten Daten bis auf eine Ausnahme alle Patienten in einer chemotherapeutischen Behandlung befanden.

Die interessante Beobachtung dieser Arbeit, dass $\gamma\delta$ T-Zellen im Aszites reduziert waren, war der Anlass zur funktionellen Untersuchung verbliebener $\gamma\delta$ T-Zellen. $\gamma\delta$ T-Zellen, die aus Aszites gewonnen wurden, proliferierten in 3 von 4 Experimenten *in vitro* wesentlich schlechter mit BrHPP und IL-2, als die $\gamma\delta$ T-Zellen, die aus dem peripheren Blut derselben Patienten stammten (Abb. 16; siehe auch Shojaei et al., 2009). Die reduzierte Fähigkeit zur Proliferation könnte auf das Tumormilieu zurückzuführen sein, in dem Chemotherapeutika und immunsuppressive Zytokine wie TGF- β oder IL-10 wirkten. Antigenpräsentierende Zellen könnten wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen reduziert und/oder funktionell eingeschränkt sein. Unsere eigenen Daten zeigen, dass B-Zellen im Aszites reduziert sind (Abb. 15). Weiterhin wäre es vorstellbar, dass $\gamma\delta$ T-Zellen im Aszites eine erhöhte Apoptosesensitivität zeigen (Shojaei et al., 2009). $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der PBMC von Tumorpatienten proliferierten schlechter als $\gamma\delta$ T-Zellen von gesunden Spendern. Ebenso stellten Kunzmann und Kollegen eine Proliferationsinhibition der $\gamma\delta$ T-Zellen aus peripherem Blut von Tumorpatienten fest (Kunzmann et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass die Proliferationseinschränkung von $\gamma\delta$ T-Zellen ein generelles Problem bei Patienten mit einem Tumorleiden oder bestimmten Tumorstufen sein kann (Kunzmann et al., 2009).

Das geringere Vorkommen von $\gamma\delta$ T-Zellen und das nicht adäquate Ansprechen auf Proliferationsreize im Aszites ließ die Frage aufkommen, ob Treg dafür mitverantwortlich sein könnten. Daher wurden in den vorliegenden Experimenten aus MNZ, die aus Aszites isoliert worden waren, nTreg mittels des CD25⁺ Markers depletiert. Die Depletion der Treg resultierte

jedoch nicht in einer Proliferationssteigerung der $\gamma\delta$ T-Zellen (Daten nicht gezeigt; siehe auch Shojaei et al., 2009). Die Proliferation fiel nach der Depletion der nTreg sogar deutlich geringer aus als bei den nicht nTreg depletierten MNZ aus Aszites. Wurden hingegen nTreg aus MNZ gesunder Spender depletiert, so konnte eine deutlich gesteigerte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden. Kunzmann und Kollegen berichteten, dass nTreg $\gamma\delta$ T-Zellen supprimieren können (Kunzmann et al., 2007). Eine Depletion der nTreg aus MNZ von Tumorpatienten bewirkte dort eine verbesserte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen. In der Kunzmann-Studie wurden die MNZ jedoch ausschließlich aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten untersucht und nicht wie in unseren Experimenten aus Aszites, so dass im Aszites die inhibitorischen Effekte von Treg auf $\gamma\delta$ T-Zellen hinterfragt werden müssen.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die $\gamma\delta$ T-Zellen aus Aszites nach einer Restimulation eine gesteigerte Proliferation zeigten (Daten nicht gezeigt). In den nTreg depletierten MNZ aus Aszites konnte auch nach Restimulation keine deutliche $\gamma\delta$ T-Zellproliferation gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die somit anhaltende Proliferationsinhibition der $\gamma\delta$ T-Zellen nach nTreg Depletion könnte dadurch erklärt werden, dass die CD25⁺ Zellen im Aszites eine andere Zellpopulation repräsentierten wie die CD25⁺ Zellen in den MNZ des peripheren Blutes. So könnten sich im Aszites vornehmlich nicht nTreg befunden haben, sondern stattdessen CD25⁺ aktivierte T-Zellen, die eine proliferationsfördernde Wirkung auf die $\gamma\delta$ T-Zellen hatten, in dem sie IL-2 produzierten, das durch die Depletion aktivierter T-Zellen gefehlt hätte. Aufschluss über diese Vermutungen könnte eine Kokultur der $\gamma\delta$ T-Zellen mit den aus Aszites isolierten CD25⁺ Zellen geben. Zusammenfassend ergänzen unsere Ergebnisse die bereits sehr umfangreichen Daten von Kunzmann und Kollegen, dass die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen, die von uns aus malignem Aszites von Ovarial- und Mammakarzinompatienten generiert worden sind, eingeschränkt war (Kunzman et al. 2009; Shojaei et al., 2009). Die Wirkung von CD25⁺ Zellen aus Aszites auf $\gamma\delta$ T-Zellen bleibt, wegen der zum Teil beobachteten Proliferationsinhibition von $\gamma\delta$ T-Zellen nach CD25⁺ Depletion, zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

Zudem konnten im Aszites im Verhältnis zu peripherem Blut von gesunden und Ovarial- sowie Mammakarzinompatienten weniger CD16⁺CD56⁺ NK-Zellen oder CD19⁺ B-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 15). In der Literatur ist bereits beschrieben, dass NK-Zellen häufig vermindert in Tumorgewebe anzutreffen sind. So konnte durch Gulubova und Kollegen bei Kolon- und Magentumoren ein Einfluss von Lebermetastasen auf das Vorkommen von NK-Zellen in der Leber gezeigt werden. Befanden sich Metastasen in der Leber, so waren auch weniger NK-Zellen nachzuweisen. Dabei hatte auch die Ausbreitung der Metastasen einen Effekt auf die NK-Zellen. So konnte eine größere Population an NK-Zellen nachgewiesen werden, wenn es sich um solitäre und nicht um multiple Metastasen handelte (Gulubova et al., 2009). In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinompatienten unterschied sich das Vorkommen von

NK-Zellen in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe. So waren bedeutend weniger NK-Zellen im Tumorgewebe als im nicht entarteten Lungengewebe zu finden (Esendagli et al., 2008). In einer Studie von Cornfield und Gheith konnte hingegen kein Unterschied zwischen benignem und malignem Aszites in Bezug auf das Vorkommen von NK-Zellen und auch von $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden (Cornfield und Gheith, 2009). Die Studie umfasste jeweils 30 benigne und maligne Körperflüssigkeiten, die unter anderem von Patienten mit pleuralen und peritonealen Ergüssen, Herzinsuffizienzpatienten oder von Tumorpatienten stammten (Cornfield und Gheith, 2009).

Im Vergleich zum Blut von gesunden Spendern konnten in unserer Arbeit CD19⁺ B-Zellen nur im verringertem Maße im Blut und Aszites von Ovarial- und Mammakarzinompatienten nachgewiesen werden (Abb. 15). Zum Vorkommen von CD19⁺ B-Zellen in Aszites sind in der Literatur noch keine aussagekräftigen Ergebnisse publiziert, die einen Vergleich mit unseren Ergebnissen zulassen würden. Es könnte sich aber um einen weiteren Immunescapemechanismus von Tumoren handeln, da B-Zellen die Immunantwort von T-Zellen beispielsweise durch die Ausschüttung von Zytokinen oder durch ihre Fähigkeit als APZ zu dienen unterstützen könnten (Nelson, 2010).

Letztlich fanden sich sowohl in den Untersuchungen von Aszites wie auch in den *in vitro* Versuchen mit PDAC-Zelllinien weitere Hinweise auf Immunescapemechanismen von Tumorerkrankungen. Keiner von den beobachteten Effekten ist hierbei dominierend, vielmehr scheint die Kombination von mehreren immunsuppressiven Effekten für die Entstehung und Fortschreitung von Tumorerkrankungen entscheidend zu sein.

6 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen spielen als Immunregulatoren eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Situation in duktalem Pankreasadenokarzinomen näher untersucht. Hier war besonders die Fragestellung vorrangig, ob die genannten Neoplasien regulatorische T-Zellen zu ihrem eigenen Nutzen induzieren können.

Bei der Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien fiel auf, dass 9 von 10 Linien positiv für den regulatorischen T-Zell Marker FoxP3 waren. Die Expression von FoxP3 korrelierte jedoch nicht mit der Suppressivität der Tumorzelllinien gegenüber Respondern, was gegen einen entscheidenden Einfluss von FoxP3 auf die Suppressivität der untersuchten Tumorzelllinien spricht. Die neu generierte Ovarialkarzinomzelllinie K1290 konnte trotz FoxP3 Expression Responder nicht in ihrer Proliferation inhibieren. Die ebenfalls untersuchten duktalem Pankreasadenokarzinom Zelllinien Panc89 und Colo357 zeigten eine Suppression, wobei Colo357 in 7 von 8 Experimenten die Responder supprimierte und damit die regelmäßigste wie auch die stärkste Suppression aufwies. Anzeichen dafür, dass andere Rezeptor/Ligand-Interaktionen wie z.B. Notch-/Jagged-1 eine Rolle bei der Suppression spielen könnten, wurden in dieser Arbeit nicht gefunden.

Nach der Kokultivierung mit den duktalem Pankreasadenokarzinom Zelllinien wiesen die Responder zum Teil suppressive Eigenschaften wie induzierte regulatorische T-Zellen auf. Interessanterweise konnten in einem Experiment nicht aktivierte, aber mit Panc89 oder Colo357 kokultivierte Responder frisch isolierte Responder in der Proliferation hemmen. Die suppressiven Responder exprimierten FoxP3 und CD25 in vergleichbarem Maße wie frisch isolierte Responder, also deutlich weniger als natürliche regulatorische T-Zellen. In der Kokultivierung bereits aktivierte Responder konnten frisch isolierte Responder stark supprimieren, unabhängig davon, ob sie mit Tumorzellen Kontakt hatten oder nicht. Diese Suppressivität könnte auf einen Interleukin-2-Entzug durch die deutliche Expression von CD25 der aktivierten Zellen zurückzuführen sein. Wurden die aktivierten Responder 11 Tage vorinkubiert, so blieb die Suppressivität nur bei den Respondern erhalten, die mit Panc89 oder Colo357 initial kokultiviert wurden. In den beiden beschriebenen Situationen mit aktivierten und nicht aktivierten kokultivierten Respondern wurden somit Hinweise für die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch duktalem Pankreasadenokarzinom Zelllinien gefunden.

Darüber hinaus geben unsere Daten weitere Anhaltspunkte, dass Ovarial- und Mammakarzinome durch Immunescapemechanismen ihr Fortbestehen im Organismus sichern. So sind $\gamma\delta$ T-Zellen, natürliche Killerzellen und B-Zellen nach unseren Ergebnissen im Aszites reduziert. Ebenfalls ist die Proliferationsfähigkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen aus Exsudaten

eingeschränkt. Regulatorische T-Zellen konnten hingegen nicht vermehrt im Aszites nachgewiesen werden und eine Depletion von natürlichen regulatorischen T-Zellen hatte keinen proliferationsfördernden Einfluss auf $\gamma\delta$ T-Zellen.

7 Literaturverzeichnis

- Adam, R. & Adam, Y. (2004). Malignant ascites: past, present, and future. *J Am Coll Surg*, 198(6), S. 999-1011.
- Aguilar, L., Guzik, B. W. & Aguilar-Cordova, E. (2011). Cytotoxic Immunotherapy Strategies for Cancer: Mechanisms and Clinical. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(8), S. 1969-1977.
- Allan, S., Crome, S., Crellin, N., Passerini, L., Steiner, T., Bacchetta, R., Roncarolo, M. & Levings, M. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*, 19(4), S. 345-354.
- Aluvihare, V., Kallikourdis, M. & Betz, A. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*, 5(3), S. 266–271.
- Bajpai, R., Lesperance, J., Kim, M. & Terskikh, A. (2008). Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*, 75(5), S. 818-827.
- Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R. & Roncarolo, M. G. (2006). Tr1 cells: From discovery to their clinical application. *Semin Immunol*, 18(2), S. 120-127.
- Bennett, C., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M., Ferguson, P., Whitesell, L., Kelly, T., Saulsbury, F., Chance, P. & Ochs, H. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27(1), S. 20–21.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staeger, MS., Stassen, M., Jonuleit, H. & Schmitt, E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, 204(6), S. 1303-1310.
- Boyman, O., Surh, C. & Sprent, J. (2006). Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Biol Ther*, 6(12), S. 1323-1331.
- Braza, M. & Klein, B. (2013). Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol*, 160(2), S. 123-132.
- Carey, T., Takahashi, T., Resnick, L., Oettgen, H. & Old, L. (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(9), S. 3278-3282.

- Chatila, T., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H., Voulgaropoulos, C., Helms, C. & Bowcock, A. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*, 106(12), S. 75–81.
- Chen, C., Rowell, E., Thomas, R., Hancock, W. & Wells, A. (2006). Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem*, 281(48), S. 36828-36834.
- Chen, G., Chen, C., Wang, L., Chang, X., Zheng, P. & Liu, Y. (2008). Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol*, 180(8), S. 5163-5166.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198(12), S. 1875-1886.
- Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O. & Kabelitz, D. (2013). Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol*, 78(2), S. 120-9.
- Cornfield, D. & Gheith, S. (2009). Flow cytometric quantitation of natural killer cells and T lymphocytes expressing T-cell receptors alpha/beta and gamma/delta is not helpful in distinguishing benign from malignant body cavity effusions. *Cytometry B Clin Cytom*, 76(3), S. 213-217.
- Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol*, 70(4), S. 326-336.
- Cubillos-Ruiz, J., Rutkowski, M. & Conejo-Garcia, J. (2010). Blocking ovarian cancer progression by targeting tumor microenvironmental leukocytes. *Cell Cycle*, 9(2), S. 260-268.
- Curiel, T., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Krczyk, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M., Knutson, K., Chen, L. & Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9), S. 942-949.
- Curotto de Lafaille, M., Muriglan, S., Sunshine, M., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G., Wensky, A., Olivares-Villagómez, D. & Lafaille, J. (2001). Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med*, 194(9), S. 1349–1359.
- Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E. & Vieweg, J. (2005). Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 115(12), S. 3623-3633.

- Davis, M., Boniface, J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B. & Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16, S. 523-544.
- Dieckmann, D., Bruett, C., Ploettner, H., Lutz, M. & Schuler, G. (2002). Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*, 196(2), S. 247-253.
- Dieli, F., Vermijlen, D., Fulfaro, F., Caccamo, N., Meraviglia, S., Cicero, G., Roberts, A., Buccheri, S., D'Asaro, M., Gebbia, N., Salerno, A., Eberl, M. & Hayday, A. (2007). Targeting human $\{\gamma\delta\}$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 67(15), S. 7450-7457.
- Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E. & Brandau, S. (2008). Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 59(1), S. 32-40.
- Espinosa, E., Belmant, C., Pont, F., Luciani, B., Poupot, R., Romagné, F., Brailly, H., Bonneville, M. & Fournié, J. (2001). Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem*, 276(21), S. 18337-18344.
- Feinerman, O., Jentsch, G., Tkach, K., Coward, J., Hathorn, M., Sneddon, M., Emonet, T., Smith, K. & Altan-Bonnet, G. (2010). Single-cell quantification of IL-2 response by effector and regulatory T cells reveals critical plasticity in immune response. *Mol Syst Biol*, 6, S. 437.
- Figueroa-Magalhães, M., Jelovac, D., Connolly, R. & Wolff, A. (2013). Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast*, doi: 10.1016/j.breast.2013.11.011.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. & Huehn, J. (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*, doi: 10.1371/journal.pbio.0050038
- Fontenot, J., Rasmussen, J. & Williams, L. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22(3), S. 329-341.
- Fontenot, J., Gavin, M. & Rudensky, A. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat Immun*, 4(4), S. 330–336.
- Fournié, J., Sicard, H., Poupot, M., Bezombes, C., Blanc, A., Romagné, F., Ysebaert, L. & Laurent, G. (2013). What lessons can be learned from $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol*, 10(1), S. 35-41.

- Gavalas, N., Karadimou, A., Dimopoulos, M. & Bamias, A. (2010). Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization. *Clin Dev Immunol*, doi: 10.1155/2010/791603.
- Gavin, M., Rasmussen, J., Fontenot, J., Vasta, V., Manganiello, V., Beavo, J. & Rudensky, A. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, 445(7129), S. 771-775.
- Ghiringhelli, F., Puig, P., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B. & Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, 202(7), S. 919-929.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A., Durand, I., Olive, D., Perez, S., Pasqual, N., Faure, C., Ray-Coquard, I., Puisieux, A., Caux, C., Blay, J. & Ménétrier-Caux, C. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*, 69(5), S. 2000-2009.
- Gondek, D., Lu, L., Quezada, S., Sakaguchi, S. & Noelle, R. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174(4), S. 1783-1786.
- Gregory, C. & Pound, J. (2010). Microenvironmental influences of apoptosis in vivo and *in vitro*. *Apoptosis*, 15(9), S. 1029-1049.
- Gregory, C., Pound, J., Devitt, A., Wilson-Jones, M., Ray, P. & Murray, R. (2009). Inhibitory effects of persistent apoptotic cells on monoclonal antibody production *in vitro*: simple removal of non-viable cells improves antibody productivity by hybridoma cells in culture. *MAbs*, 1(4), S. 370-376.
- Groh, V., Rhinehart R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. & Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), S. 6879-6884.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. & Roncarolo, M. (1997). A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), S. 737-742.
- Gulubova, M., Manolova, I., Kyurkchiev, D., Julianov, A. & Altunkova, I. (2009). Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS*, 117(12), S. 870-879.
- Ha, T. (2009). The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Netw.*, 9(6), S. 209-235.
- Heath, W. (1998). T Lymphocytes. In P. J. Delves, *Encyclopedia of Immunology* (2 Ausg., S. 2341-2343). Melbourne: Elsevier.

- Herold, G. (2010). *Innere Medizin*. (G. Herold, Hrsg.) Köln.
- Himoudi, N., Morgenstern, D., Ya, M., Vernay, B., Saraiva, L., Wu, Y., Cohen, C., Gustafsson, K. & Anderson, J. (2012). Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol*, 188(4), S. 1708-1716.
- Hinz, S., Pagerols-Raluy, L., Oberg, H., Ammerpohl, O., Grüssel, S., Sipos, B., Grützmann, R., Pilarsky, C., Ungefroren, H., Saeger, H., Klöppel, G., Kabelitz, D. & Kalthoff, H. (2007). Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*, 67(17), S. 8344-8350.
- Holtmeier, W. & Kabelitz, D. (2005). Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy*, 86, S. 151-183.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), S. 1057–1061.
- Huang, C., Workman, C. & Flies, D. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21, S. 503–513.
- Huehn, J., Polansky, J. & Hamann, A. (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*, 9(2), S. 83-89.
- Kabelitz, D., Kalyan, S., Oberg, H. & Wesch, D. (2013). Human V δ 2 versus non-V δ 2 $\gamma\delta$ T cells in antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 2(3).
- Kabelitz, D., Wesch, D. & He, W. (2007). Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res*, 67(1), S. 5-8.
- Karanikas, V., Speletas, M., Zamanakou, M., Kalala, F., Loules, G., Kerenidi, T., Barda, A., Gourgoulialis, K. & Germenis, A. (2008). Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med*, doi: 10.1186/1479-5876-6-19.
- Khattari, R., Cox, T. & Yasayko, S. (2003). An essential role for Scurfin in CD4 + CD25 + T regulatory cells. *Nat Immun*, 4, S. 337–342.
- Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J., Nadkarni, J., Wigzel, H. & Clifford, P. (1968). Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res*, 7(28), S. 1300-1310.
- Koyasu, S. & Moro, K. (2012). Role of Innate Lymphocytes in Infection and Inflammation. *Front Immunol*, doi: 10.3389/fimmu.2012.00101.
- Krausz, L., Bianchini, R., Ronchetti, S., Fettucciari, K., Nocentini, G. & Riccardi, C. (2007). GITR-GITRL system, a novel player in shock and inflammation. *ScientificWorldJournal*, 7, S. 533-566.
- Kunzmann, V., Kimmel, B., Herrmann, T., Einsele, H. & Wilhelm, M. (2009). Inhibition of phosphoantigen-mediated gammadelta T-cell proliferation by CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology*, 126(2), S. 256-267.

- Kunzmann, V., Bauer, E., Feurle, J., Weissinger, F., Tony, H. & Wilhelm, M. (2000). Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*, *96*(2), S. 384-392.
- Levings, M., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C. & Roncarolo, M. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood*, *105*(3), S. 1162-1169.
- Levy, E., Roberti, M. & Mordoh, J. (2011). Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J Biomed Biotechnol*, doi: 10.1155/2011/676198.
- Litzinger, M., Fernando, R., Curiel, T., Grosenbach, D., Schlom, J. & Palena, C. (2007). IL-2 immunotoxin denileukin diftitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. *Blood*, *110*(9), S. 3192-3201.
- Liu, W., Putnam, A., Xu-yu, Z., Szot, G., Lee, M., Zhu, S., Gottlieb, P., Kapranov, P., Gingeras, T., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D., Ziegler, S. & Bluestone, J. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, *203*(7), S. 1701-1711.
- Malek, T. (2008). The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*, *26*, S. 453-479.
- Meraviglia, S., Eberl, M., Vermijlen, D., Todaro, M., Buccheri, S., Cicero, G., La Mendola, C., Guggino, G., D'Asaro, M., Orlando, V., Scarpa, F., Roberts, A., Caccamo, N., Stassi, G., Dieli, F. & Hayday, A. (2010). In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*, *161*(2), S. 290-297.
- Merati, K., Said Siadat, M., Andea, A., Sarkar, F., Ben-Josef, E., Mohammad, R., Philip, P., Shields, A., Vaitkevicius, V., Grignon, D., Adsay, N. (2001). Expression of inflammatory modulator COX-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its relationship to pathologic and clinical parameters. *Am J Clin Oncol*, *24*(5), S. 447-452.
- Moore, P., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F., Lemoine, N., Gress, T., Bassi, C., Klöppel, G., Kalthoff, H., Ungefroren, H., Löhr, M. & Scarpa, A. (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch*, *439*(6), S. 798-802.
- Moo-Young, T., Larson, J., Belt, B., Tan, M., Hawkins, W., Eberlein, T., Goedegebuure, P & Linehan, D. (2009). Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J Immunother*, *32*(1), S. 12-21.
- Morgan, R., Woods, L., Moore, G., Quinn, L., McGavran, L. & Gordon, S. (1980). Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*, *25*(5), S. 591-598.

- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009a). *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Seite 172.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009b). *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Seite 169.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009c). *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Seite 123ff.
- Nelson, B. (2010). CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*, 185(9), S. 4977-4982.
- Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Kuribayashi, K., Old, L. & Shiku, H. (2003). CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), S. 10902-10906.
- Oberg, H., Peipp, M., Kellner, C., Sebens, S., Krause, S., Petrick, D., Adam-Klages, S., Röcken, C., Becker, T., Vogel, I., Weisner, D., Freitag-Wolf, S., Gramatzki, M., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2014). Novel bispecific antibodies increase $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 74(5), S. 1349-1360.
- Oberg, H., Juricke, M., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2011). Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur J Cell Biol*, 90 (6-7), S. 582-592.
- Pahwa, R., Jaggaiahgari, S., Pahwa, S., Inverardi, L., Tzakis, A. & Ricordi, C. (2010). Isolation and expansion of human natural T regulatory cells for cellular therapy. *J Immunol Methods*, 363(1), S. 67-79.
- Peng, G., Guo, Z., Kuniwa, Y., Voo, K., Peng, W., Fu, T., Wang, D., Li, Y., Wang, H. & Wang, R. (2005). Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*, 309(5739), S. 1380-1384.
- Perez, N., Karumuthil-Meleshil, S., Li, R., Prabhakar, B., Holterman, M. & Vasu, C. (2008). Preferential costimulation by CD80 results in IL-10-dependent TGF-beta1(+) -adaptive regulatory T cell generation. *J Immunol*, 180(10), S. 6566-6576.
- Piao, W., Jee, Y., Liu, R., Coons, S., Kala, M., Collins, M., Young, D., Campagnolo, D., Vollmer, T., Bai, X., La Cava, A. & Shi, F. (2008). IL-21 modulates CD4 + CD25 + regulatory T-cell homeostasis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol*, 67(1), S. 37-46.
- Puiffe, M., Le Page, C., Filali-Mouhim, A. & Zietarska, M. (2007). Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an *in vitro* model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*, 9(10), S. 820-829.
- Rabinovitch, P., Torres, R. & Engel, D. (1986). Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation:

- applications to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. *J Immunol*, 136(8), S. 2769-2775.
- Rathmell, J. & Thompson, C. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, 109, S. 97-107.
- Redpath, M., Xu, B., van Kempen, L. & Spatz, A. (2011). The dual role of the X-linked FoxP3 gene in human cancers. *Mol Oncol*, 5(2), S. 156-163.
- Rendon, J. & Choudhry, M. (2012). Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol*, 92(3), S. 529-538.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3), S. 1151-1164.
- Salomon, B. & Bluestone, J. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol*, 19, S. 225-252.
- Samon, J., Champhekar, A., Minter, L., Telfer, J., Miele, L., Fauq, A., Das, P., Golde, T. & Osborne, B. (2008). Notch1 and TGFbeta1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. *Blood*, 112(5), S. 1812-1821.
- Santin, A., Bellone, S., Palmieri, M., Bossini, B., Cane', S., Bignotti, E., Roman, J., Cannon, M. & Pecorelli, S. (2004). Restoration of tumor specific human leukocyte antigens class I-restricted cytotoxicity by dendritic cell stimulation of tumor infiltrating lymphocytes in patients with advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 14(1), S. 64-75.
- Sarnaik, A. & Weber, J. (2009). Recent advances using anti-CTLA-4 for the treatment of melanoma. *Cancer J*, 15, S. 169-173.
- Selvaraj, R. & Geiger, T. (2007). A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol*, 179(2), S. 7667-7677.
- Semple, K., Nguyen, A., Yu, Y., Wang, H., Anasetti, C. & Yu, X. (2011). Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood*, 117(11), S. 3096-3103.
- Shojaei, H., Oberg, H., Juricke, M., Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2009). Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res*, 69(22), S. 8710-8717.
- Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M. & Klöppel, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch*, 442(5), S. 444-452.
- Slamon, D., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. (2001). Use of

- chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344(11), S. 783-792.
- Szabo, S., Sullivan, B., Peng, S. & Glimcher, L. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, 21, S. 713–758.
- Tamsma, J., Keizer, H. & Meinders, A. (2001). Pathogenesis of malignant ascites: Starling's law of capillary hemodynamics revisited. *Ann Oncol*, 12(10), S. 1353-1357.
- Tanke, H. & van der Keur, M. (1993). Selection of defined cell types by flow-cytometric cell sorting. *Trends Biotechnol*, 11(2), S. 55-62.
- Thornton, A., Korty, P., Tran, D., Wohlfert, E., Murray, P., Belkaid, Y. & Shevach, E. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*, 184(7), S. 3433-3441.
- Trickett, A. & Kwan, Y. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods*, 275(1-2), S. 251-255.
- Vieira, P., Christensen, J., Minaee, S., O'Neill, E., Barrat, F., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. & O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 172(10), S. 5986-5993.
- Vigouroux, S., Yvon, E., Wagner, H., Biagi, E., Dotti, G., Sili, U., Lira, C., Rooney, C. & Brenner, M. (2003). Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *J Virol*, 77(20), S. 10872-10880.
- Virmani, A., Fong, K., Kodagoda, D., McIntire, D., Hung, J., Tonk, V., Minna, J. & Gazdar, A. (1998). Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes Chromosomes Cancer*, 21(4), S. 308-319.
- von Bernstorff, W., Voss, M., Freichel, S., Schmid, A., Vogel, I., Jöhnk, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B. & Kalthoff, H. (2001). Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*, 7(3), S. 925s-932s.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, 6(4), S. 338-344.
- Walker, M., Kasproicz, D., Gersuk, V., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J. & Ziegler, S. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*, 112(9), S. 1437-1443.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E., Huizinga, T. & Toes, R. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 37(1), S. 129-138.

- Wang, L., Liu, R., Li, W., Chen, C., Kato, H., Chen, G., McNally, B., Lin, L., Zhou, P., Zuo, T., Cooney, K., Liu, Y. & Zheng, P. (2009). Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell*, 16(4), S. 336-346.
- Wang, R., Song, L., Han, G., Wang, J., Chen, G., Xu, R., Yu, M., Qian, J., Shen, B. & Li, Y. (2007). Mechanisms of regulatory T-cell induction by antigen-IgG-transduced splenocytes. *Scand J Immunol*, 66(5), S. 515-522.
- Wrobel, P., Shojaei, H., Schitteck, B., Gieseler, F., Wollenberg, B., Kalthoff, H., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2007). Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol*, 66(2-3), S. 320-328.
- Wildin, R., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M. & Brunkow, M. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, 27(1), S. 18–20.
- Workman, C., Szymczak-Workman, A., Collison, L., Pillai, M. & Vignali, D. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*, 66(16), S. 2603-2622.
- Yang, X. (2012). Follicular helper T cells in immune homeostasis. *Cell Mol Immunol*, 9(5), S. 367-368.
- Zhang, H. & Sun, H. (2010). Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*, 287(1), S. 91-97.
- Zhu, J. & Paul, W. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*, 20(1), S. 4-12.
- Ziegler, S. (2006). FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, 24, S. 209-226.
- Zuo, T., Wang, L., Morrison, C., Chang, X., Zhang, H., Li, W., Liu, Y., Wang, Y., Liu, X., Chan, M., Liu, J., Love, R., Liu, C., Godfrey, V., Shen, R., Huang, T., Yang, T., Park, B., Wang, C., Zheng, P. & Liu, Y. (2007). FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell*, 129(7), S. 1275-1286.
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5(4), S. 263-274.

8 Publikationsliste

Teile der vorliegenden Doktorarbeit sind veröffentlicht worden:

1. Originalarbeit:

Shojaei, H., Oberg, H., **Juricke, M.**, Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2009). Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res*, 69(22), S. 8710-8717.

2. Übersichtsarbeit:

Oberg, H., **Juricke, M.**, Kabelitz, D. & Wesch, D. (2011). Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur J Cell Biol*, 90 (6-7), S. 582-592.

9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Professor Kabelitz, der er es mir ermöglicht hat zu diesem interessanten Thema forschend tätig zu werden.

Bei PD Dr. Heiner Oberg möchte ich mich bedanken für seine Geduld und Hilfsbereitschaft in jeder Phase dieser Arbeit. Die gemeinsame Planung der Experimente und die vielen anregenden Diskussionen hatten nicht nur einen entscheidenden Anteil am Erfolg, sondern haben für mich insbesondere den Spaß an der Forschung ausgemacht.

Ein großer Dank geht an PD Dr. Daniela Wesch für ihre stete Unterstützung und die Anregungen von der Einarbeitung bis zur Fertigung des Manuskripts. Vor allem dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und sich die Zeit genommen hat um zu helfen.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Bruder, die mich, wie sie es bereits seit meiner Schulzeit gewohnt sind, durch das Korrekturlesen auf sprachliche und formale Ungereimtheiten der Arbeit aufmerksam gemacht haben.

Ich möchte mich bei Hoa Ly, Sandra Ussat und Monika Kunz bedanken, die mir bei der praktischen Arbeit immer hilfreich zur Seite gestanden haben, sowie bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie Kiel. Die Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen war für mich immer wieder erstaunlich und ist sicherlich nicht selbstverständlich. Deswegen bin ich froh hier für meine Dissertation gearbeitet zu haben.

10 Lebenslauf

Vor- und Zuname: Matthias Juricke
Geburtstag 29. September 1984
Geburtsort Bremen
Familienstand ledig
Konfession evangelisch

Berufsleben

Seit 7/2011 Klinik für Innere Medizin *Klinikum Links der Weser, Bremen*

Hochschulstudium

10/2004 - 12/2010 Studium der Humanmedizin *Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*
 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut (2,0)
 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut (2,5)

Praktisches Jahr

04/2010 - 8/2010 Chirurgie *Diakonissenkrankenhaus und
Malteser Krankenhaus St.Franziskus-Hospital Flensburg*
12/2009 - 04/2010 Innere Medizin *Klinikum Itzehoe*
08/2009 - 12/2009 Anästhesie *Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Kiel*

Schulbildung

08/1997 - 06/2004 Allgemeine Hochschulreife, Note: (1,6) *Gymnasium Brake*
09/2001 - 07/2002 Schüleraustausch *Penticton Highschool, Kanada*

Publikationsliste

Shojaei, H., Oberg, H., **Juricke, M.**, Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2009). Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res*, 69(22), S. 8710-8717.
 Oberg, H., **Juricke, M.**, Kabelitz, D. & Wesch, D. (2011). Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur J Cell Biol*, 90 (6-7), S. 582-592.