

**Untersuchungen zur Funktion von
dendritischen Zellen in einem murinen
Spontan-Tumormodell**

Vorgelegt von

Marcella Naujoks

2011

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum

Münchens

Leitung: Prof. Dolores Schendel PhD

**Untersuchungen zur Funktion von
dendritischen Zellen in einem murinen
Spontan-Tumormodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marcella Naujoks

aus

Starnberg

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ludger Klein
Priv. Doz. Dr. Lars Lindner
Priv. Doz. Dr. Susanne Müller
Prof. Dr. Volker Heinemann

Dekan: Prof. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2011

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2008 bis Oktober 2009 am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrums München erstellt. Prof. Dr. med. Ralph Mocikat hatte die Fachvertretung für die Fakultät für Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München inne.

Teile der Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

Originalpublikation:

Margarethe Przewoznik, Nadine Hömberg, Marcella Naujoks, Johann Pözl, Armin Gerbitz, Christoph D. Brenner, David Anz, Carole Bourquin, Peter Nelson, Martin Röcken and Ralph Mocikat, **CXCL9- and CXCL10-dependent recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma proceeds despite of lack of IFN- γ** , Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht

Publizierte Asbtrakts und Kongressbeiträge:

Vortrag und Poster:

Marcella Naujoks, Christoph Brenner, Margarethe Przewoznik, Georg Bornkamm und Ralph Mocikat, **Dendritic cells in spontaneous mouse lymphoma show an activated phenotype but are functionally impaired and induce immunosuppression**, 40. Jahrestagung der DGfI, Leipzig 2010

Poster:

Marcella Naujoks, Christoph Brenner, Margarethe Przewoznik, Georg Bornkamm und Ralph Mocikat, **Phenotypic and functional characterization of dendritic cells in spontaneous mouse lymphoma**, 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009

Christoph Brenner, Margarethe Przewoznik, Marcella Naujoks, Susan King, Dirk Busch, Georg Bornkamm, Martin Röcken und Ralph Mocikat, **Interplay between innate and adaptive immunity in tumour control**, 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009

Margarethe Przewoznik, Christoph Brenner, David Anz, Marcella Naujoks, Carole Bourquin, Georg Bornkamm, Martin Röcken und Ralph Mocikat, **Function of natural killer cells in a spontaneous mouse lymphoma model**, 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009

Für meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abkürzungen</i>	4
<i>Zusammenfassung</i>	6
1 Einleitung	8
1.1 Das Immunsystem	8
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	8
1.1.1.1 NK-Zellen	8
1.1.1.2 Dendritische Zellen	9
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	10
1.2 Immunevasion von Tumoren	11
1.3 Maus-Tumormodelle für die Entwicklung neuer Therapieverfahren	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Mäuse	15
2.1.1.1 c-myc-Mäuse	15
2.1.1.2 BALB/c-Mäuse	15
2.1.1.3 OT-1- und OT-2-Mäuse	15
2.1.2 Zelllinien	16
2.1.3 Chemikalien	16
2.1.4 Zellkulturmedien	17
2.1.5 Puffer und Lösungen	17
2.1.6 Monoklonale Antikörper	19
2.1.7 Peptide	20
2.1.8 Primer	20
2.1.9 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen	20
2.1.10 Geräte und Sonstige Materialien	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellbiologische Methoden	22
2.2.1.1 Allgemeines Arbeiten in der Zellkultur	22

2.2.1.2 Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen	22
2.2.1.3 Gewinnung von Knochenmarkszellen	23
2.2.1.4 Gewinnung von Herzblut	23
2.2.1.5 Erythrozytenlyse	23
2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl	23
2.2.1.7 Kultivierung und Reifung dendritischer Zellen	24
2.2.1.8 Peptidbeladung dendritischer Zellen	24
2.2.1.9 T-Zell-Stimulation	24
2.2.1.10 Auftauen und Einfrieren von Zellen	25
2.2.1.11 CFSE-Markierung von Zellen	25
2.2.1.12 Migrationsversuche	25
2.2.1.13 Kokultur von dendritischen Zellen mit Tumorzellen	26
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	27
2.2.2.1 Extraktion von Gesamt-RNS aus Zellen	27
2.2.2.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNS	27
2.2.2.3 Reverse Transkription der RNS in cDNS	27
2.2.2.4 Amplifikation von DNS mittels quantitativer RT-PCR	28
2.2.2.5 Darstellung von DNS mittels Gelelektrophorese	29
2.2.3 Immunbiologische Methoden	29
2.2.3.1 Immunmagnetische Zellseparation (MACS)	29
2.2.3.2 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)	30
2.2.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)	30
2.2.3.3.1 Färbung von Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern	31
2.2.3.3.2 Messung und Auswertung	31
2.2.4 Immunisierung	31
3 Ergebnisse	33
3.1 Phänotypische Charakterisierung dendritischer Zellen in c-myc-Mäusen	33
3.1.1 Zellzahl	33
3.1.2 Subpopulationen der dendritischen Zellen	34
3.1.3 Phänotypische Aktivierungszeichen der DC-Subpopulationen	36
3.1.4 Phänotyp der aus dem Knochenmark kultivierten dendritischen Zellen	40
3.2 Zytokinexpression	41

3.2.1	IL-12-Expression auf Transkriptebene	42
3.2.2	Zytokinexpression auf Proteinebene	43
3.3	Induktion des immunsuppressiven Zytokinprofils der dendritischen Zellen durch Tumorzellen	45
3.4	Funktionelle Charakterisierung dendritischer Zellen aus c-myc-Mäusen	48
3.4.1	T-Zell-Stimulation durch dendritische Zellen	48
3.4.1.1	Allostimulation	49
3.4.1.2	Peptidspezifische Stimulation von T-Zellen	53
3.4.1.2.1	Stimulation von T-Zellen aus OT-1-Mäusen	53
3.4.1.2.2	Stimulation von T-Zellen aus OT-2-Mäusen	54
3.4.2	Migrationsaktivität dendritischer Zellen	55
3.4.3	Immunantwort der c-myc-Mäuse	56
5	Diskussion	60
5.1	Die biologische Relevanz von dendritischen Zellen in der Onkologie	60
5.2	Phänotypische Charakterisierung und Subpopulationen dendritischer Zellen in c-myc-Mäusen	61
5.2.1	Induktion des immunsuppressiven Zytokinprofils durch Tumorzellen	66
5.3	Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen	67
5.4	Migrationsverhalten dendritischer Zellen	68
5.5	Immunantwort der c-myc-Mäuse	69
5.6	Ausblick	70
6	Literaturverzeichnis	72
7	Erklärung	77
8	Danksagung	78
9	Lebenslauf	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

ABKÜRZUNGEN

AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
arm.	armenischer
Ax	Alexa
bp	Basenpaar
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
cDNS	komplementäre DNS
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CP	Kreuzungspunkt (crossing point)
DCs	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay
FACS	fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer (fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum (FCS)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HA	Hämagglutinin
IFA	Incomplete Freud's adjuvant
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetischer Zellsortierer (magnetic activated cell sorting)
MEM	modifiziertes Eagle-Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
Min.	Minute
mRNS	Boten-RNS (messenger RNA)

NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
Pac	Pacific
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Sek.	Sekunde
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helfer-Zelle
VEGF	Gefäßendothelwachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor)
WT	Wildtyp
TMB	Tetramethylbenzidin

ZUSAMMENFASSUNG

Die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen Krebs ist das bessere Verständnis der Alterationen der verschiedenen Zellen des Immunsystems, welche durch die Tumorzellen herbeigeführt werden. Die Veränderungen der verschiedenen Komponenten des zellulären Netzwerks, die im Zuge der Krebsentstehung auftreten, können mithilfe von Tumormodellen der Maus untersucht werden. Man unterscheidet transplantierbare Tumormodelle, bei denen Tumorzellen gespritzt werden und dann in der Maus anwachsen, von Spontantumormodellen. Letztere beruhen meist auf einer genetischen Manipulation, die über eine Überexpression von Onkogenen oder eine Ausschaltung von den Zellzyklus kontrollierenden Genen zur Tumorentstehung führt. Während man bei transplantierbaren Tumormodellen eine große Zahl von Tumorzellen auf einmal gibt, was biologisch eher an den Pathomechanismus einer Infektion erinnert, entsteht ein endogener Tumor langsam aus einer Zelle, vergleichbar mit der klinischen Situation.

Im transplantierbaren Tumormodell wurde gezeigt, dass Tumorzellen, die MHC-I auf ihrer Oberfläche herunterreguliert hatten, zwar einer T-Zell-Abwehr entgehen, aber von NK-Zellen erkannt und lysiert werden konnten. Die NK-Zellen aktivierten dendritische Zellen, welche die Antigene der lysierten Tumorzellen aufnahmen und gegenüber T-Zellen präsentierten. Auf diese Weise konnte unabhängig von T-Helferzellen eine Antitumorantwort gegen Tumorzellen mit normaler MHC-I-Expression durch Zytotoxische T-Zellen induziert werden. Über diesen Weg der T-Zell-Aktivierung wurde auch ein Langzeitgedächtnis erzeugt. Nun sollte untersucht werden, ob diese Mechanismen auch im Spontantumormodell eine Rolle spielen. Hierzu wurde ein spontanes B-Zell-Lymphom ausgewählt. Die verwendeten transgenen Mäuse exprimieren das Onkogen c-myc unter einem B-Zell-spezifischen Regulationselement und entwickeln nach ca. 5 Monaten B-Zell-Lymphome.

Es wurde gezeigt, dass die NK-Zellen in diesem Modell zwar durch Tumorzellen mit niedriger MHC-I-Expression aktiviert werden, jedoch kein für die DC-Aktivierung benötigtes IFN- γ produzierten und in ihrer Fähigkeit zur Lyse beeinträchtigt waren. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Folgen die fehlende IFN- γ -Produktion für die dendritischen Zellen in diesem Modell hat. Hierzu wurden zunächst die Anzahl der dendritischen Zellen, ihr Phänotyp sowie ihre Zytokinexpression untersucht. Des Weiteren wurde ihre Funktionalität getestet.

Die Zahl der dendritischen Zellen war in tumortragenden c-myc-Mäusen in allen untersuchten Kompartimenten, vor allem jedoch in den Lymphknoten, sowohl prozentual als auch absolut erhöht. Dies liegt zumindest teilweise an einer vermehrten Migration der DCs zum Tumorlymphknoten, welche auch *in vitro* beobachtet werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass die DCs in c-myc-Mäusen einen aktivierten Phänotyp aufweisen. Die Mehrzahl der DCs war jedoch durch ein immunsuppressives Zytokinexpressionsmuster geprägt. Im Gegensatz zu transplantierbaren Tumormodellen produzierten die meisten DCs kein IL-12, welches zur Einleitung einer Th1-Antwort und damit für eine erfolgreiche Tumorabwehr benötigt wird. Ein Überwiegen der Th2-Antwort konnte auch für die humorale B-Zell-Abwehr gezeigt werden.

In Kokulturen der DCs mit Tumorzellen konnte demonstriert werden, dass das immunsuppressive Zytokinexpressionsprofil durch einen von den Tumorzellen sezernierten löslichen Faktor oder löslichen Faktoren induziert wird.

Die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation war vermindert. Dies traf sowohl auf die Allostimulation als auch auf die peptidspezifische Stimulation zu.

Ingesamt zeigt diese Arbeit, dass die dendritischen Zellen, die in vermehrter Anzahl in tumorbefallenen Organen zu finden sind, zwar aktiviert sind, jedoch durch ein immunsuppressives Zytokinprofil und eine beeinträchtigte Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen nicht in der Lage sind, eine adäquate Tumorabwehr zu induzieren.

1 EINLEITUNG

1.1 DAS IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem dient dem Körper zur Verteidigung gegen Infektionen. Dafür hat es vielfältige Abwehrstrategien entwickelt. Voraussetzung für eine effektive Abwehr ist die Fähigkeit, eigene Zellen von körperfremden bzw. entarteten Zellen zu unterscheiden. Die löslichen und zellulären Bestandteile des Immunsystems werden dem angeborenen Immunsystem, dem phylogenetisch älteren Teil, sowie dem erworbenen, adaptiven Immunsystem zugeordnet.

1.1.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

Die angeborene Immunität bildet die erste unspezifische Abwehr gegen Mikroorganismen und andere Eindringlinge. Zu ihr gehören anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien und das Komplementsystem. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und antigenpräsentierende Zellen. Die Erkennung körperfremder Strukturen erfolgt bei den Zellen der angeborenen Immunität nicht antigenspezifisch, sondern mithilfe von pattern-recognition-Rezeptoren (PRR), die z. B. Lipopolysaccharide oder andere bakterielle Strukturen erkennen [1-2]. Die angeborene Immunität bildet jedoch nicht nur einen ersten unspezifischen Schutz gegen Eindringlinge, sondern ist auch maßgeblich daran beteiligt durch die Sekretion von Zytokinen eine Immunantwort des adaptiven Immunsystems zu initiieren.

1.1.1.1 NK-ZELLEN

NK-Zellen gehören zu den Effektorzellen der angeborenen Immunität. Sie können durch dendritische Zellen aktiviert werden und Tumorzellen sowie Virus-infizierte Zellen durch

direkte Zytotoxizität töten [3]. Die Aktivität der NK-Zellen wird durch ein Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche reguliert [4-5].

1.1.1.2 DENDRITISCHE ZELLEN

Dendritische Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der Regulierung der angeborenen und adaptiven Immunität. Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit NK-Zellen zu aktivieren und naive T-Zellen zu prägen. Sie sind damit wichtig für die Initiation und Regulation der Immunantwort. Dendritische Zellen durchlaufen verschiedene Reifungsstadien. Diese grenzen sich durch unterschiedliche funktionelle Eigenschaften und durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker voneinander ab. Unreife dendritische Zellen, die in fast allen peripheren Geweben vorkommen, nehmen Antigene durch Phagozytose, Pinozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose auf [6]. Die aufgenommenen Antigene werden prozessiert und über MHC-Klasse II gegenüber $CD4^+$ T-Zellen präsentiert [7]. $CD8^+$ T-Zellen werden durch Antigene, die an MHC-Klasse I gekoppelt sind, aktiviert [8]. Diese Antigene sind meist zytoplasmatische Proteine. Dendritische Zellen können jedoch auch extrazelluläre Proteine aufnehmen und über MHC-I präsentieren. Diesen Prozess nennt man Kreuzpräsentation [9]. Gefahrensignale, wie LPS, proinflammatorische Zytokine oder Proteine, die mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren, z. B. den „Toll-like receptors“ (TLRs), identifiziert werden, initiieren die Maturierung von DCs [10]. Nur reife DCs bewirken eine effektive Aktivierung von T-Lymphozyten [11]. Unreife oder unvollständig gereifte DCs induzieren T-Zell-Toleranz [13-14].

Im Zuge der Reifung kommt es zu einer Hochregulierung von Oberflächenmarkern wie den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, dem Aktivierungsmarker CD83 und MHC-II [12]. Des Weiteren wird die Aufnahme von Antigenen durch die Reduktion von endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren an der Zelloberfläche eingeschränkt. Es erfolgt zudem die Expression von Chemokin-Rezeptoren, wie CCR7, welche die Migration von DCs aus dem peripheren Gewebe in die sekundären lymphatischen Organe bewirken [13]. Reife DCs sezernieren immunmodulatorische Zytokine. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Polarisierung der T-Helferzellantwort. Während IL-12 die Th1-Immunantwort fördert, induziert IL-4 als Gegenspieler die Differenzierung der T-Zellen in Richtung Th2 [14]. Durch die Sekretion von IL-10 können DCs auch immunsuppressive regulatorische

T-Zellen induzieren [16].

In den letzten Jahren ist den verschiedenen Subtypen der dendritischen Zellen mehr Aufmerksamkeit gewidmet worden. Es haben sich Hinweise ergeben, dass die CD11c-Expression der dendritischen Zellen mit ihrer Aktivität korreliert und daher teilweise zur Definition unterschiedlicher Subpopulationen verwendet werden kann. So unterscheiden Perrot et al. dendritische Zellen mit hoher CD11c-Expression (CD11c^{high}) und solche mit niedriger CD11c-Expression (CD11c^{int}), die sich in ihrem Reifungsgrad und ihrer Funktion unterscheiden [15].

Neben normalen, aktivierenden DCs existiert noch eine Subpopulation regulatorischer DCs mit inhibitorischen Eigenschaften, die T-Zell-Antworten und Entzündung unterdrücken können [16-18]. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind viele verschiedene regulatorische DCs mit unterschiedlichen Phänotypen beschrieben worden. Die meisten dieser Phänotypen wurden jedoch bisher nur in vitro charakterisiert. Kürzlich wurden jedoch auch DCs mit regulatorischen Eigenschaften unter den Tumor-infiltrierenden DCs in vivo beschrieben [22-23]. Der Phänotyp dieser Zellen ist jedoch noch nicht einheitlich definiert, da verschiedene Modelle unterschiedliche Ergebnisse brachten [19-20].

1.1.2 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM

Die Immunantwort der adaptiven Immunität erfolgt erst nach der Einleitung der Immunantwort durch die Effektorzellen der angeborenen Immunität und ist geprägt durch die Spezifität für ein bestimmtes Antigen. Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses durch die adaptive Immunität ermöglicht eine effektivere Antwort auf eine erneute Pathogenexposition. Die Hauptakteure des erworbenen Immunsystems, die B- und T-Lymphozyten, können erst nach Antigenpräsentation durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen klonal proliferieren.

T-Zellen verfügen über einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch für ein bestimmtes Antigenepitop ist. Sie können Antigene nur erkennen, wenn diese an MHC-Molekülen gebunden sind [21]. T-Zell-Rezeptoren entstehen durch somatische Rekombination in den T-Zell-Rezeptorgenen. Durch positive Selektion werden naive T-Zellen im Thymus ausgewählt, die körpereigene MHC-Moleküle binden. Im Zuge der negativen Selektion werden autoreaktive T-Zellen eliminiert. T-Zellen können funktionell und anhand ihrer

Oberflächenmoleküle in zwei verschiedene Untergruppen unterschieden werden, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. $CD4^+$ Zellen stellen die Gruppe der T-Helferzellen dar. Abhängig vom vorherrschenden Zytokinmilieu, das unter anderen von DCs bestimmt wird, können aktivierte naive $CD4^+$ Th0-Zellen zu Th1-Zellen bzw. Th2-Zellen differenzieren und somit die Art der Immunantwort wesentlich beeinflussen. IL-12 fördert eine Differenzierung zu Th1-Zellen, welche Faktoren wie $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ sezernieren. Damit werden Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aktiviert und somit die zelluläre Immunantwort, die vor allem gegen intrazelluläre Pathogene wirksam ist, induziert. IL-4 und IL-10 wiederum favorisieren eine Entwicklung zu Th2-Zellen, die durch die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 B-Zellen und eosinophile Granulozyten aktivieren und somit die humorale Immunantwort induzieren, welche besonders wirksam gegen extrazelluläre Pathogene ist [22-24].

Eine wichtige Untergruppe der $CD4^+$ T-Zellen sind $CD4^+ CD25^+$ regulatorische T-Zellen. Sie stellen 5-10 % der peripheren T-Zellen dar [25]. Ihre physiologische Rolle besteht darin, eine überschießende Immunreaktion mit Gewebeschädigung sowie autoreaktive T-Zellen, die Autoimmunkrankheiten verursachen können, zu antagonisieren [26]. Im Blut von Krebspatienten hat man tumorinduzierte regulatorische T-Zellen, die unter dem Einfluss von IL-10 aus naiven $CD4^+$ T-Zellen entstanden sind, gefunden [27]. Die Akkumulation von regulatorischen T-Zellen ist, wenn auch mit unterschiedlichem Einfluss bei verschiedenen Neoplasien, einer der meist verbreiteten Mechanismen tumorinduzierter Immunsuppression [28-29]. Ihre inhibitorische Wirkung erzielen regulatorische T-Zellen sowohl durch Zell-Zell-Kontakt als auch über die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen [30-31]. Sie können direkt auf T-Zellen einwirken, interagieren aber auch mit dendritischen Zellen und hemmen diese in ihrer T-Zell-Aktivierung [32-33].

B-Zellen dagegen sind Träger der humoralen Immunität. Ihre Entwicklung findet im Knochenmark statt. Membrangebundene Immunglobuline dienen als B-Zell-Rezeptor und können auch lösliche Antigene erkennen. Nach Aktivierung der B-Zellen entwickeln sie sich zu Plasmazellen, welche lösliche Immunglobuline sezernieren.

1.2 IMMUNEVASION VON TUMOREN

Krebs ist nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Die Fünf-Jahre-Rezidivfreiheit von allen Krebsarten liegt derzeit bei 30 - 40 %. Mit den

konventionellen Therapiestrategien (Operation, Bestrahlung und Chemotherapie) hat man zwar in den letzten Jahren durchaus Erfolge erzielt, jedoch setzt man derzeit große Hoffnungen auf Immuntherapien. Sie erscheinen eine vielversprechende Möglichkeit zu sein, Tumoren, die nicht in toto reseziert werden können, spezifisch zu vernichten, ohne dem restlichen Körper Schaden zuzufügen.

Tumorzellen entstehen aus gesunden Zellen durch die Mutation und/oder Deletion eines oder mehrerer Gene. Gene, die Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung regulieren, werden als Protoonkogene bezeichnet. Mutieren diese, werden sie zu Onkogenen. Gene, die den Zellzyklus kontrollieren und Apoptose-Induktion von Zellen mit DNS-Schäden bewirken, nennt man Tumorsuppressorgene. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen führen zur Entstehung einer Tumorzelle. Nur durch das Zusammenkommen mehrerer Mutationen kann die entstandene Tumorzelle überleben. Ein intaktes Immunsystem könnte diese entarteten Zellen prinzipiell erkennen und eliminieren. Dieser Prozess der Elimination von Tumorzellen durch T-Lymphozyten wurde von Burnet und Thomas 1967 als Immunüberwachung bezeichnet [34]. Bald darauf wurde diese Theorie bestätigt, als gezeigt wurde, dass immunsupprimierte Patienten [35] und Patienten mit angeborener Immunschwäche [36] ein erhöhtes Risiko der Entstehung bestimmter Tumoren, wie z. B. Lymphome oder Virus-assoziiertes Tumoren aufweisen. Weiterhin wurde eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit von Lymphozyten im Tumor und einer höheren Überlebensrate gefunden [37].

Dennoch entwickeln Tumorzellen vielfach Mechanismen, um dem Immunsystem zu entgehen. Das ermöglicht die Ausbreitung eines Tumors. Die Immunantwort gegen Tumoren wurde von Dunn in 3 Phasen beschrieben [38]. Die erste Phase, die Eliminationsphase, entspricht der ursprünglichen Theorie der Immunüberwachung. Sie ist gekennzeichnet durch die Elimination der entstandenen Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität. Die darauf folgende Phase, die Äquilibriumphase, beschreibt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem Tumor und dem Immunsystem. Aufgrund der genetischen Instabilität der sich rasch teilenden Zellen, entstehen ständig neue, nicht-immunogene und resistente Tumorzellen. Diese werden durch die Vernichtung der immunogenen Tumorzellen auf diese Weise seligiert. Diese Phase des Äquilibriums kann eine kurze Zeit bis zu Jahrzehnten andauern. Der Tumor, der aus dieser Phase in die Phase der Immunevasion übergeht, ist vom Immunsystem konditioniert, den Effektormechanismen zu entgehen. Zur klinischen Manifestation eines Tumors kommt es also erst nach komplexen Interaktionen zwischen dem Tumor und dem Immunsystem.

1.3 MAUS-TUMORMODELLE FÜR DIE ENTWICKLUNG NEUER THERAPIEVERFAHREN

Die Voraussetzung für die Entwicklung von neuen, erfolgreichen Therapiestrategien ist das Verständnis der molekularen Mechanismen der Immunevasion. Diese müssen mit geeigneten Modellen untersucht werden. Jahrzehnte lang wurde experimentell nur mit transplantierbaren oder chemisch induzierten Tumoren wissenschaftlich gearbeitet. Der Nachteil von transplantierbaren Tumormodellen ist, dass bei diesen Modellen eine große Anzahl von monoklonalen Tumorzellen in ein gesundes Tier gegeben wird. Pathophysiologisch ähnelt das eher einer Infektion. Ein natürlich entstehender Tumor entwickelt sich hingegen aus einer Zelle, die sich langsam vermehrt und weiter mutiert.

Seit der Entwicklung von transgenen Mäusen kann man durch die Überexpression von Onkogenen Spontantumormodelle etablieren. Diese sind der klinischen Situation wesentlich ähnlicher und ermöglichen die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem in verschiedenen Krankheitsstadien.

Für die Untersuchung der Mechanismen des zellulären Netzwerks des Immunsystems wird in dieser Arbeit ein Modell für das humane Burkitt-Lymphom verwendet. Burkitt-Lymphome gehören zu den malignen B-Zell-Lymphomen und können in drei Subtypen eingeteilt werden: das endemische, in Zentralafrika vorkommende, das sporadische und das Immundefizienz-assoziierte [39]. Bei allen Burkitt-Lymphomen findet man eine chromosomale Translokation des c-myc-Onkogens in einen Immunglobulin-Genlocus. Die Expression wird daher nicht mehr von der ursprünglichen DNS-Kontrollsequenz gesteuert, sondern von der Kontrollsequenz der Immunglobulin-Leicht- bzw. Schwerekettenloci.

Die Überexpression des c-myc-Onkogens spielt ätiologisch nicht nur bei der Entstehung des Burkitt-Lymphoms eine Rolle, sondern auch bei vielen anderen Krebsarten des Menschen [40].

Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse exprimieren humanes c-myc-Onkogen unter der Regulation des B-Zell-spezifischen I γ -Enhancers [41]. Sie entwickeln nach ca. 5 Monaten B-Zell-Lymphome. Die tumortragenden Mäuse weisen verdickte Lymphknoten und eine vergrößerte Milz auf. Teilweise entwickeln sie auch einen verdickten Thymus mit Atemnot oder struppiges Fell.

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im transplantierbaren Tumormodell konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen, welche durch NK-Zellen aktiviert wurden, eine Tumorabwehr durch Zytotoxische T-Zellen induzieren können [42-43]. Die NK-Zellen wurden in diesem Modell durch Tumorzellen aktiviert, die das MHC auf ihrer Oberfläche herunterreguliert hatten, um einer T-Zell-Antwort zu entgehen. Durch die aktivierten NK-Zellen wurden dendritische Zellen aktiviert. Diese wiederum induzierten, unabhängig von T-Helferzellen, eine spezifische T-Zell-Antwort. Die auf diese Weise aktivierten T-Zellen konnten Wildtyp-Tumorzellen mit normaler MHC-Expression lysieren. Auf diesem Weg der T-Zell-Aktivierung konnte auch ein immunologisches Langzeitgedächtnis erzeugt werden.

Dieser Mechanismus der Immunaktivierung scheint allerdings nur im transplantierbaren Tumormodell eine Rolle zu spielen. Im Spontantumormodell wurde zwar eine Aktivierung der NK-Zellen beobachtet, jedoch waren die NK-Zellen funktionell in Bezug auf ihre zytotoxischen Fähigkeiten und ihre IFN- γ -Produktion beeinträchtigt [44]. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Auswirkungen diese NK-Zell-Anergie auf die dendritischen Zellen hat. Hierzu sollten die dendritischen Zellen hinsichtlich der Expression von aktivierungsassoziierten Oberflächenmolekülen charakterisiert werden. Diesbezüglich sollten die DCs aus c-myc-Mäusen besonders auf das Vorhandensein von Subpopulationen mit regulatorischen Eigenschaften hin untersucht werden. Da beobachtet wurde, dass DCs aus tumortragenden Organismen in verschiedenen Modellen eine reduzierte Kapazität zur T-Zell-Stimulierung aufweisen, sollten die DCs aus c-myc-Mäusen auch in Bezug auf ihre Funktionalität untersucht werden. Hierzu sollte das Potenzial zur T-Zell Stimulierung sowohl alloge als auch peptidspezifisch untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch das Migrationsverhalten dendritischer Zellen aus c-myc-Mäusen getestet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 MÄUSE

Alle Mäuse wurden im Tierstall des Hämatologikums gezüchtet. Ihre experimentelle Verwendung war von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

2.1.1.1 C-MYC-MÄUSE

Die c-myc-Mäuse exprimieren humanes c-myc unter der Kontrolle einer regulierenden Sequenz des Ig λ -Lokus. Die Mäuse entwickeln nach ca. 5 Monaten B-Zell-Lymphome. Der genetische Hintergrund der Mäuse ist C57BL/6.

2.1.1.2 BALB/C-MÄUSE

Stamm:	BALB/c
MHC-I/II-Haplotyp:	H-2 ^d /I-A ^d
Bezug:	Bommice, Ry (Dänemark)

2.1.1.3 OT-1- UND OT-2-MÄUSE

Die OT-1- und OT-2-Mäuse wurden von der AG Brocker des Instituts für Immunologie der LMU München gezüchtet und sind uns für unsere Experimente dankenswerterweise zur Verfügung gestellt worden. OT-1-Mäuse tragen das Transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) im Kontext von MHC-Klasse I erkennt [45]. Der T-Zell-Rezeptor von OT-2-Mäusen erkennt OVA₃₂₃₋₃₃₉ im Kontext von MHC-Klasse II.

2.1.2 ZELLINIEN

Für verschiedene Kontrollversuche wurden 291-Zellen in Kultur gehalten. Das ist eine Tumorzelllinie, die aus c-myc-Mäusen etabliert wurde. Sie wurden durch Aussäen von primären Lymphomzellen auf eine Schicht von MRC-5 Fibroblasten, die als Nährschicht dienten, generiert. Nach zweiwöchiger Kultur waren die Zellen eigenständig lebensfähig.

2.1.3 CHEMIKALIEN

1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol (50mM)	Invitrogen, Karlsruhe
1kb-plus DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau 2%ig	Merck, Darmstadt
CFSE	Molecular Probes C-1157
Counting Beads	Invitrogen, Karlsruhe
CpG	TIB, Molbiol, Berlin
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 10mg/ml	Merck, Darmstadt
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin 87%ig	Merck, Darmstadt
IFA	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
LPS	Sigma, Deisenhofen
MEM-Medium	Biochrom AG, Berlin
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natrium-EDTA	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe

PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-OFF™	AppliChem GmbH, Darmstadt
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Titriplex® III, Na-EDTA	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
TRIZOL Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blue Stain	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	ICN, Eschwege
Xylencyanol 2%ig	Merck, Darmstadt

2.1.4 ZELLKULTURMEDIEN

Basismedium:	RPMI 1640 ohne L-Glutamin (500 ml) 5 % FKS inaktiviert 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin (200 mM) 5 ml Natriumpyruvat (100 mM) 5 ml nichtessentielle Aminosäuren (100x) 500 µl 2-Merkaptoethanol (50 mM)
T-Zell-Medium:	Basismedium, jedoch mit 10 % FKS, inaktiviert
DC-Medium:	Basismedium, jedoch mit 20 % FKS, inaktiviert
Einfriermedium:	90 % FKS, inaktiviert 10 % DMSO

2.1.5 PUFFER UND LÖSUNGEN

2,5 %iges Agarose-Gel,	3,0 g Agarose, Ultra Pure 1 x 12 0ml TAE, 11,0 µl Ethidiumbromid
------------------------	--

DNS-Auftragspuffer, 2x	0,05 % Xylencyanol 0,05 % Bromphenolblau 70 % Glycerin <i>nach Biorad, München</i>
FACS-Puffer:	500 ml PBS 10 ml FKS 5 ml Natriumazid (10 %ig) 5 ml EDTA (0,5 M)
Lysepuffer (10x):	pH 7,4 8,25 g Ammoniumchlorid 1,00 g Kaliumhydrogencarbonat 37 mg Na-EDTA H ₂ O _{dest} ad 100 ml <i>nach Becton Dickinson, Heidelberg</i>
DEPC-H ₂ O	150 µl DEPC H ₂ O _{dest} ad 100 ml <i>nach Müllhardt, 2002</i>
TAE, 50x pH8,5	242,2 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 18,61 g Na-EDTA H ₂ O-DEPC ad 1000 ml <i>nach Müllhardt, 1999</i>
Waschpuffer für MACS-Kits:	500 ml DPBS 2,5 ml FKS 2 ml Na-EDTA (0,5M)
Puffer für ELISA:	
ELISA-Blockpuffer	10 % FKS in PBS

ELISA-Carbonatpuffer	pH 9,5 0,2 M Natriumcarbonat (von AG Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie)
ELISA-Substratpuffer	TMB Substrate Reagent Set Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Waschpuffer	0,5 ‰ Tween in PBS

2.1.6 MONOKLONALE ANTIKÖRPER

Antigen	Klon	Spezies	Isotyp	Markierung	Bezugsquelle
CD11c	N418	arm. Hamster	IgG	Ax700	BioLegend, San Diego (USA)
CD11b	M1/70	Ratte	IgG2b, κ	Pac Blue	BioLegend
CD80	16-10A1	Hamster	IgG2, λ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD83	Michel-19	Ratte	IgG1, κ	Ax488	BioLegend
CD86	RMMP-2	Ratte	IgG2, λ	APC	BioLegend
MHC-II	28-16-8S	Maus	IgM	FITC	Caltag, Hamburg
IL-10	JES5-16E3	Hamster	IgG2b	APC	Caltag
IL-12 (p40/p70)	C15.6	Ratte	IgG1	PE	Becton Dickinson
TGF- β	9016	Maus	IgG2a	PE	R&D, Minneapolis (USA)
CD4	RM4-5	Ratte	IgG2a, κ	FITC	BD Pharmingen
CD8a	53-6.7	Ratte	IgG2a, κ	PerCP	BD Pharmingen
IFN- γ	XMG1,2	Ratte	IgG1, κ	APC	BioLegend
IL-4	BVD6- 24G2	Ratte	IgG1	PE	Caltag

Tab. 2.3: Verwendete monoklonale Antikörper.

Antikörper für die Verdünnungsreihen der Immunisierung:
von AG Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie

2.1.7 PEPTIDE

OT-1-Peptid:

Sequenz: SIINFEKL (OVA 257-264)

Hersteller: GenWay Biotech, San Diego, (USA)

OT-2-Peptid:

Sequenz: ISQAVHAAHEINEAGR (OVA 323-339)

Hersteller: GenWay Biotech, San Diego, (USA)

HA-OVA:

Hersteller: Peptide Speciality Laboratories GmbH, Heidelberg

2.1.8 PRIMER

Der Primer für IL-12 wurde von der Firma Metabion, Planegg erhalten, der für HPRT von Sigma, Deisenhofen.

Sequenz-name	5'-Primer/vorwärts	5'-Primer/rückwärts	Fragment-größe bp
IL-12p40	AGG TCA CAC TGG ACC AAA GG	TGG TTT GAT GAT GTC CCT GA	173
HPRT	TGGGAGGCCATCACATTGT	TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCA	403

2.1.9 KOMMERZIELLE ANALYSESYSTEME UND VORGEFERTIGTE LÖSUNGEN

First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)

LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Mouse IFN- γ ELISA Set	Becton Dickinson, Heidelberg
Fixation & Permeabilization Kit	eBioscience Inc., San Diego (USA)
CD11c Microbeads, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8a ⁺ T cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ T cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.10 GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN

Biofuge pico	Heraeus, München
Brutschrank, Hera Cell 240	Heraeus, München
Einmalpipetten, 5/10/25 ml	Greiner, Frickenhausen
Eismaschine AF 100AS	Scotsman, Mailand, (Italien)
ELISA-Lesegerät, Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA-Platten,	Maxi-Sorp Nunc, Wiesbaden
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzzytometer, LSRII	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefriertruhe/-schrank	Liebherr, Ochsenhausen
Heizblock,	DB-2A Techne, Cambridge (UK)
IKA®-Schüttler MTS4	Fröbel Laborgeräte
Kulturplatten, 6-/24-/96-Loch	Greiner, Frickenhausen
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
LightCycler® 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zelltrennsystem	
Mehrkanalpipette, Transferpette	Brand, Wertheim
mGM-CSF-haltiger	AG Mocikat, IMI München
Kulturüberstand (1 ng/ μ l)	
Milli-Q®,	Millipore

Reinstwasserherstellungssystem

Neubauer-Zählkammer	neoLab, München
PCR-Thermocycler	T-Gradient Biometra®
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipetten	Eppendorf/Gilson GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettenspitzen	Gilson/Greiner GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettierhilfe, accu jet pro	Brand, Wertheim
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg	
Spectrophotometer ND-100	peqlab, Erlangen
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Transwell (5,0 µm)	Corning Incorporated, Corning (USA)
Transwell (0,45 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, München

2.2 METHODEN

2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1.1 ALLGEMEINES ARBEITEN IN DER ZELLKULTUR

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Hera Cell 240 Brutschrank der Firma Heraeus bei 37 °C, 5% CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank unter Verwendung steriler Materialien, Medien und Lösungen durchgeführt.

2.2.1.2 GEWINNUNG VON MILZ- UND LYMPHKNOTENZELLEN

Nach Tötung durch Asphyxie in CO₂-Atmosphäre wurden die Mäuse in 80 %igem Alkohol desinfiziert. Die Entnahme der Milz sowie der inguinalen, axillären und mandibulären

Lymphknoten erfolgte unter der Sterilbank mit sterilem Besteck. Die Organe wurden in einer Petrischale mit MEM-Medium mit dem Stempel einer Spritze durch ein Zellsieb gedrückt (40 µm Maschendichte, Falcon).

2.2.1.3 GEWINNUNG VON KNOCHENMARKSZELLEN

Die Femur- sowie die Tibiaknochen der Mäuse wurden zur Gewinnung von Knochenmark steril präpariert. Nach Abtrennung der Epiphysen wurde das Knochenmark mit MEM-Medium aus den Diaphysen gespült.

2.2.1.4 GEWINNUNG VON HERZBLUT

Die Entnahme von Herzblut erfolgte mit heparinisierten 1ml-Spritzen aus der Vena cava inferior.

2.2.1.5 ERYTHROZYTENLYSE

Nach Zentrifugation (250 g, 5 Min., 4 °C) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen der Milz, Lymphknoten, des Knochenmarks oder des Herzblutes in 2,5 ml 1x Lysepuffer resuspendiert. Nach zwei Minuten Erythrozytenlyse wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

2.2.1.6 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Der Mittelwert der vier gezählten Großquadrate wurde gebildet. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Mittelwert} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Da Trypanblau nur in tote Zellen diffundiert und diese blau anfärbt, kann man lebende von toten Zellen unterscheiden.

2.2.1.7 KULTIVIERUNG UND REIFUNG DENDRITISCHER ZELLEN

Die Vorläuferzellen der dendritischen Zellen aus dem Knochenmark wurden in Medium mit 20 % FKS 7 Tage kultiviert. Um die Differenzierung zu dendritischen Zellen zu induzieren, wurden 100 µl mGM-CSF ($c = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) pro ml Medium zugegeben. Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel unter gleichzeitiger Gabe von mGM-CSF durchgeführt. Dieses stammt aus Kulturüberständen der Zelllinie MPC11-1F5, welche stabil mit dem mGM-CSF-Gen transfiziert worden ist [46]. Teilweise wurden die dendritischen Zellen durch Zugabe von 1 µg LPS pro ml Medium zur Reifung gebracht.

2.2.1.8 PEPTIDBELADUNG DENDRITISCHER ZELLEN

Die Peptidbeladung erfolgte durch Zugabe des gelösten Peptids zu den durch LPS gereiften dendritischen Zellen. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

2.2.1.9 T-ZELL-STIMULATION

T-Zell-Stimulationen erfolgten in 96-Loch-Rundbodenplatten für 3 – 5 Tage im Brutschrank. Pro Loch wurden 1×10^4 dendritische Zellen mit 2×10^5 Milzzellen oder isolierten T-Zellen in 200 µl Medium mit 10 % FKS gegeben. Nach 3 bzw. 5 Tagen wurde nach Zentrifugation 160 µl Überstand entnommen. Zur Quantifizierung der T-Zell-Stimulation wurde die IFN- γ -Konzentration im ELISA gemessen.

Allostimulationen erfolgten durch Stimulation mit Milzzellen von BALB/c-Mäusen.

Dendritische Zellen wurden entweder aus Knochenmarksvorläuferzellen kultiviert oder mit magnetischer Zellseparation (MACS) aus der Milz gewonnen.

In einzelnen Versuchen wurde die Allostimulation auch im Zweikammersystem durchgeführt. Hierzu wurden 24-Loch-Platten mit Membraneinsätzen (Porengröße 0,45 µm, Becton

Dickinson) verwendet. Es wurden 700 μl der Milzzellen (2×10^5 Zellen/ $100 \mu\text{l}$) in das untere Kompartiment und 350 μl der dendritischen Zellen (2×10^4 Zellen/ $100 \mu\text{l}$) in das obere Kompartiment gegeben. Zur Kontrolle wurde analog dazu in der 24-Loch-Platte ohne Membraneinlage im Einfachkammersystem stimuliert.

Spezifische Stimulation erfolgte mit gereiften, peptidbeladenen aus dem Knochenmark kultivierten dendritischen Zellen. Die T-Zellen stammten aus OT-1- und OT-2-Mäusen und wurden mit magnetischer Selektion aus Milz und Lymphknoten gewonnen.

CD8⁺ T-Zellen aus OT-1-Mäusen wurden mit SIINFEKL-beladenen dendritischen Zellen stimuliert. OVA₃₂₃₋₃₃₉-beladene dendritische Zellen dienten zur Stimulation von CD4⁺ T-Zellen aus den OT-2-Mäusen. Spezifische Stimulationen wurden sowohl mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen bei der Beladung als auch mit unterschiedlichen DC : T-Zell - Verhältnissen bei der Stimulation durchgeführt.

2.2.1.10 AUFTAUEN UND EINFRIEREN VON ZELLEN

$1-3 \times 10^7$ Zellen wurden pro ml Einfrierlösung zum Einfrieren in ein gekühltes Kryoröhrchen überführt und in einem Behälter mit Isopropanol bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Nach ein paar Tagen bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen in Stickstoff eingefroren.

In Stickstoff gefrorene Zellen wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ zügig aufgetaut. Nach Zentrifugation wurde die Einfrierlösung abgesaugt. Nach 5-6 Stunden Inkubation in 5 ml Basismedium im Brutschrank wurden weitere 5 ml Medium zugegeben.

2.2.1.11 CFSE-MARKIERUNG VON ZELLEN

Zur CFSE-Markierung wurden 1×10^6 bis 1×10^7 isolierte dendritische Zellen in $1 \mu\text{M}$ CFSE resuspendiert. Nach acht Minuten Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

2.2.1.12 MIGRATIONSVERSUCHE

Die Migration erfolgte über 90 Minuten im Brutschrank. Verwendet wurde eine 24-Loch-Platte, die durch Membraneinlagen (Porengröße $5 \mu\text{m}$) in zwei Kompartimente geteilt war. In

das untere Kompartiment wurden $0,5 \times 10^6$ Lymphknotenzellen (in 500 μl DC-Medium) gegeben. Zur Kontrolle wurden manche der unteren Kompartimente mit reinem Medium befüllt. Dendritische Zellen wurden mit magnetischer Zellseparation aus der Milz gewonnen und anschließend mit CFSE markiert. 1×10^6 dieser CFSE-markierten DCs wurden in das obere Kompartiment gegeben. Nach erfolgter Migration wurden 100 μl aus der unteren Kammer entnommen und zusammen mit 100 μl Zählkugeln (Counting Beads) im FACS analysiert. Die gewanderten CFSE-markierten Zellen können im FITC-Kanal detektiert werden. Die Quantifizierung der gewanderten Zellen erfolgte mithilfe folgender Formel:

$$\text{Absolutzellzahl (Zellen / } \mu\text{l)} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Kugeln}} \times \text{Anzahl der Zählkugeln pro } \mu\text{l}$$

2.2.1.13 KOKULTUR VON DENDRITISCHEN ZELLEN MIT TUMORZELLEN

Die Kokultur von dendritischen Zellen mit Tumorzellen erfolgte im Brutschrank für 4 bzw. 16 Stunden in einer 24-Loch-Platte in der Einfach- sowie in der Doppelkammer. Hierzu wurden Membraneinlagen der Porengröße 0,45 μm verwendet. Die dendritischen Zellen wurden mittels magnetischer Separation aus der Milz von Wildtyp- und tumortragenden Mäusen gewonnen. 1×10^6 dendritische Zellen und 1×10^6 Tumorzellen der Tumorzelllinie 291 bzw. Lymphknotenzellen einer tumortragenden Maus wurden in 1ml Medium (mit 10 % FKS) in eine 24-Loch-Platte gegeben. Für den Ansatz in der Doppelkammer wurden 1×10^6 291-Zellen in 500 μl Medium (mit 10 % FKS) in die untere Kammer und $0,4 \times 10^6$ dendritische Zellen in 200 μl Medium (mit 10 % FKS) in die obere Kammer gegeben. Ein Teil der dendritischen Zellen wurde gleich nach Separation im FACS analysiert. Nach 4 bzw. 16 Stunden Kokultur wurden die Zellen entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Arbeiten mit RNS wurden auf Eis unter Verwendung von RNase-freien Materialien (Eppendorf Biopur® Safe-Lock Tubes, ART® Pipettenspitzen mit Filter) durchgeführt.

2.2.2.1 EXTRAKTION VON GESAMT-RNS AUS ZELLEN

Zellen, deren RNS extrahiert werden sollte, wurden in TRIzol lysiert (bis zu 10^6 Zellen in 200 μ l). So konnte die RNS von den restlichen Zellbestandteilen getrennt werden. Nach ihrer Extraktion mithilfe von Brom-Chlor-Propan (im Verhältnis 1:5 zu TRIzol) wurde sie mit Isopropanol (im Verhältnis 1:2 zu TRIzol) gefällt. Nach einem Waschschrift in 0,5 ml Ethanol (75 % in DEPC-Wasser), nahm man die RNS in DEPC-Wasser (20 – 40 μ l) auf und löste sie dann bei 56 °C vollständig (15 Min.). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2 KONZENTRATIONS- UND REINHEITSBESTIMMUNG VON RNS

Konzentration und Reinheit von RNS wurden durch Messung ihrer Extinktion bei 260 nm mit dem Spektrophotometer bestimmt.

2.2.2.3 REVERSE TRANSKRIPTION DER RNS IN cDNS

Die reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ der Firma Roche. Umgeschrieben wurde jeweils 1 μ g Gesamt-RNS.

Es wurden Ansätze von jeweils 20 μ l hergestellt, die folgende Reagenzienmengen enthielten:

10x PCR-Puffer (100 mM Tris, 500m M KCl)	2,0 μ l
25 mM MgCl ₂	4,0 μ l
Desoxyribonukleotid-Mix (jeweils 10 mM)	2,0 μ l
Oligo dT	2,0 μ l
RNase Inhibitor	1,0 μ l
AMV Reverse Transkriptase	0,8 μ l \geq 20 U
RNS-Probe	1,0 μ g
Wasser (RNase-frei)	ad 20 μ l

In der PCR-Maschine wurden die Ansätze 10 Min. bei 25 °C gehalten, dann 60 Min. bei 42 °C inkubiert und zuletzt für 5 Min. auf 99 °C erhitzt. Die cDNS wurde zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.4 AMPLIFIKATION VON DNS MITTELS QUANTITATIVER RT-PCR

Mithilfe der quantitativen „real-time-PCR“ kann die Ausgangsmenge an DNS einer Probe bestimmt werden. Verwendet wurde das „LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I“ RT-PCR-Kit von Roche. Es wurden jeweils Ansätze von 20 µl bearbeitet, die sich wie folgt zusammensetzen:

14 µl H₂O
1 µl 5' Primer (5 pmol/µl)
1 µl 3' Primer (5 pmol/µl)
2 µl SYBR Green Master Mix
2 µl cDNA

PCR-Bedingungen:

1. Anfangsdenaturierung	10 Min.	95 °C
2. Amplifikation		
Denaturierung		95 °C
Primeranlagerung	10 Sek.	60 °C
Elongation	25 Sek.	72 °C
3. Schmelzen		95 °C
	10 Sek.	65 °C
		95 °C
Termination	30 Sek.	40 °C

Die Menge der mRNA der c-myc-Mäuse wurde auf die Menge der mRNA eines Haushaltsgens, dem HPRT, sowie auf Wildtyp-Mäuse normiert.

Zur Berechnung diente folgende Formel [47]:

$$\text{Relative Expression} = 2^{(CP1 - CP3) - (CP2 - CP4)}$$

CP1: Kreuzungspunkt von HPRT in c-myc-Maus

CP2: Kreuzungspunkt von HPRT in WT-Maus

CP3: Kreuzungspunkt von IL-12 in c-myc-Maus

CP4: Kreuzungspunkt von IL-12 in WT-Maus

2.2.2.5 DARSTELLUNG VON DNS MITTELS GELELEKTROPHORESE

Für die Analyse von PCR-Produkten wurden jeweils 10 µl eines PCR-Ansatzes zusammen mit 2 µl DNS-Auftragspuffer in die Tasche eines 2,5 %igen Agarose-Gels (120 ml 1x TAE, 3 g Agarose, 10 µl Ethidiumbromid) gefüllt. Als Größenmarker diente eine 1 kb-plus Leiter. Von dieser wurden 1,0 µl mit 10 µl PCR-H₂O und 2 µl Auftragspuffer pro Geltasche zugegeben. Nach einer Laufzeit von 35 – 40 Min. in einer Horizontalgelapparatur in 1x TAE bei einer Spannung von 130 V wurden die Produktbanden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

2.2.3 IMMUNBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.3.1 IMMUNMAGNETISCHE ZELLSEPARATION (MACS)

Mithilfe der Immunmagnetischen Zellseparation (MACS) können bestimmte Zellarten oder Zellsubpopulation von den übrigen Zellen getrennt werden. Hierfür wurden Milz- bzw. Lymphknotenzellen lysiert und gewaschen.

Die positive Selektion der dendritischen Zellen erfolgte mit anti-CD11c-Antikörpern, die an Magnetpartikel gekoppelt waren. 10⁸ Zellen in 400 µl MACS-Puffer wurden mit 100 µl Antikörper für 15 Min. inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in eine im Miltenyi-Magneten platzierte Säule (LS Column), die vorher mit MACS-Puffer durchgespült wurde, gegeben. Die magnetpartikelgebundenen Zellen blieben im Magnetfeld haften. Die unspezifisch gebundenen Zellen wurden durch drei Spülungsschritte mit je 3ml Pufferlösung

entfernt. Die dendritischen Zellen wurden mit 5 ml Puffer aus der Säule, die nun aus dem Magnetfeld entfernt wurde, ausgewaschen.

Die negative Selektion der CD4⁺ sowie der CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit einer Biotin-markierten Antikörpermischung, die diejenigen Zellen, die depletiert werden sollen, bindet. 10⁸ Zellen in 400 µl MACS-Puffer wurden mit 100 µl Antikörpermischung 10 Min. lang inkubiert. Anschließend wurden Magnetpartikel-gekoppelte anti-Biotin-Antikörper zugegeben und 15 min. inkubiert (200 µl Antikörper für 10⁸ Zellen). Die Separation in der Selektionssäule erfolgt wie oben beschrieben, jedoch sind die selektionierten Zellen diejenigen, die nicht in der Säule anhaften und im Durchlauf aufgefangen werden. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mithilfe der Durchflusszytometrie kontrolliert.

2.2.3.2 ENZYMGEKOPPELTER IMMUNABSORPTIONSTEST (ELISA)

Der ELISA diente zur Bestimmung der IFN- γ -Konzentration in Überständen der T-Zell-Stimulationen. Verwendet wurde das „Mouse IFN- γ ELISA Set“ von BD. Zunächst wurden die Platten mit jeweils 100 µl des Einfang-Antikörpers beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Antikörper wurde 1:250 in Carbonatpuffer verdünnt. Die weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Gewaschen wurde jeweils fünfmal mit Waschpuffer. Nach einstündiger Blockierung mit Blockpuffer (400 µl pro Loch) wurden die Platten für zwei Stunden mit den Standards und den Proben inkubiert (jeweils 100 µl). Danach wurde der Detektions-Antikörper zusammen mit dem Enzym aufgetragen (100 µl pro Loch) und für eine Stunde inkubiert (jeweils 1:250 in Blockpuffer verdünnt). Zuletzt wurde das Substrat (TMB Substrate Reagent Set, Reagenz A und Reagenz B 1:1 gemischt; 100 µl pro Loch) für 30 Min. zugegeben und dann durch Stopplösung (2 N H₂SO₄) gestoppt. Die Extinktion wurde im ELISA-Lesegerät bei 450 nm gemessen.

2.2.3.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence activated cell sorting) ermöglicht das Zählen von Zellen sowie die Analyse ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften in einem Flüssigkeitsstrom. Sie ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern.

2.2.3.3.1 Färbung von Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern

Zur Färbung von Oberflächenmolekülen wurden 10^6 Zellen (in 50 μ l FACS-Puffer) mit 50 μ l in FACS-Puffer verdünnten Antikörpern inkubiert (20 Minuten lang bei 4 °C). Die individuelle optimale Verdünnung von Antikörpern wurde in Vorversuchen durch eine Verdünnungsreihe ermittelt. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und zur Messung in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen.

Bei der Färbung intrazellulärer Strukturen wurde zunächst eine Oberflächenfärbung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte mit dem „Fixation & Permeabilization Kit“ der Firma eBioscience bei Raumtemperatur. Nach Waschen und Absaugen des FACS-Puffers wurden 100 μ l der Fixationslösung unter ständigem Schütteln zugegeben und für 30 Min. inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Permeabilisierungspuffer (1:10 Verdünnung des 10X Permeabilisierungspuffer des Kits) wurde 20 Min. mit den Antikörpern für die intrazelluläre Färbung gefärbt (in Permeabilisierungspuffer verdünnt, 25 μ l insgesamt). Nach weiteren zwei Waschschrritten mit Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen zur Messung in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.3.3.2 Messung und Auswertung

Gemessen wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen am LSRII unter Verwendung der FACSDiVa-Software. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software, Version 7.2.5. (Tree Star, Ashland, OR, USA). Analysiert wurden nur lebende Einzelzellen. Die Ergebnisse wurden, soweit nicht anders angegeben, auf Wildtyp-Mäuse normiert.

2.2.4 IMMUNISIERUNG

Für die Untersuchung der Immunantwort der c-myc-Mäuse wurde eine Immunisierung mit HA-OVA (Hämagglutinin-Ovalbumin) durchgeführt. Für diesen Versuch wurden jeweils 5 c-myc- und 5 WT-Mäuse im Alter von etwa 8 Wochen ausgewählt. Am Tag 0 der Immunisierung wurden jeweils 50 μ l Blut aus der Schwanzspitze entnommen. Nach Zentrifugation konnte das Serum abpipettiert und bei -20 °C eingefroren werden. Immunisiert wurde am Tag 0 mit einer Mischung aus 60 μ g HA-OVA (1,5 mg/ml), 10 μ l CpG

(500µg/ml), 200 µl IFA (Incomplete Freud's adjuvant) und 253,8 µl PBS. 200 µl des Immunisierungscocktails wurden subkutan und 200 µl intraperitoneal verabreicht. Am Tag 10, 20, 30 und 40 der Immunisierung wurde wieder jeweils 50 µl Blut aus der Schwanzspitze entnommen. Immunisiert wurde erneut an Tag 10 und 20. Hierzu wurden 60 µg HA-OVA und 10 µl CpG in 400 µl PBS gelöst. Davon wurden 200 µl subkutan und 200 µl intraperitoneal gegeben.

Am Tag 61 wurde den Mäusen Herzblut und die Milz entnommen. In der aus den Milzen gewonnenen Zellsuspension wurden die T-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden intrazelluläre Färbungen von IFN- γ und IL-4 der CD8⁺- und CD4⁺ T-Zellen durchgeführt.

In den Seren der Mäuse wurden mithilfe des ELISA Immunglobulinsubklassen analysiert. Durch logarithmische Verdünnungsreihen konnten die Titer der einzelnen Immunglobulinsubklassen bestimmt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN IN C-MYC-MÄUSEN

3.1.1 ZELLZAHL

In einigen Tumormodellen ist von einer Verminderung der Zahl der dendritischen Zellen berichtet worden [48-49]. Um zu überprüfen, ob dies auch in c-myc-Mäusen der Fall sei, wurde zunächst die Zahl der dendritischen Zellen bestimmt. Hierzu wurden dendritische Zellen in Lymphknoten, Milz und Blut mit einem Antikörper gegen CD11c, welcher als Marker für dendritische Zellen gilt, angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Sowohl die absolute Anzahl der dendritischen Zellen als auch ihr prozentualer Anteil war in tumortragenden Tieren erhöht. Abb. 3.1 zeigt die signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils dendritischer Zellen, bezogen auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen aus der Milz ($P=0,044$), dem Lymphknoten ($P=0,011$) und dem Blut ($P=0,006$). Diese vermehrte Anzahl der DCs war auch bereits in c-myc-Mäusen erkennbar, die noch keine klinischen Zeichen des Tumorwachstums zeigten.

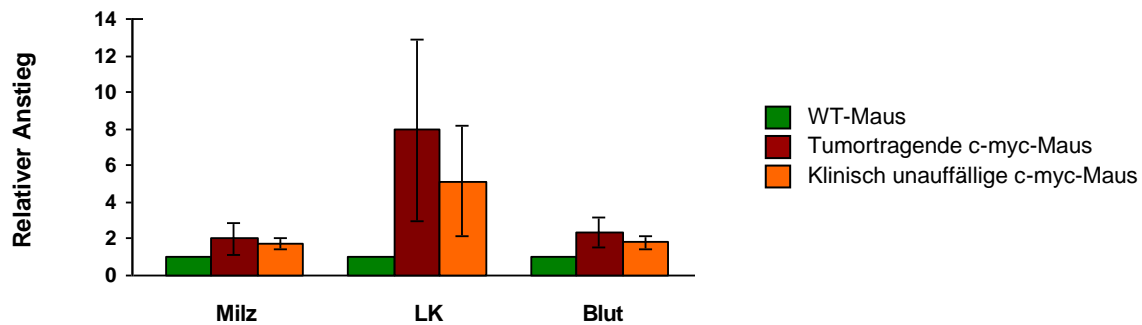


Abb. 3.1: Relativer Anstieg des prozentualen Anteils von DCs in verschiedenen Kompartimenten

Analyse der Zellen aus Milz, LK und Blut mit Hilfe der Durchflusszytometrie hinsichtlich des Anteils an CD11c⁺ dendritischen Zellen. Normiert wurde der prozentuale Anteil der dendritischen Zellen in c-myc-Mäusen auf jenen von Wildtyp-Mäusen (WT-Mäusen).

3.1.2 SUBPOPULATIONEN DER DENDRITISCHEN ZELLEN

Die dendritischen Zellen kann man in Bezug auf ihre CD11c-Expression in zwei Subpopulationen unterscheiden: CD11c^{hoch} und CD11c^{niedrig} (s. Abb. 3.2). Diese Subpopulationen unterscheiden sich auch bezüglich weiterer Oberflächenmarker sowie ihrer Zytokinexpression. Wie man in Abb. 3.2 erkennen kann, ist der Anteil an CD11c^{niedrig}-Zellen größer als der der CD11c^{hoch}-Zellen. Die Abb. 3.3 zeigt den relativen Anteil der CD11c^{niedrig}-Zellen im Verhältnis zu CD11c^{hoch}-Zellen, die auf 1 normiert wurden. Bei tumortragenden c-myc-Mäusen ist das Verhältnis zugunsten der CD11c^{niedrig}-Zellen verschoben. Im Gegensatz dazu ist in klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen der relative Anteil der CD11c^{niedrig}-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen geringfügig vermindert.

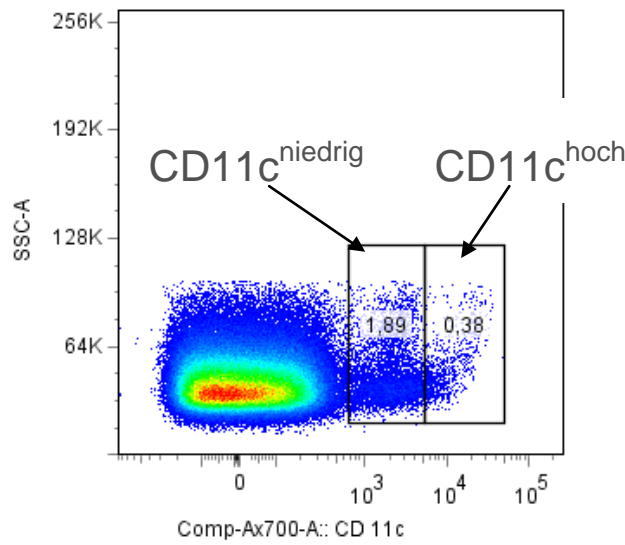


Abb. 3.2: DC-Subpopulationen in WT-Mäusen

In der durchflusszytometrischen Analyse kann man zwei Populationen, die sich hinsichtlich ihrer CD11c-Expression unterscheiden, erkennen. Sie werden im Folgenden mit CD11c^{hoch}-Zellen und CD11c^{niedrig}-Zellen benannt.

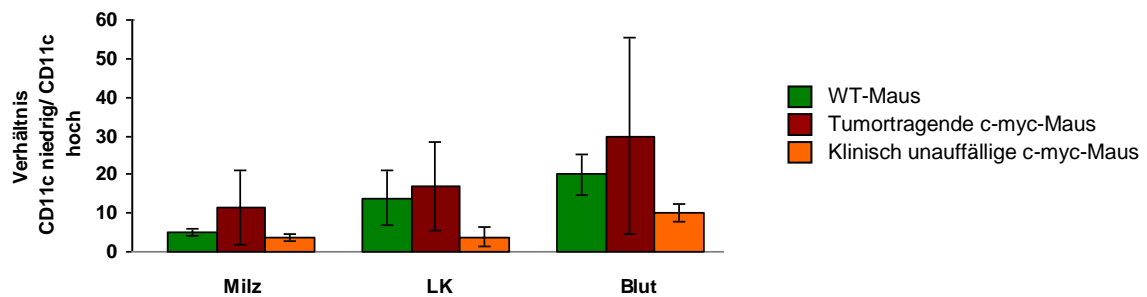


Abb. 3.3: Verhältnis der CD11c^{niedrig}-Zellen zu den CD11c^{hoch}-Zellen

Der prozentuale Anteil der CD11c^{niedrig}-Zellen wurde auf jenen der CD11c^{hoch}-Zellen normiert.

3.1.3 PHÄNOTYPISCHE AKTIVIERUNGSZEICHEN DER DC-SUBPOPULATIONEN

Dendritische Zellen können sowohl antigenspezifische T-Zell-Aktivierung als auch Toleranzinduktion bewirken. In den letzten Jahren wurden auch regulatorische dendritische Zellen mit immunsuppressiven Fähigkeiten beschrieben. Der Reifungsgrad und die Funktion der dendritischen Zellen korreliert mit der Expression verschiedener Oberflächenmarker. Reife dendritische Zellen mit einer hohen Expression von MHC-II, CD80 und CD86 führen zur T-Zell-Aktivierung, während unreife eine Toleranzinduktion bewirken. Um den Reifungsgrad und die Funktionalität der dendritischen Zellen in c-myc-Mäusen zu charakterisieren, wurde zunächst der Phänotyp bestimmt. Dazu wurden mithilfe der Durchflusszytometrie folgende Oberflächenmarker der dendritischen Zellen untersucht: MHC-II, die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, der Aktivierungsmarker CD83 sowie CD11b.

In Wildtyp-Mäusen ist die MHC-II-Expression auf den $CD11c^{\text{hoch}}$ -Zellen höher als auf $CD11c^{\text{niedrig}}$ -Zellen. In c-myc-Mäusen dagegen ist die MHC-II-Expression auf den $CD11c^{\text{hoch}}$ -Zellen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, herabreguliert. Sie ist teilweise sogar niedriger als die der $CD11c^{\text{niedrig}}$ -Zellen desselben Tiers in dem jeweiligen Organ. $CD11c^{\text{niedrig}}$ -Zellen aus c-myc-Mäusen wiederum weisen eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöhte MHC-II-Expression auf (vgl. Abb. 3.4).

Weiterhin exprimieren $CD11c^{\text{hoch}}$ -Zellen eine höhere Menge der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. In c-myc-Mäusen sind diese, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, auf beiden DC-Subpopulationen erhöht (siehe Abb. 3.5 und 3.6).

Der Aktivierungsmarker CD83 ist in Wildtyp-Mäusen auf $CD11c^{\text{hoch}}$ -Zellen in geringerem Maße exprimiert als auf $CD11c^{\text{niedrig}}$ -Zellen. CD83 ist vor allem auf den $CD11c^{\text{hoch}}$ -Zellen aus tumortragenden c-myc-Mäusen erhöht. Eine signifikante Erhöhung lag jedoch nur bei Zellen aus der Milz vor ($P=0,046$). Auf $CD11c^{\text{niedrig}}$ -Zellen war CD83 nur bei Zellen, die aus der Milz stammen, geringfügig, jedoch nicht signifikant erhöht (s. Abb. 3.7).

Im Rahmen der Phänotypisierung der DCs der c-myc-Mäuse wurden auch klinisch unauffällige c-myc-Mäuse untersucht. Ihre phänotypischen Veränderungen stellen teilweise ein Mittel zwischen dem Phänotyp der WT-Mäuse und dem der tumortragenden Mäuse dar, manchmal jedoch nicht. Bei diesen Mäusen ist jedoch nicht determinierbar wie viele Tumorzellen sie schon in sich tragen, also in welchem Krankheitsstadium sie sich befinden.

Das Oberflächenmolekül CD11b gehört nicht zu den klassischen Markern der dendritischen Zellen, über die eine Aussage über den Reifungsgrad gemacht werden kann. In der letzten Zeit ist er jedoch zur Definition regulatorischer DCs verwendet worden [20, 50]. Daher wurden die dendritischen Zellen in c-myc-Mäusen auch hinsichtlich ihrer CD11b-Expression untersucht. CD11b wird in Wildtyp-Mäusen von CD11c^{hoch}-Zellen stärker exprimiert als von CD11c^{niedrig}-Zellen. In c-myc-Mäusen ist die CD11b-Expression der CD11c^{niedrig}-Zellen erhöht. In Abb. 3.8 sieht man, dass es verschiedene Populationen mit unterschiedlicher Ausprägung der CD11b-Expression gibt. Bei den CD11c^{niedrig}-Zellen der c-myc-Mäuse kommt es zu einer Verschiebung zugunsten der Populationen mit hoher und mittlerer CD11b-Expression. Die CD11c^{hoch}-Zellen der c-myc-Mäuse sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unverändert (nicht gezeigt).

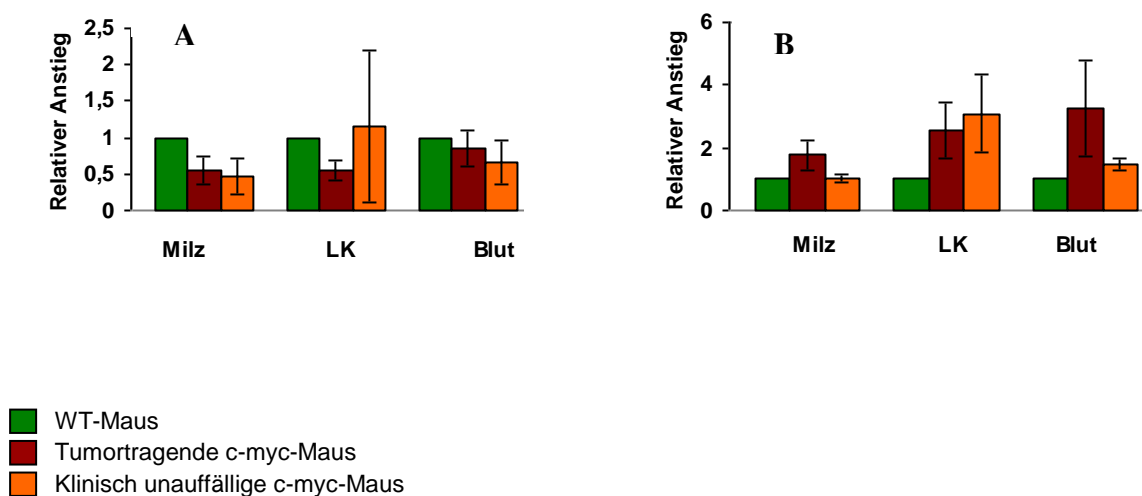


Abb. 3.4: MHC-II-Expression auf den CD11c^{hoch}-Zellen (A) und auf den CD11c^{niedrig}-Zellen (B)
 Durchflusszytometrische Analyse der MHC-II-Expression der DCs aus tumortragenden und klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen sowie aus WT-Mäusen. Normiert wurde auf die DCs der Wildtyp-Mäuse. Die MHC-II-Expression ist auf den CD11c^{hoch}-Zellen der Milz und Lymphknoten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erniedrigt (Milz: P=0,001, LK: P=0,002, Blut: P=0,41). Auf den CD11c^{niedrig}-Zellen der Milz und Lymphknoten sowie des Blutes ist die MHC-II-Expression, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, signifikant erhöht (Milz: P=0,02, LK: P=0,013, Blut: P=0,003)

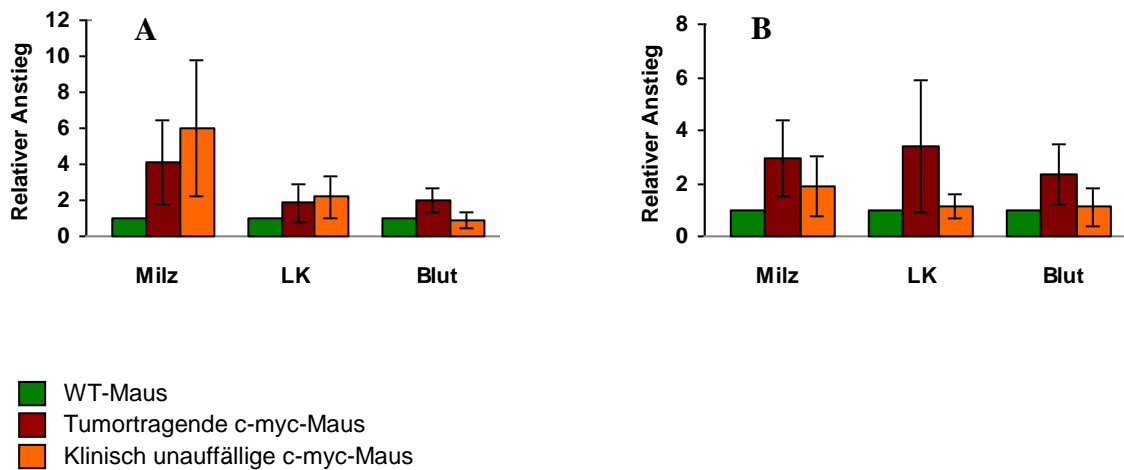


Abb. 3.5: CD80-Expression auf den CD11c^{hoch}-Zellen (A) und auf den CD11c^{niedrig}-Zellen (B)

Die C80-Expression ist auf den CD11c^{hoch}-Zellen der Milz und des Blutes im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (Milz: P=0,049, LK: P=0,32, Blut: P=0,031). Auf den CD11c^{niedrig}-Zellen der Milz und des Blutes ist die CD80-Expression, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, signifikant erhöht (Milz: P=0,047, LK: P=0,15, Blut: P=0,045)

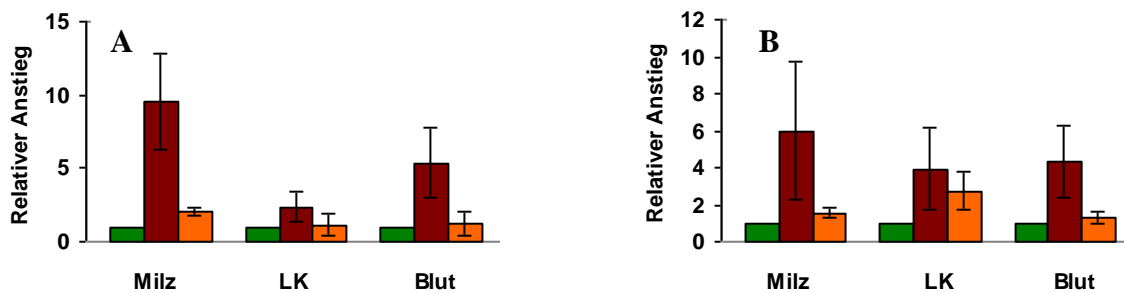


Abb. 3.6: CD86-Expression auf den CD11c^{hoch}-Zellen (A) und auf den CD11c^{niedrig}-Zellen (B)

Erklärung der Balken: siehe Abb. 3.5. Die C86-Expression ist auf den CD11c^{hoch}-Zellen der Milz und der Lymphknoten sowie des Blutes im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (Milz: P=0,012, LK: P=0,026, Blut: P=0,01). Auf den CD11c^{niedrig}-Zellen der Milz und der Lymphknoten sowie des Blutes ist die CD86-Expression, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, signifikant erhöht (Milz: P=0,049, LK: P=0,049, Blut: P=0,014).

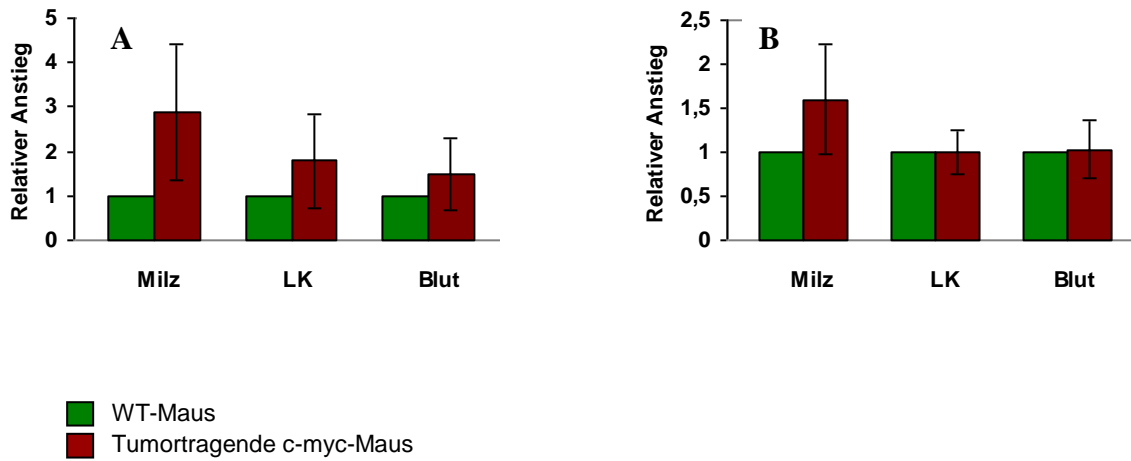


Abb. 3.7: CD83-Expression auf den CD11c^{hoch}-Zellen (A) und auf den CD11c^{niedrig}-Zellen (B)

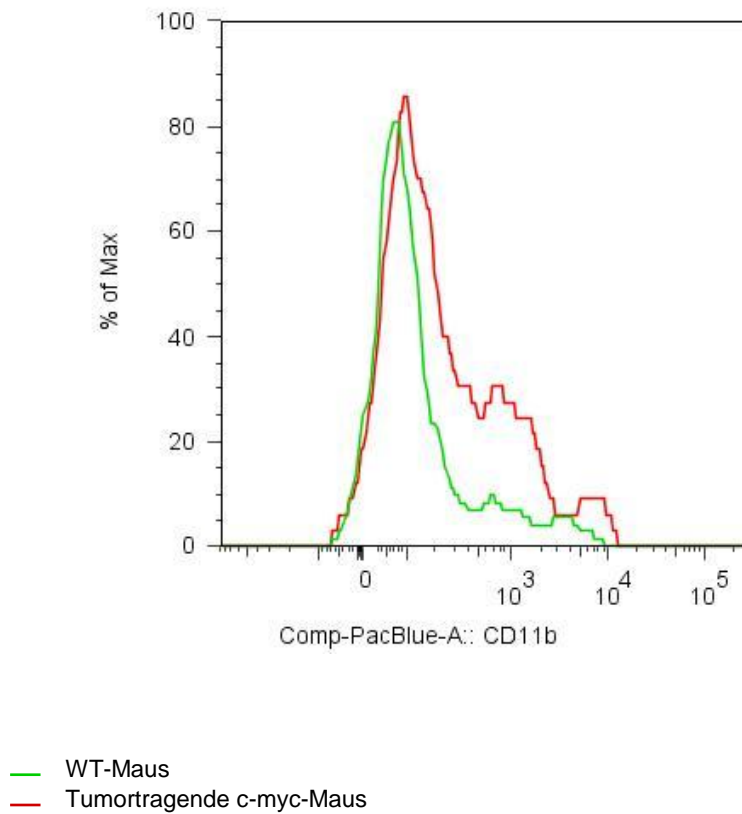


Abb. 3.8: CD11b-Expression auf den CD11c^{niedrig}-Zellen im LK

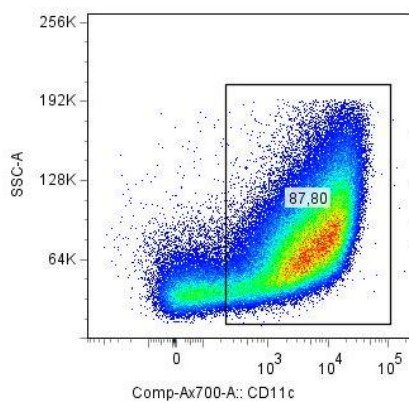
Repräsentatives FACS-Bild der CD11b-Expression aus drei verschiedenen Färbungen.

3.1.4 PHÄNOTYP DER AUS DEM KNOCHENMARK KULTIVIERTEN DENDRITISCHEN ZELLEN

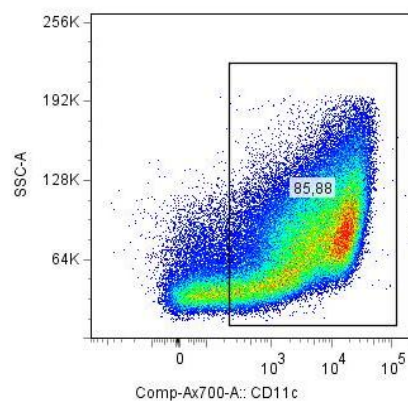
Für Therapieansätze in der Klinik werden zunehmend dendritische Zellen verwendet, die aus dem Knochenmark kultiviert werden. Durch Zugabe von GM-CSF erreicht man die Differenzierung der multipotenten Vorläuferzellen zu dendritischen Zellen. Durch Zugabe von LPS können die unreifen dendritischen Zellen gereift werden. Da in verschiedenen funktionellen Testsystemen auf diese dendritischen Zellen zurückgegriffen wurde, ist hier ihr Phänotyp, der mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt wurde, beschrieben.

Abb. 3.9 zeigt, dass die Bildung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von c-myc-Mäusen nicht beeinträchtigt ist. Die Reinheit der Kultur ist vergleichbar mit der aus Wildtyp-Mäusen. Unreife dendritische Zellen, die aus dem Knochenmark von c-myc-Mäusen kultiviert wurden, unterschieden sich nicht von dendritischen Zellen aus Wildtyp-Mäusen. Jedoch scheint die In-vitro-Reifung in Gegenwart von LPS beeinträchtigt zu sein. So zeigten gereifte dendritische Zellen aus c-myc-Mäusen eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verminderte Expression von MHC-II und CD86, während die CD80-Expression identisch war (nicht gezeigt).

Unreife DCs:

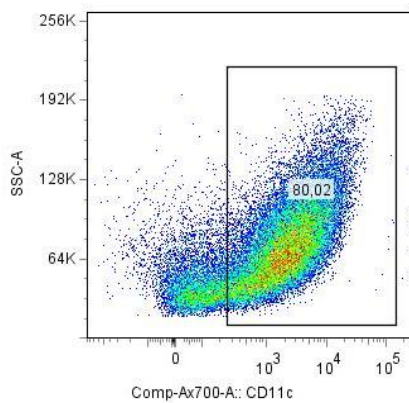


Wildtyp-Maus

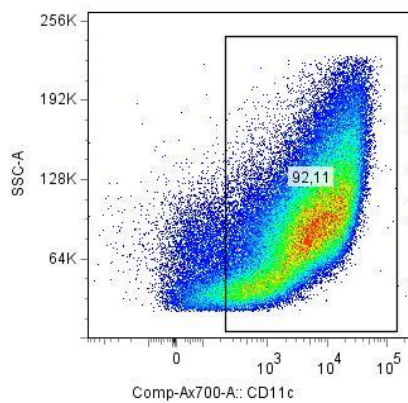


c-myc-Maus

Reife DCs:



Wildtyp-Maus



c-myc-Maus

Abb. 3.9: FACS-Analyse der Reinheit dendritischer Zellen, die aus dem Knochenmark kultiviert wurden

3.2 ZYTOKINEXPRESSION

Da die von DCs produzierten Zytokine einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung der T-Helferzellen in Th1- bzw. Th2-Zellen [51] und damit auf die Antitumoraktivität tumorspezifischer T-Zellen haben [52], wurde die Expression von IL-10, IL-12 und TGF- β

der dendritischen Zellen untersucht. Die IL-12-Expression dendritischer Zellen wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene analysiert.

3.2.1 IL-12-Expression auf Transkriptebene

Für die RT-PCR wurden die dendritischen Zellen mit Anti-CD11c-Magnetpartikeln aus Milzzellen isoliert. Eine Unterteilung der dendritischen Zellen in Subpopulationen war so nicht möglich. Der IL-12-mRNS-Spiegel der Milz-DCs (s. Abb. 3.10) ist in dendritischen Zellen im Durchschnitt unverändert, wobei eine große Streuung vorlag.

Die IL-12-mRNS wurde ebenfalls in den aus dem Knochenmark kultivierten, reifen und unreifen dendritischen Zellen bestimmt. Die dendritischen Zellen, die aus dem Knochenmark von c-myc-Mäusen kultiviert wurden, zeigen eine leicht verminderte IL-12-mRNS-Menge (vgl. Abb. 3.11).

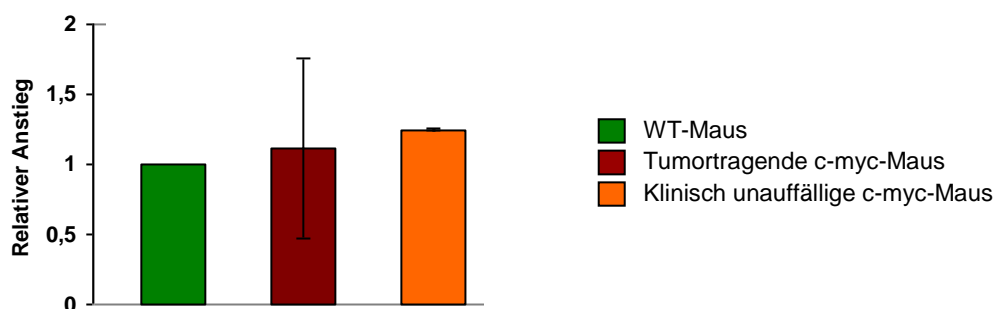


Abb. 3.10: IL-12-mRNS in Milz-DCs

Normiert wurde auf die mRNA des Haushaltsgens HPRT sowie auf DCs von Wildtyp-Mäusen.

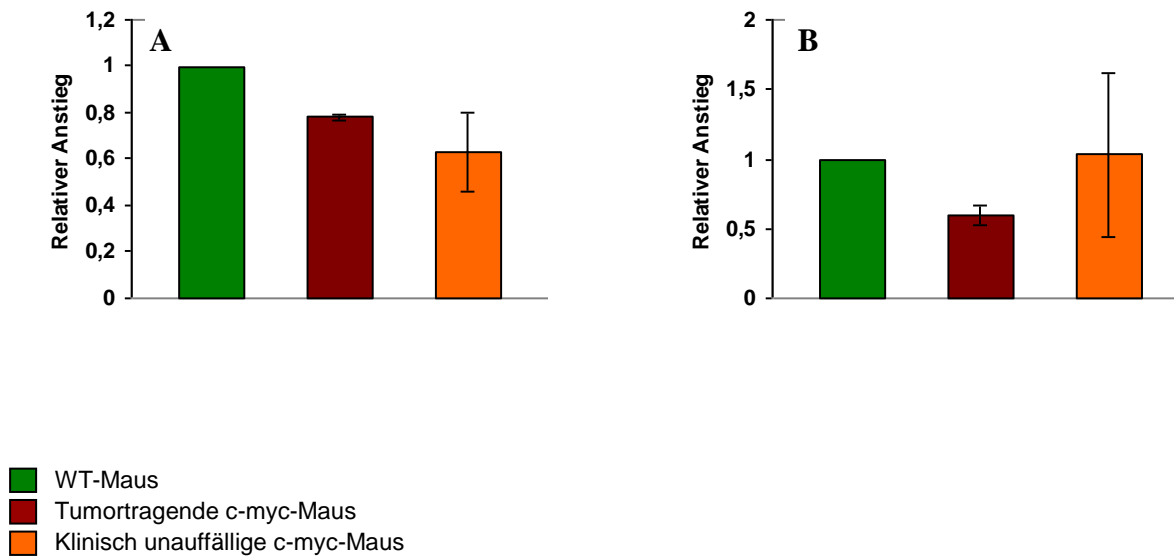


Abb. 3.11: IL-12-mRNS in aus dem Knochenmark kultivierten unreifen (A) und reifen (B) DCs

3.2.2 ZYTOKINEXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Um die Zytokinexpression verschiedener DC-Subpopulationen zu vergleichen, wurden auch intrazelluläre FACS-Färbungen durchgeführt. Gemessen wurden IL-12, IL-10 und TGF- β in Zellen aus Milz, Lymphknoten und Blut, ohne diese vorher in vitro zu stimulieren.

Die IL-10-Expression der CD11c^{hoch}-Zellen aus c-myc-Mäusen ist im Vergleich zu denen aus Wildtyp-Mäusen signifikant vermindert, die der CD11c^{niedrig}-Zellen erhöht (s. Abb. 3.12). Die IL-12-Expression ist, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, auf CD11c^{hoch}-Zellen erhöht und auf CD11c^{niedrig}-Zellen vermindert (s. Abb. 3.13).

TGF- β wird von CD11c^{hoch}-Zellen leicht vermehrt exprimiert (nicht gezeigt). Auf CD11c^{niedrig}-Zellen ist es deutlich hochreguliert (s. Abb. 3.14).

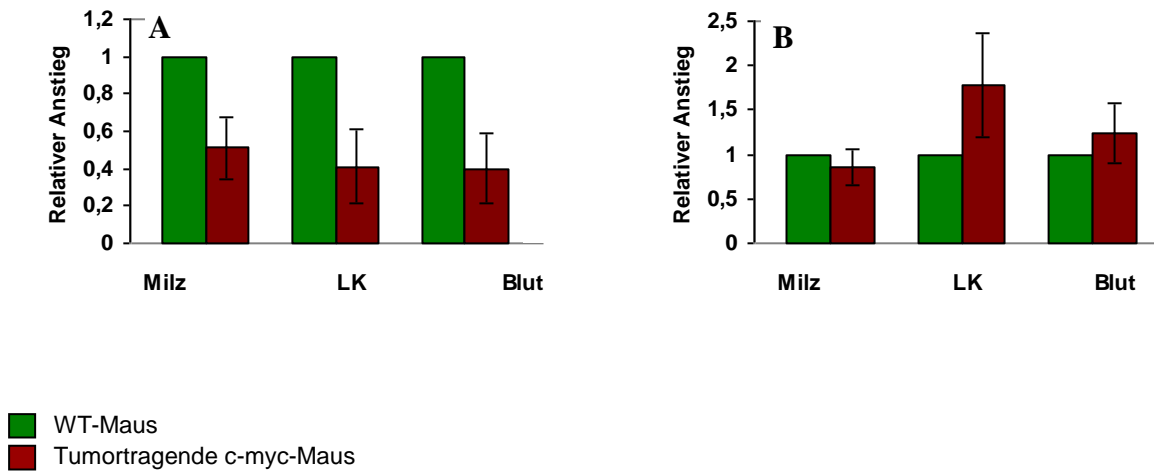


Abb. 3.12: IL-10-Expression in CD11c^{hoch}-Zellen (A) und in CD11c^{niedrig}-Zellen (B)

Die IL-10-Expression der CD11c^{hoch}-Zellen ist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (Milz (P=0,00002), LK (P=0,00002), Blut (P=0,00008)). Die CD11c^{niedrig}-Zellen der Lymphknoten zeigen eine, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, signifikant erhöhte IL-10-Expression (LK: P=0,03).

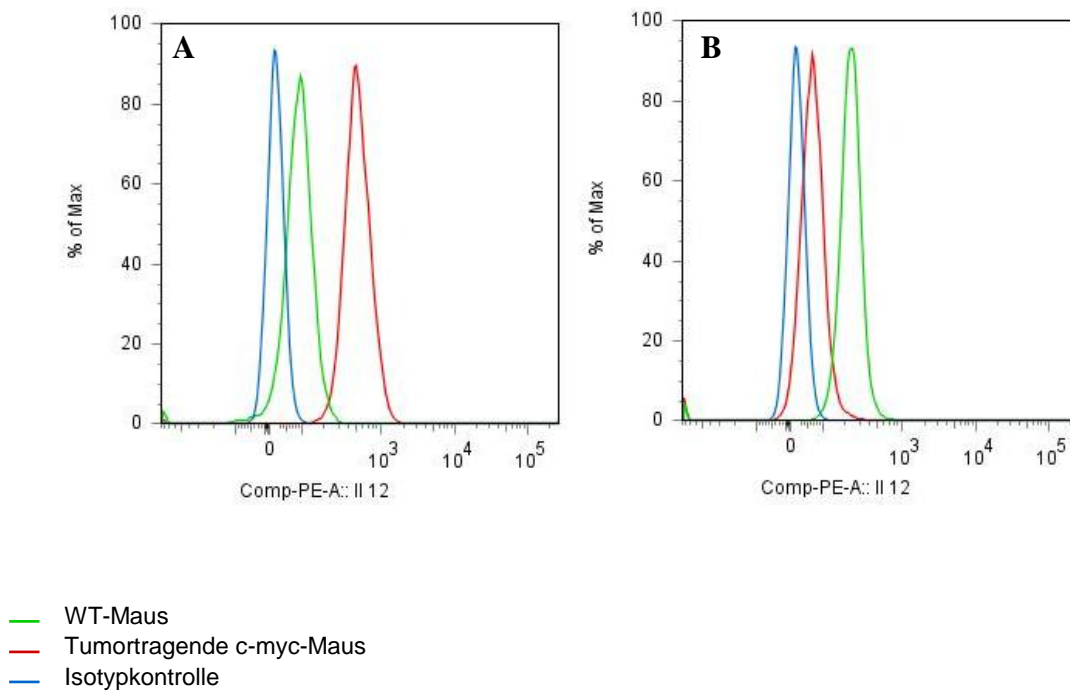


Abb. 3.13: Repräsentative FACS-Bilder der IL-12-Expression in CD11c^{hoch}-Zellen (A) und in CD11c^{niedrig}-Zellen (B)

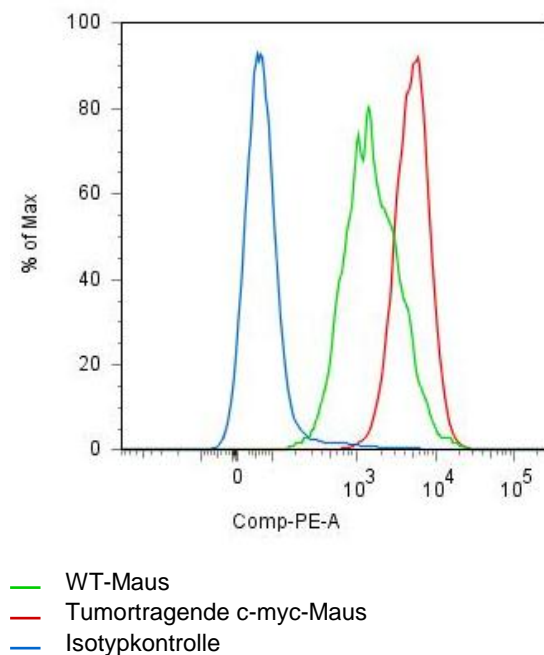


Abb. 3.14: Repräsentatives FACS-Bild der TGF- β -Expression in CD11c^{niedrig}-Zellen

3.3 INDUKTION DES IMMUNSUPPRESSIVEN ZYTOKINPROFILS DER DENDRITISCHEN ZELLEN DURCH TUMORZELLEN

In Abschnitt 3.1 und 3.2 ist gezeigt, dass sich die DCs in c-myc-Mäusen sowohl phänotypisch als auch hinsichtlich ihrer Zytokinexpression von denjenigen in Wildtyp-Mäusen unterscheiden. Daraus ergibt sich die Frage, wodurch diese Veränderungen bedingt sind. Der Effekt könnte durch die Tumorzellen direkt vermittelt oder durch andere Zellen des Immunsystems, wie z. B. regulatorische T-Zellen, induziert werden. Um herauszufinden, ob Tumorzellen allein fähig sind, die beschriebenen Veränderungen der DCs zu induzieren, wurden dendritische Zellen mit 291-Zellen kokultiviert. 291-Zellen sind Zellen einer Tumorzelllinie, die aus c-myc-Mäusen etabliert wurde. Zur Beurteilung des Einflusses von tumorinfiltrierenden Zellen des Immunsystems und Stromazellen wurden dendritische Zellen außerdem mit Lymphknotenzellen einer tumortragenden Maus kultiviert. Um weiterhin zu

testen, welche Rolle Zell-Zell-Kontakte bzw. lösliche Faktoren spielen, wurde die Kokultur in einer Einfachkammer sowie in einer durch eine Membran der Porengröße 0,45 µm getrennten Doppelkammer durchgeführt. Die dendritischen Zellen wurden mittels magnetischer Separation aus der Milz von Wildtyp- und c-myc-Mäusen gewonnen. Nach 4 bzw. 16 Stunden Kokultur im Brutschrank wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Expression von CD11b, IL-10, IL-12 und TGF-β analysiert. In Abb. 3.15 – 3.18 sind exemplarisch die CD11c^{niedrig}-Zellen gezeigt. Abb. 3.16 zeigt eine Erhöhung der CD11b-Expression nach Kokultur mit Tumorzellen. Ebenso kommt es zu einer Hochregulation der Expression von IL-10 und TGF-β. IL-12 wird nach Kokultur mit Tumorzellen vermindert exprimiert. In allen Abbildungen sieht man, dass die Kokultur in der Einfach- und Doppelkammer zu identischen Ergebnissen führt. Auch die Kokultur mit Lymphknotenzellen aus tumortragenden Mäusen induziert gleichartige Veränderungen der dendritischen Zellen. Es ist also anzunehmen, dass die beobachteten Veränderungen durch lösliche, von der Tumorzelle sezernierte Faktoren vermittelt werden.

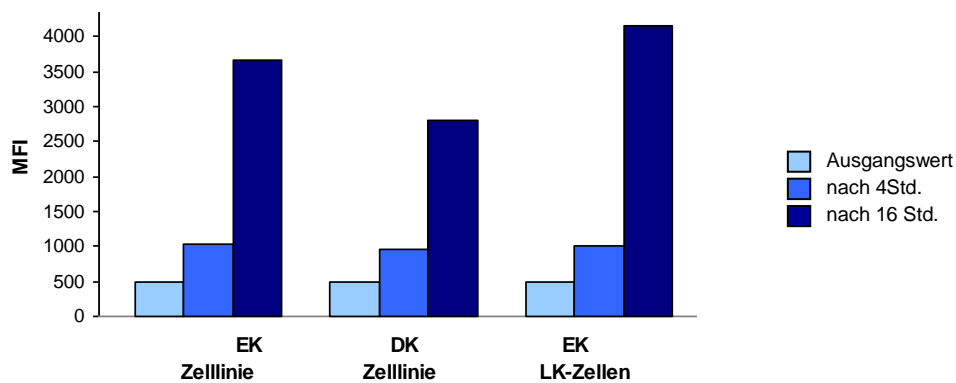


Abb. 3.15: CD11b-Expression der CD11c^{niedrig}-Zellen nach Kokultur mit Tumorzellen
Zeitverlauf der CD11b-Expression nach Kokultur mit 291-Zellen, einer Tumorzelllinie, in Einfachkammer (EK), Doppelkammer (DK) und Kokultur mit Lymphknotenzellen in der Einfachkammer (mit LK).

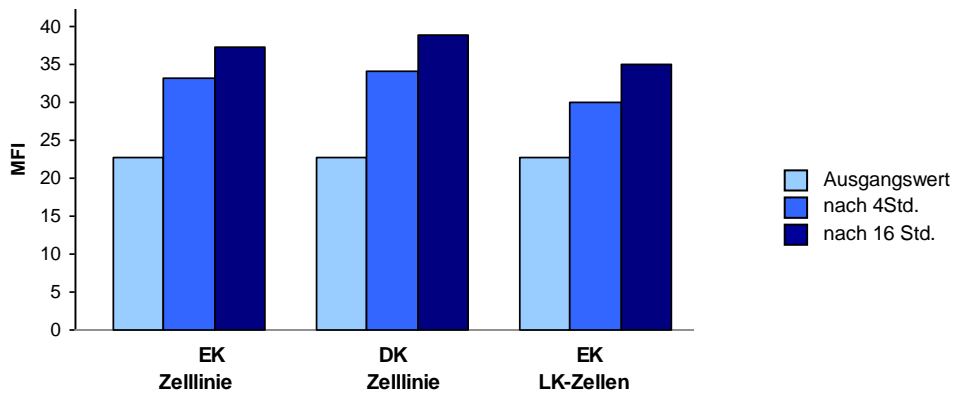


Abb. 3.16: IL-10-Expression der CD11c^{niedrig}-Zellen nach Kokultur mit Tumorzellen
 Zeitverlauf der IL-10-Expression nach Kokultur mit 291-Zellen, einer Tumorzelllinie, in Einfachkammer (EK), Doppelkammer (DK) und Kokultur mit Lymphknotenzellen in der Einfachkammer (mit LK).

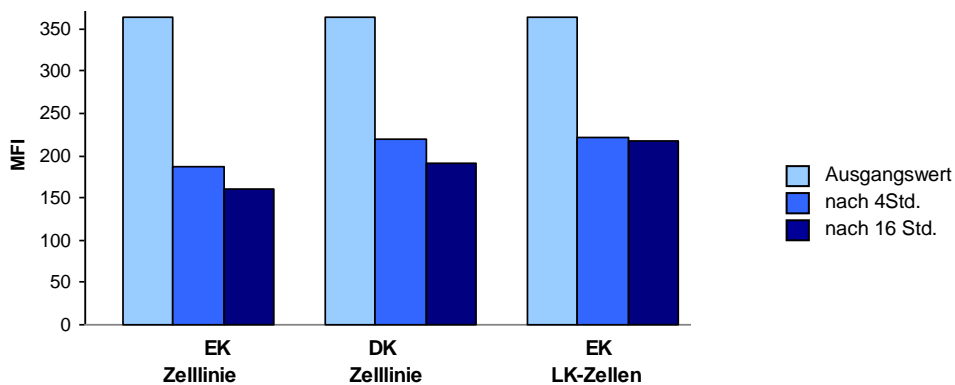


Abb. 3.17: IL-12-Expression der CD11c^{niedrig}-Zellen nach Kokultur mit Tumorzellen
 Zeitverlauf der IL-12-Expression nach Kokultur mit 291-Zellen, einer Tumorzelllinie, in Einfachkammer (EK), Doppelkammer (DK) und Kokultur mit Lymphknotenzellen in der Einfachkammer (mit LK).

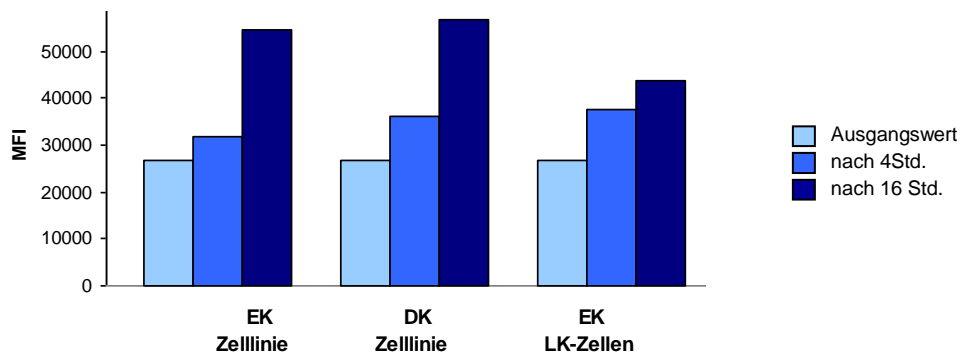


Abb. 3.18: TGF- β -Expression der CD11c^{niedrig}-Zellen nach Kokultur mit Tumorzellen
 Zeitverlauf der TGF- β -Expression nach Kokultur mit 291-Zellen, einer Tumorzelllinie, in Einfachkammer (EK), Doppelkammer (DK) und Kokultur mit Lymphknotenzellen in der Einfachkammer (mit LK).

3.4 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN AUS C-MYC-MÄUSEN

Die Funktion der dendritischen Zellen ist es, Antigene in der Peripherie aufzunehmen und dann in den Lymphknoten zu migrieren, um dort eine antigenspezifische T-Zell-Antwort zu induzieren. Um die Funktion der dendritischen Zellen aus c-myc-Mäusen zu testen, wurden in drei verschiedenen Testsystemen folgende Fähigkeiten überprüft: Allostimulation, peptidspezifische Stimulation und Migration.

3.4.1 T-ZELL-STIMULATION DURCH DENDRITISCHE ZELLEN

T-Zell-Aktivierung kann durch Erkennung fremder HLA-Moleküle (Allostimulation) oder peptidspezifisch erreicht werden. Um die allostimulatorischen Fähigkeiten der dendritischen Zellen aus c-myc-Mäusen (C57BL/6-Hintergrund) zu untersuchen, wurden diese mit T-Zellen aus BALB/c-Mäusen kokultiviert. Die dendritischen Zellen aktivieren die T-Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen HLA-Moleküle. Bei der peptidspezifischen Stimulation werden die

dendritischen Zellen mit Peptid beladen und aktivieren dann die T-Zellen, die den passenden T-Zell-Rezeptor für dieses Peptid tragen. Der Erfolg der Stimulierung der T-Zellen wurde durch die Quantifizierung der IFN- γ -Produktion mithilfe des ELISA evaluiert.

3.4.1.1 ALLOSTIMULATION

T-Zellen aus der Milz von BALB/c-Mäusen wurden mit dendritischen Zellen, die mit magnetischer Selektion aus der Milz isoliert wurden, stimuliert. Dendritische Zellen aus c-myc-Mäusen führten zu einer deutlich geringeren IFN- γ -Produktion der T-Zellen als jene aus Wildtyp-Mäusen (s. Abb. 3.19). Die relative, auf WT-Mäuse normierte, IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit DCs aus c-myc-Mäusen ist signifikant niedriger (nach dreitägiger Stimulation $P=0,00002$, nach fünftägiger Stimulation $P=0,000002$).

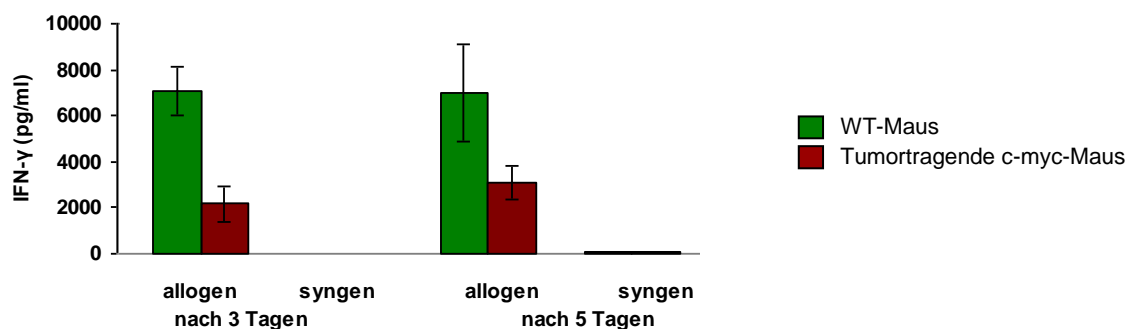


Abb. 3.19: IFN- γ -Produktion in T-Zellen nach Stimulation mit Milz-DCs verschiedener Mäuse
Effektorzellen der T-Zellstimulation waren T-Zellen aus der Milz von BALB/c-Mäusen (allogene Stimulation) bzw. aus der Milz von C57BL/6-Mäusen (syngene Stimulation). Stimuliert wurde mit DCs, die aus der Milz von tumortragenden c-myc-Mäusen bzw. aus WT-Mäusen mittels magnetischer Selektion gewonnen wurden.

Untersuchungen zur Allostimulation erfolgten ebenfalls mit dendritischen Zellen, die aus dem Knochenmark kultiviert wurden. Diese wurden entweder direkt oder nach LPS-Stimulation eingesetzt. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen weisen die unreifen dendritischen Zellen aus c-myc-Mäusen eine geringfügig verminderte Stimulationsfähigkeit auf (s. Abb. 3.20). Nach induzierter Reifung erreichen die dendritischen Zellen der c-myc-Mäuse jedoch das Potenzial derjenigen aus Wildtyp-Mäusen (vgl. Abb. 3.21).

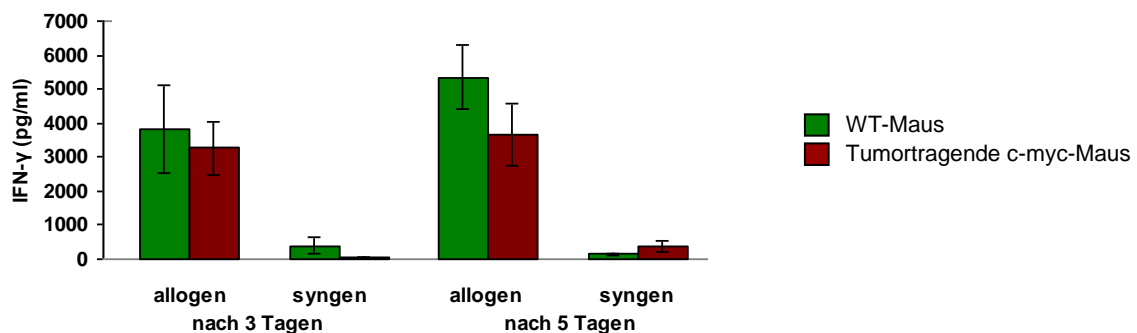


Abb. 3.20: IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit unreifen dendritischen Zellen
T-Zellen aus BALB/c-Mäusen bzw. aus WT-Mäusen wurden mit aus dem Knochenmark kultivierten dendritischen Zellen stimuliert.

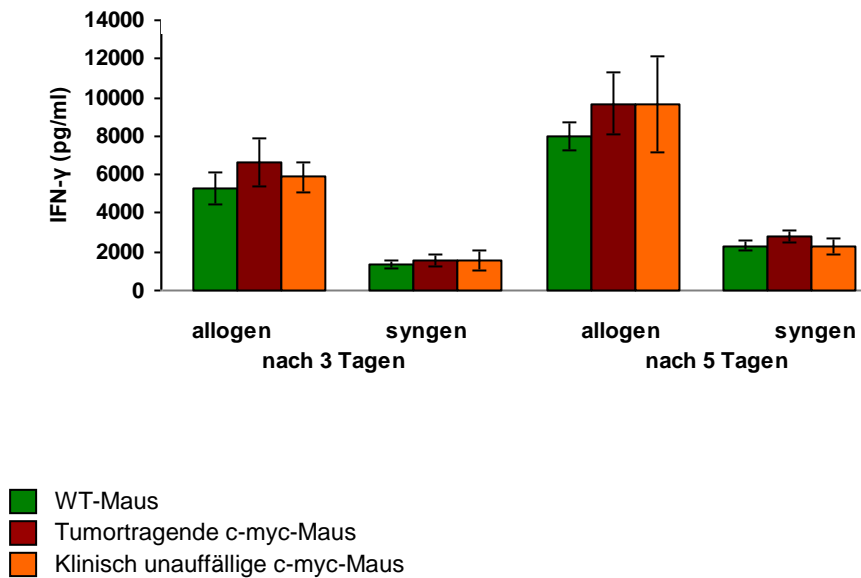


Abb. 3.21: IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Stimulation mit reifen dendritischen Zellen

T-Zellen aus BALB/c-Mäusen bzw. aus WT-Mäusen wurden mit aus dem Knochenmark kultivierten und mit LPS gereiften dendritischen Zellen stimuliert.

Um einen Einfluss löslicher Faktoren bei der Stimulation von T-Zellen auszuschließen, wurden Allostimulationen auch im Einfach- bzw. Doppelkammer-System durchgeführt. Die IFN- γ -Produktion ist nach Stimulation im Doppelkammer-System, verglichen mit der Stimulation in der Einfachkammer, sehr viel geringer (s. Abb. 3.22).

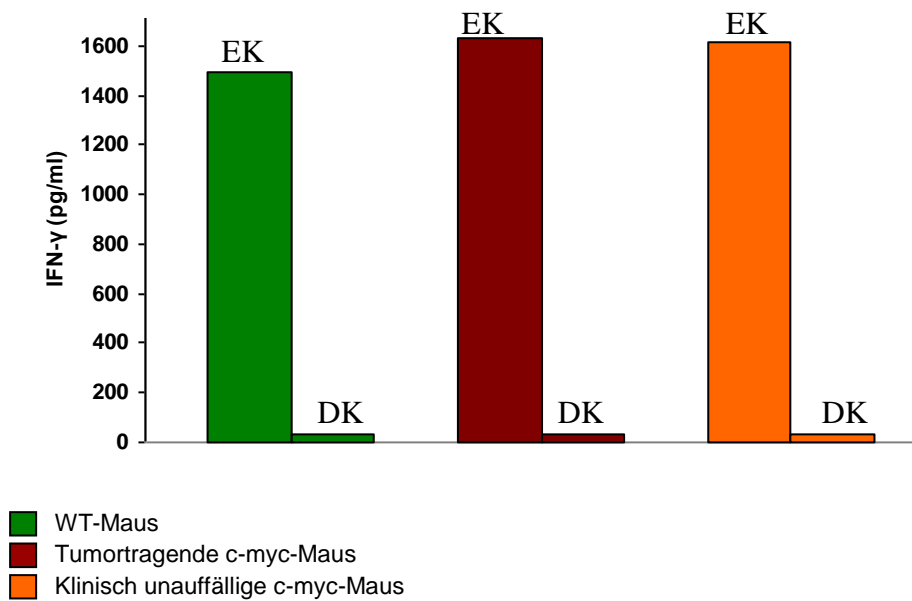


Abb. 3.22: IFN- γ -Produktion bei Allostimulation mit unreifen DCs im Einfach- und Doppelkammersystem

T-Zellen aus BALB/c-Mäusen wurden mit DCs im Einfachkammer- (EK) und im Doppelkammersystem (DK) stimuliert. Die DCs wurden aus dem Knochenmark von tumortragenden bzw. klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen sowie von WT-Mäusen kultiviert.

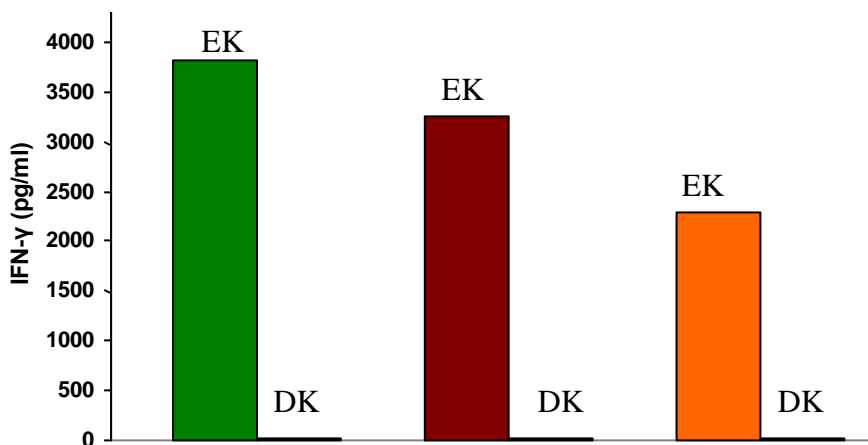


Abb. 3.23: IFN- γ -Produktion bei Allostimulation mit reifen DCs im Einfach- und Doppelkammersystem

Erklärung der Balken s. Abb. 3.22. T-Zellen aus BALB/c-Mäusen wurden mit DCs im Einfachkammer- (EK) und im Doppelkammersystem (DK) stimuliert. Die DCs wurden aus dem Knochenmark von tumortragenden und klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen sowie von WT-Mäusen kultiviert und mit LPS gereift.

3.4.1.2 PEPTIDSPEZIFISCHE STIMULATION VON T-ZELLEN

Zur Analyse der antigenspezifischen Stimulation von T-Zellen wurden peptidspezifische T-Zell-Stimulationen durchgeführt. Die Modellsysteme der transgenen OT-1- und OT-2-Mäuse ermöglichen die Untersuchung der MHC-I-restringierten Kreuzpräsentation, sowie der MHC-II-restringierten Präsentation.

3.4.1.2.1 *Stimulation von T-Zellen aus OT-1-Mäusen*

Mithilfe des MHC-I-restringierten Peptids SIINFEKL und T-Zellen aus OT-1-Mäusen kann man die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur Kreuzpräsentation untersuchen. CD8⁺ T-Zellen aus OT-1-Mäusen wurden mit gereiften, mit SIINFEKL beladenen dendritischen Zellen für 3 Tage stimuliert. Die Beladung wurde mit Peptidkonzentrationen von 1 ng/ml und 1 pg/ml sowie mit unterschiedlichen T-Zell/DC-Verhältnissen durchgeführt. Die IFN- γ -Produktion bei Stimulation mit dendritischen Zellen aus c-myc-Mäusen ist vermindert bei einer Peptidbeladung von 1pg/ml und einem Verhältnis der T-Zellen zu den dendritischen Zellen von 1 : 4 (s. Abb. 3.24). Bei der Stimulation mit DCs aus klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen ergab die Subtraktion des Hintergrundes einen Wert, der nicht sichtbar ist im Diagramm, d. h. die peptidspezifische Stimulation erreichte keine höhere IFN- γ -Produktion als die Stimulation mit unbeladenen DCs.



Abb. 3.24: IFN- γ -Produktion bei Stimulation von T-Zellen aus OT-1-Mäusen mit peptidbeladenen dendritischen Zellen (1pg/ml) bei einem Verhältnis von 1:4

Die T-Zellen wurden mittels magnetischer Selektion aus der Milz der OT-1-Mäuse gewonnen. Die DCs wurden aus dem Knochenmark von tumortragenden und klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen sowie von WT-Mäusen kultiviert und mit LPS gereift. Die T-Zellen wurden auch mit unbeladenen DCs stimuliert. Die IFN- γ -Werte der Stimulation mit unbeladenen DCs wurden von jenen mit den beladenen DCs abgezogen. Die Standardabweichungen für die Fehlerbalken wurden addiert.

3.4.1.2.2 Stimulation von T-Zellen aus OT-2-Mäusen

Mit T-Zellen aus OT-2-Mäusen und dem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ kann man die MHC-II-restringierte Präsentation testen. CD4⁺ T-Zellen aus OT-2-Mäusen wurden mit gereiften, mit OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladenen dendritischen Zellen stimuliert. Beladen wurde mit Peptidkonzentrationen von 1 μ g/ml bzw. 0,1 μ g/ml. Es wurde mit verschiedenen Zell-Verhältnissen stimuliert. Bei dem Verhältnis T-Zellen : dendritische Zellen = 1 : 2 ist bei beiden Peptidkonzentrationen eine verminderte T-Zell-Aktivierung erkennbar (vgl. Abb. 3.25).

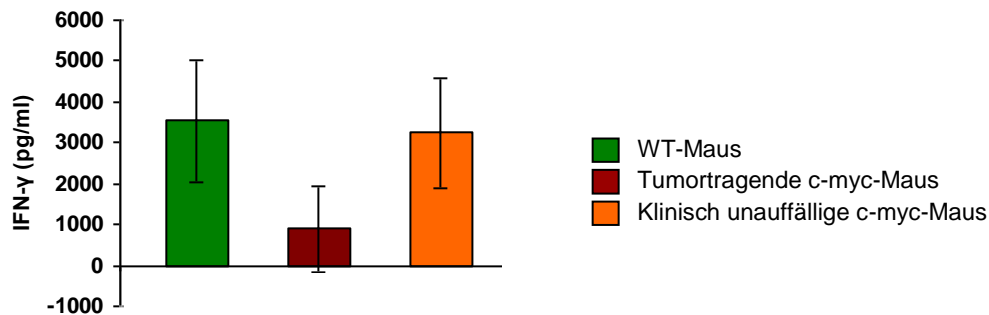


Abb. 3.25: IFN- γ -Produktion bei Stimulation von T-Zellen aus OT-2-Mäusen mit peptidbeladenen dendritischen Zellen (1 μ g/ml)

Die T-Zellen wurden mittels magnetischer Selektion aus der Milz der OT-2-Mäuse gewonnen. Die DCs wurden aus dem Knochenmark von tumortragenden und klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen sowie von WT-Mäusen kultiviert und mit LPS gereift. Die T-Zellen wurden auch mit unbeladenen T-Zellen stimuliert. Die IFN- γ -Werte der Stimulation mit unbeladenen DCs wurden von jenen mit den beladenen DCs abgezogen. Die Standardabweichungen für die Fehlerbalken wurden addiert.

3.4.2 MIGRATIONSAKTIVITÄT DENDRITISCHER ZELLEN

In Kapitel 3.1.1 ist eine deutliche Erhöhung der Anzahl der dendritischen Zellen in den Lymphknoten der c-myc-Mäuse beschrieben. Die Ursache dafür könnte eine verstärkte Rekrutierung der dendritischen Zellen in das tumoröse Gewebe sein. Um die Bedeutung der Rekrutierung der dendritischen Zellen in den Lymphknoten zu untersuchen, wurden In-vitro-Migrationstests durchgeführt. Dabei wurde die Fähigkeit der DCs untersucht, durch eine Membran hindurch in Richtung auf Tumor- bzw. Wildtyp-Lymphknoten-Suspensionen zu wandern. Die dendritischen Zellen wurden mithilfe magnetischer Separation aus der Milz gewonnen, mit CFSE-markiert und in die eine Hälfte einer Doppelkammer gegeben. In der anderen Hälfte waren Tumorzellen bzw. normale LK-Zellen. Die durch die Membran getretenen DCs wurden mithilfe von Zählpartikeln quantifiziert.

Für WT-DCs konnte eine verstärkte Wanderung in tumoröse Lymphknoten im Vergleich zu normalen Lymphknoten gezeigt werden. Bei dendritischen Zellen aus tumortragenden Tieren hingegen war die Wanderung deutlich eingeschränkt. Eine verstärkte Wanderung in tumoröse Lymphknoten im Vergleich zu normalen Lymphknoten war hier nicht erkennbar.

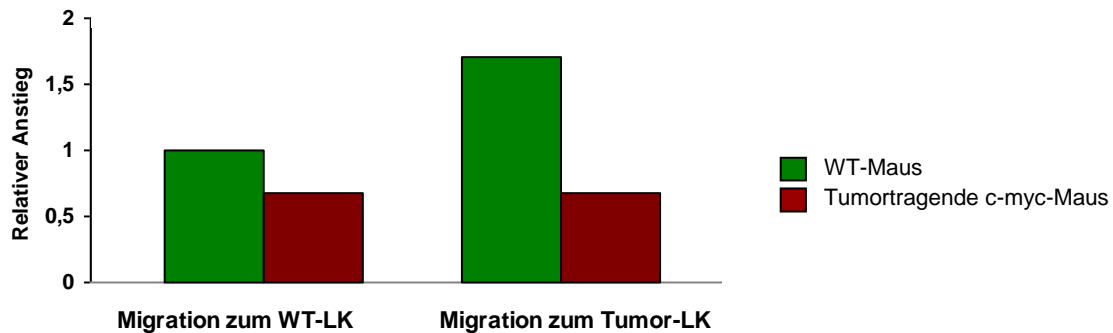


Abb. 3.26: Migrationsverhalten dendritischer Zellen aus verschiedenen Mäusen zu Wildtyp- bzw. Tumor-LK

Migration von DCs zum WT-Lymphknoten im Vergleich zur Migration zum Tumor-Lymphknoten. Die Migration erfolgte in Doppelkammern. Gewanderte CFSE-markierte dendritische Zellen wurden im FACS analysiert und mithilfe von Zählkörpern quantifiziert. Normiert wurde auf die Migration von DCs aus WT-Mäusen zum WT-Lymphknoten.

3.4.3 IMMUNANTWORT DER C-MYC-MÄUSE

Um die Konsequenzen der eingeschränkten DC-Funktion für die Immunantwort der c-myc-Mäuse zu untersuchen, wurde eine Immunisierung durchgeführt. Jeweils fünf c-myc- und fünf WT-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen mit HA-OVA immunisiert. Die Applikation von HA-OVA erfolgte sowohl subkutan als auch intraperitoneal an Tag 0, 10 und 20. Als Adjuvans wurde CpG verwendet. Am Tag 0 wurde zusätzlich IFA gegeben. Den Mäusen wurden an Tag 0, 10, 20, 30, 40 und 60 Blut entnommen.

Am Tag 61 wurden die T-Zellen aus den Milzen der immunisierten Tiere mithilfe der Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Zytokinexpression analysiert. Die T-Zellen aus den Milzen der immunisierten c-myc-Mäuse zeigen, verglichen mit WT-Mäusen eine deutlich vermehrte IL-4-Sekretion (s. Abb. 3.27).

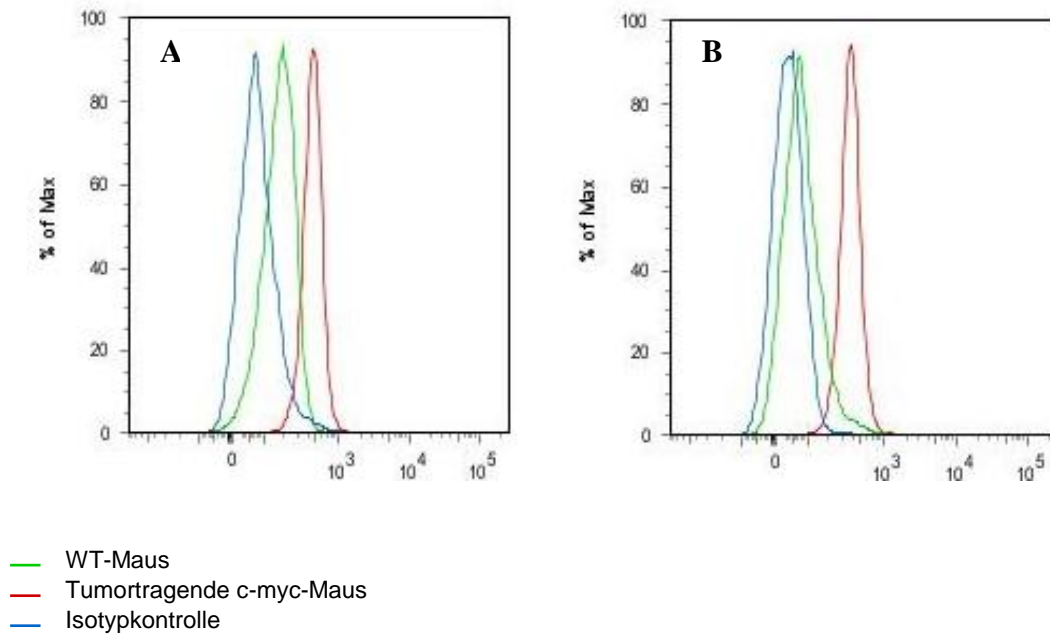


Abb. 3.27: FACS-Analyse der IL-4-Expression der CD4⁺ (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) aus den Milzen der immunisierten Mäuse

Im Serum wurden die Titer verschiedener Immunglobulinsubklassen bestimmt, um die Gewichtung der Th1- bzw. Th2-Antwort zu evaluieren. In den c-myc-Mäusen kam es zu einer geringeren Produktion aller untersuchten Immunglobulinsubklassen. Die Th1-assoziierten Immunglobulinsubklassen waren jedoch verhältnismäßig stärker vermindert. In Abb. 3.28-39 sind exemplarisch die logarithmischen Verdünnungsreihen des Th1-assoziierten IgG3 und des Th2-assoziierten IgG1 aus dem Blut von WT- sowie c-myc-Mäusen gezeigt.

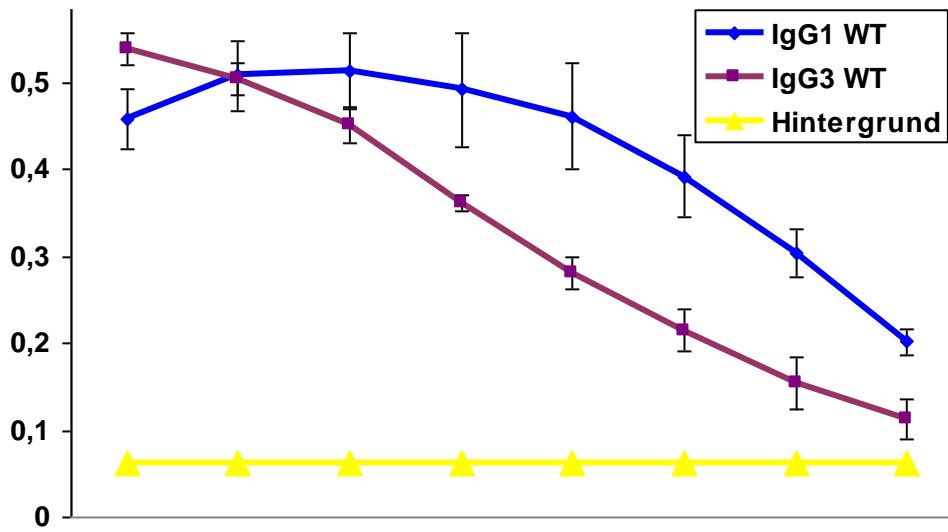


Abb. 3.28: Logarithmische Verdünnungsreihe der Immunglobulinsubklassen IgG1 und IgG3 in den Seren der immunisierten WT-Mäuse

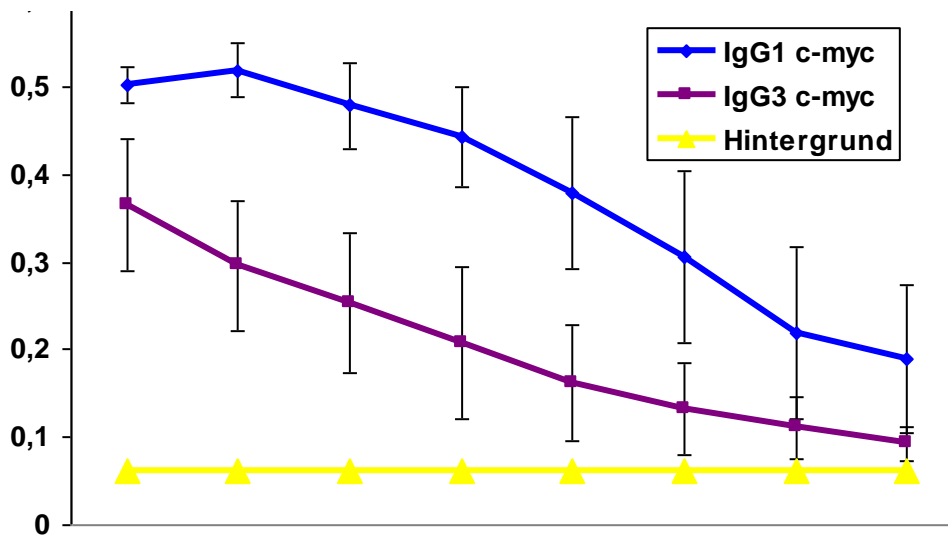


Abb. 3.39: Logarithmische Verdünnungsreihe der Immunglobulinsubklassen IgG1 und IgG3 in den Seren der immunisierten c-myc-Mäuse

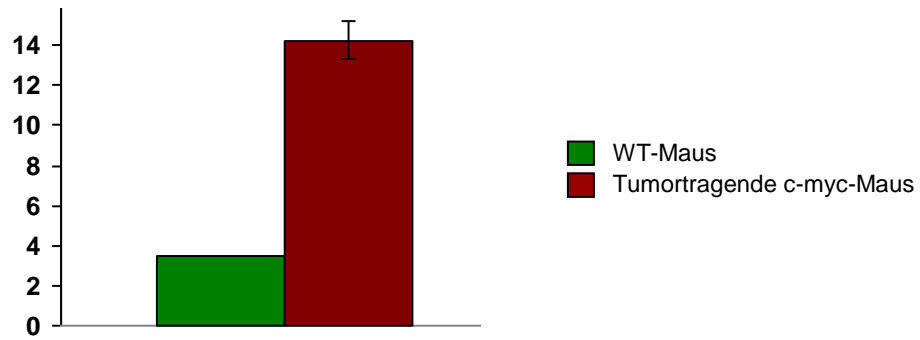


Abb. 3.30: Verhältnis von Th2- zu Th1-assoziierten Immunglobulinsubklassen nach spezifischer Immunisierung von WT- bzw. c-myc-Mäusen

5 DISKUSSION

5.1 DIE BIOLOGISCHE RELEVANZ VON DENDRITISCHEN ZELLEN IN DER ONKOLOGIE

Dendritische Zellen sind entscheidend bei der Induktion und der Aufrechterhaltung einer Tumorabwehr des Immunsystems. Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass Tumorzellen Antigene exprimieren, die vom Immunsystem erkannt werden können. DCs können diese Antigene aufnehmen, prozessieren und gegenüber T-Zellen präsentieren. Die Immunüberwachungshypothese beschreibt die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren [34]. Die ursprüngliche Formulierung der Immunüberwachungshypothese von Burnet und Thomas bezog sich dabei vor allem auf T-Lymphozyten. Eine Rolle der dendritischen Zellen dabei wurde erst später belegt, als man beobachtete, dass Mäuse, die defizient für bestimmte DC-assoziierte Genprodukte, wie IL-12p35, IL-12p40, CD80 oder CD86, sind, vermehrt chemisch oder durch Strahlen induzierte Tumoren entwickeln [50, 53-54]. Diese Beobachtung belegt, dass dendritische Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren tragen.

Trotz der Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen zu bekämpfen, werden die meisten Tumoren in der klinischen Situation nicht vom Immunsystem eliminiert, sondern wachsen und metastasieren, da die Tumorzellen verschiedene Mechanismen entwickeln, mit deren Hilfe sie einer T-Zell-Antwort entkommen.

Bereits wenige dendritische Zellen können unzählige B- und T-Lymphozyten aktivieren und somit eine potente Immunreaktion initiieren.

DCs können aber auch Toleranz induzieren, unter anderem durch die Vermittlung der Deletion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus, die Anergisierung reifer T-Zellen oder durch die Generierung immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen [55]. Eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Tumor geht mit einer schlechteren Prognose einher [56].

Auch Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen und NKT-Zellen, können von dendritischen Zellen beeinflusst werden [32-35].

Die unterschiedlichen Effekte dendritischer Zellen auf das Immunsystem werden einerseits durch das Vorhandensein verschiedener DC-Subpopulationen und andererseits durch ihre verschiedenen Reifungsgrade bewirkt. Auch die Anzahl der dendritischen Zellen in den

Organen des Immunsystems hat möglicherweise einen Einfluss auf die Art der induzierten Immunantwort. Bereits in den 90er Jahren wurde bei tumortragenden Mäusen eine verminderte Zellzahl der dendritischen Zellen in den Lymphknoten, der Milz und der Haut im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet [48-49]. Die klinische Relevanz belegten spätere Studien, in denen eine signifikant verringerte Anzahl dendritischer Zellen im Blut von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs beobachtet wurde [36-37]. Auch im Blut von Brustkrebspatienten konnte eine reduzierte Anzahl von DCs gefunden werden [38]. Nach chirurgischer Entfernung des Tumorgewebes konnte ein Anstieg der DCs im Blut verzeichnet werden [57]. Im Tumorgewebe selber ist jedoch häufig eine vermehrte Anzahl dendritischer Zellen vorzufinden. Eine beträchtliche DC-Infiltration von soliden Tumoren ist sowohl in Krebspatienten als auch in Tumormausmodellen gefunden worden [20, 58]. Die hier untersuchten transgenen c-myc-Mäuse, die autochthon B-Zell-Lymphome entwickeln, sind ein Sonderfall, da es sich um einen malignen Befall des lymphatischen Gewebes handelt. In diesem Modell ist also keine räumliche Trennung des Orts des Tumors von dem lymphatischen Gewebe vorhanden. In c-myc-Mäusen ist die Anzahl dendritischer Zellen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, wie in Abb. 3.1 ersichtlich, in Milz, Lymphknoten und Blut sowohl prozentual als auch absolut erhöht. Das bedeutet, dass nicht alle Tumormodelle notwendigerweise mit einer verminderten Zahl der DCs im Blut und in den lymphatischen Organen einhergehen. Weiterhin zeigt dies, dass eine Infiltration des Tumors mit dendritischen Zellen, zumindest im Tiermodell, das Wachstum des Tumors nicht verhindert. Eine größere Anzahl dendritischer Zellen bedeutet nicht automatisch eine bessere Tumorbekämpfung, da dendritische Zellen auch Toleranzinduktion und Generierung von regulatorischen T-Zellen bewirken können.

5.2 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG UND SUBPOPULATIONEN

DENDRITISCHER ZELLEN IN C-MYC-MÄUSEN

Die Aktivität der dendritischen Zellen ist durch ihren Maturierungsgrad bestimmt. Während reife dendritische Zellen eine Aktivierung von T-Zellen induzieren, führen unreife zur Toleranzinduktion. In den letzten Jahren sind auch Subpopulationen beschrieben worden, die sich hinsichtlich der Expression von CD11c unterscheiden. Auch in dieser Arbeit wurden

diesbezüglich in c-myc-Mäusen zwei Subpopulationen unterschieden: CD11c^{hoch}- und CD11c^{niedrig}-Zellen (s. Abb. 3.2).

Auch Perrot et al. beschreiben CD11c^{hoch}-Zellen und CD11c^{niedrig}-Zellen im humanen Nicht-Kleinzelligen Bronchial-Karzinom (NSCLC) [15]. Im NSCLC stellen die CD11c^{hoch}-Zellen 30 % und die CD11c^{niedrig}-Zellen 20 % der dendritischen Zellen dar. Die CD11c^{niedrig}-plasmazytoiden DCs, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden, stellen die restlichen 50 % dar. Die CD11c^{hoch}-Zellen nehmen also laut Perrot et al. einen größeren Anteil der dendritischen Zellen ein als die CD11c^{niedrig}-Zellen. Im Gegensatz dazu sind CD11c^{hoch}-Zellen die eindeutige Minderheit der dendritischen Zellen in den untersuchten c-myc- und Wildtyp-Mäusen (s. Abb. 3.3). In tumortragenden c-myc-Mäusen nimmt ihr relativer Anteil weiter ab. Die CD11c^{hoch}-Zellen kommen laut Perrot et al. auch im peripheren Blut vor, die CD11c^{niedrig}-Zellen jedoch nicht. In c-myc-Mäusen sind dagegen CD11c^{hoch}-Zellen und CD11c^{niedrig}-Zellen in Lymphknoten, der Milz sowie im Blut vorhanden.

Liu et al. beschreiben ebenfalls eine Subpopulation der dendritischen Zellen mit niedriger CD11c-Expression im Lungenkrebsgewebe eines transplantierbaren Tumormodells. Sie berichten ein vermehrtes Vorkommen dieser Subpopulation im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe [19]. Dies ist also im Einklang mit der in Abb. 3.3 gezeigten vermehrten Anzahl der CD11c^{niedrig}-Zellen in den Lymphknoten der c-myc-Mäuse. Die Verteilung der verschiedenen Subtypen ist also in verschiedenen Modellen bzw. in der klinischen Situation unterschiedlich. Von welchen Faktoren diese unterschiedliche Verteilung abhängt, ist noch nicht klar.

Schon früh wurde in Studien, die die DCs in Krebspatienten untersuchten, von ihrer eingeschränkten Fähigkeit, eine für eine T-Zell-Stimulierung ausreichende Menge an MHC-II und kostimulatorischen Molekülen zu exprimieren, berichtet [59-61].

In Krebspatienten wurde gezeigt, dass vor allem schnell wachsende Tumoren nur in geringem Maße von dendritischen Zellen infiltriert werden. Diese seien zudem unreif und exprimieren nur geringe Mengen der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Diesbezüglich einheitliche Ergebnisse konnten in Patienten mit Nierenzellkarzinom [62], Prostatakarzinom [63], metastasierendem Melanom [64] und Kolonkarzinom [65] erzielt werden. Die von Perrot et al. beschriebenen CD11c^{niedrig}-Zellen im humanen Nicht-Kleinzelligen Bronchial-Karzinom weisen ebenso eine fehlende Expression von CD80, CD86 und CD83 auf [15]. Auch im Blut von Patienten mit Brust-, Lungen- und Speiseröhrenkrebs wurde eine erhöhte Anzahl unreifer DCs gefunden [22, 36]. Diese Daten waren im Einklang mit Daten aus

verschiedenen Maus-Tumormodellen [49, 60, 66-67]. Eine fehlerhafte Differenzierung der DCs wird als Ursache dafür vermutet. DCs, die nicht in ausreichender Menge kostimulatorische Moleküle exprimieren, führen zur Anergisierung der T-Zellen. Diese unreifen dendritischen Zellen können daher keine Tumorabwehr erzeugen, sondern induzieren T-Zell-Toleranz.

Die dendritischen Zellen der tumortragenden c-myc-Mäuse (CD11c^{hoch}- und CD11c^{niedrig}-Zellen) weisen jedoch einen aktivierten Phänotyp mit erhöhter Expression von CD80, CD83 und CD86 auf (s. Abb. 3.5 – 3.7). Sie wurden vermutlich durch Kontakt mit den Tumorzellen aktiviert. Die Ursache dafür, dass DCs im c-myc-Tumormodell, nicht jedoch in anderen Tumormodellen aktiviert werden, liegt möglicherweise an der Tatsache, dass es sich hierbei um ein B-Zell-Lymphom handelt, also um einen Tumor, der vom Immunsystem ausgeht. In diesem Modell ist die fehlende bzw. erfolglose Tumorabwehr also nicht durch eine ausbleibende Reifung der dendritischen Zellen begründet.

CD83 ist ein spezifischer Marker für reife dendritische Zellen [68]. Iwamoto et al. zeigten, dass peritumorale reife CD83⁺ DCs, die mit T-Zellen Aggregate bilden, mit einer positiven Prognose assoziiert sind [69]. So ergibt sich die Frage, warum die aktivierten DCs in tumortragenden c-myc-Mäusen nicht in der Lage sind, eine effektive Tumorabwehr zu induzieren.

Ein wichtiger Faktor für die Funktion der DCs ist die Expression von MHC-II. In mehreren Publikationen wird die verminderte Stimulationsfähigkeit von DCs aus Krebspatienten oder tumortragenden Mäusen durch eine unzureichende MHC-II-Expression erklärt [39-41]. In c-myc-Mäusen ist die MHC-II-Expression nur auf einem kleinen Teil der DCs (den CD11c^{hoch}-Zellen) herabreguliert (s. Abb. 3.4). Die Mehrheit der DCs (die CD11c^{niedrig}-Zellen) zeigt eine vermehrte Expression an MHC-II. In diesem Modell kann eine mangelhafte Expression von MHC-II folglich nur eine untergeordnete Rolle spielen.

In den letzten Jahren berichteten viele Arbeitsgruppen von der Existenz regulatorischer dendritischer Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften [18-20, 70-71]. Diese regulatorischen DCs zeichnen sich unter anderem durch die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 aus [71] und besitzen die Fähigkeit, regulatorische T-Zellen zu induzieren [18]. Bis vor kurzem wurden regulatorische DCs lediglich in vitro erzeugt und untersucht. Kürzlich wurden dendritische Zellen mit regulatorischen Eigenschaften auch in vivo beschrieben [19-20].

Was den Phänotyp dieser regulatorischen DCs betrifft, gibt es widersprüchliche Ergebnisse. In verschiedenen Modellen sind unterschiedliche Phänotypen beschrieben worden. Norian et al. berichteten von regulatorischen dendritischen Zellen als Subpopulation der tumorinfiltrierenden DCs in einem transgenen Mausmodell für Mammakarzinom [20]. Diese DC-Subpopulation, die eine Anergisierung von CD8⁺ T-Zellen bewirkte, wurde von Norian et al. als CD11c^{hoch} MHC-II⁺ und CD11b⁺ charakterisiert. Auch Liu et al. berichten von regulatorischen DCs, die aus Lungenkrebsgewebe eines transplantierbaren Tumormodells gewonnen werden konnten [19]. Die von ihnen beschriebenen regulatorischen DCs inhibierten die T-Zell Proliferation und induzierten regulatorische T-Zellen. Im Gegensatz zu Norian et al. definieren Liu et al. diese regulatorischen DCs als DCs mit niedriger Expression von CD11c und MHC-II und hoher Expression von CD11b (CD11c^{low}CD11b^{high}Ia^{low} DCs). Was die Expression von CD11c bzw. MHC-II angeht, gehen die Ergebnisse von Norian et al. und Liu et al. in unterschiedliche Richtungen. Der Grund für die Divergenz dieser Ergebnisse ist bisher nicht klar. Die CD11c^{niedrig}-Zellen aus c-myc-Mäusen entsprechen in ihren funktionellen Eigenschaften denen der beschriebenen regulatorischen DCs. Die niedrige Expression von CD11c ist folglich im Einklang mit den Ergebnissen von Liu et al. Die von Fujita et al. beschriebenen in vitro erzeugten regulatorischen DCs zeigen ebenfalls eine verminderte CD11c-Expression [71]. Die MHC-II-Expression der CD11c^{niedrig}-Zellen aus c-myc-Mäusen ist im Einklang mit den Ergebnissen von Norian et al. vermehrt (s. Abb. 3.4 B).

Den von Norian et al. und Liu et al. beschriebenen Phänotypen ist eine vermehrte CD11b-Expression gemeinsam. Die Mehrheit der DCs aus c-myc-Mäusen zeigt ebenso eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vermehrte Expression von CD11b (s. Abb. 3.8). Dies unterstützt die Vermutung, dass die CD11c^{niedrig}-Zellen aus c-myc-Mäusen regulatorische Eigenschaften aufweisen und eine Tumorabwehr inhibieren.

Für die Steuerung der Immunantwort ist die Zytokinexpression der DCs von entscheidender Bedeutung. Während IL-12-Expression dendritischer Zellen zu einer Polarisierung der T-Zellen in Richtung Th1 führt [14, 72], induzieren dendritische Zellen, die IL-10 exprimieren, die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2 [16, 30]. Durch Expression von IL-10 und TGF-β werden regulatorische T-Zellen induziert [73].

In einem Spontantumormodell für malignes Melanom in der Maus wurden dendritische Zellen beschrieben, die sich durch eine verminderte Produktion von IL-12 und eine vermehrte Produktion von IL-10 auszeichneten [31]. Auch in Zervixkarzinom-Patienten wurde ein

niedriges IL-12/IL-10-Verhältnis gefunden [74]. Dies ist im Einklang mit der verminderten IL-12-Expression (s. Abb. 3.13) und der vermehrten IL-10-Expression (s. Abb. 3.12), die in der Mehrzahl der dendritischen Zellen aus tumortragenden c-myc-Mäusen beobachtet wurde. Sharma et al. berichteten, dass dendritische Zellen aus transgenen Mäusen, die IL-10 überexprimieren, die allogene T-Zell-Antwort supprimieren [75]. Die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 beinhalten die Hemmung der Produktion von Th1-Zytokinen, der Funktion von antigenpräsentierenden Zellen und NK-Zellen sowie der Proliferation von T-Zellen [76]. Das von den CD11c^{niedrig}-Zellen sezernierte IL-10 könnte also unter anderem für die verminderte allostimulatorische Fähigkeit der dendritischen Zellen in c-myc-Mäusen verantwortlich sein. Auch die von Liu et al. beschriebenen regulatorischen Zellen zeigten eine vermehrte Expression von IL-10 und eine verminderte Expression von IL-12 [19].

Tumordinfiltrierende DCs können TGF- β exprimieren, welches regulatorische T-Zellen induziert. Auf diesem Weg wird eine Tumorabwehr gehemmt [77-80]. Wie in Abb. 3.14 gezeigt, exprimieren die DCs in c-myc-Mäusen vermehrt TGF- β . Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei diesen Zellen um regulatorische DCs handelt, die durch ein immunsuppressives Zytokinprofil eine Immunsuppression induzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch klinisch unauffällige c-myc-Mäuse untersucht, um die Dynamik der Immunantwort in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung zu untersuchen. In klinisch unauffälligen c-myc-Mäusen findet man sehr große phänotypische Schwankungen der dendritischen Zellen. Dies dürfte an den unterschiedlichen Stadien der Tumorentwicklung liegen, in denen sich die untersuchten Mäuse befinden. Die Anzahl der schon vorhandenen Tumorzellen ist klinisch nicht determinierbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich konventionelle CD11⁺ dendritische Zellen betrachtet. Die plasmazytoiden dendritischen Zellen, denen eine wichtige Funktion in der antiviralen Immunabwehr zugeschrieben wird [81], wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

5.2.1 INDUKTION DES IMMUNSUPPRESSIVEN ZYTOKINPROFILS DURCH TUMORZELLEN

Es ist vielfach gezeigt worden, dass Tumorzellen lösliche Faktoren, wie TGF- β , VEGF (Vascular endothelial growth factor), IL-6 oder IL-10, sezernieren können, die die Reifung von dendritischen Zellen hemmen und einen tolerogenen Phänotyp induzieren [64, 82-83]. Kokulturen mit Tumorzellen wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die in c-myc-Mäusen beobachteten phänotypischen Veränderungen der dendritischen Zellen durch die Tumorzellen aus c-myc-Mäusen induziert werden können.

Tumorzellen können nicht nur einen tolerogenen Phänotyp, sondern auch eine Hochregulation der Expression immunsuppressiver Zytokine wie TGF- β und IL-10 in DCs induzieren. Auf diese Weise kann eine Induktion regulatorischer T-Zellen bewirkt werden [79, 84-85]. CD8⁺ Zellen werden dadurch in einen anergischen Zustand versetzt [86]. Die von Liu et al. beschriebenen regulatorischen dendritischen Zellen konnten durch Kokultur mit Tumorzellen induziert werden [19]. Ebenso konnten Zhao et al. dendritische Zellen mit immunsuppressivem Zytokinprofil, die den von ihnen analysierten tumorinfiltrierenden Zellen entsprachen, durch Kultur der DCs in Tumorüberständen erzeugen [67]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen anderer Gruppen, führte die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kokultur dendritischer Zellen mit Tumorzellen zu einer vermehrten Expression der dendritischen Zellen von CD11b, TGF- β und IL-10 und zu einer verminderten Expression von IL-12 (s. Abb. 3.15 – 3.18). Dies entspricht dem Phänotyp und dem Zytokinexpressionsmuster der CD11c^{niedrig}-Zellen, des Großteils der DCs in tumortragenden c-myc-Mäusen. Eine Entwicklung der dendritischen Zellen zu regulatorischen DCs mit immunsuppressivem Zytokinprofil kann also durch die Tumorzellen induziert werden. Dies ist vermutlich durch lösliche Faktoren, die von den Tumorzellen sezerniert werden, bedingt, da die beobachteten Veränderungen auch im Doppelkammersystem, ohne die Möglichkeit von Zell-Zell-Kontakt, beobachtet wurden. Da die Kokultur mit Tumor-Lymphknoten-Zellen dieselben Veränderungen wie die Tumorzelllinie induzierte, konnte eine entscheidende Rolle der den Tumor infiltrierende Zellen und Stromazellen in diesem System nicht bestätigt werden.

5.3 AKTIVIERUNG VON T-ZELLEN DURCH DENDRITISCHE ZELLEN

Eine der wesentlichen Funktionen der dendritischen Zellen ist die Aktivierung von T-Zellen. Die Fähigkeit, naive T-Zellen zu prägen, verleiht ihnen eine Schlüsselrolle im Immunsystem. Jedoch wurden die DCs aus Krebspatienten und aus tumortragenden Mäusen vielfach als funktionell defekt beschrieben. Die tumorinfiltrierenden DCs waren entweder unreif [62-64] und bewirkten so eine T-Zell-Anergie oder induzierten durch ein immunsuppressives Zytokinprofil die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen [79]. Dendritische Zellen aus dem Blut von Patienten mit Brust- und Lungenkrebs zeigten eine verminderte Fähigkeit zur allogenen T-Zell-Stimulation [36, 40]. Analog dazu wiesen die DCs aus tumortragenden c-myc-Mäusen ebenfalls eine verminderte Kapazität zur Allostimulation auf (s. Abb. 3.19). Das immunsuppressive Zytokinprofil der CD11c^{niedrig}-Zellen könnte unter anderem dafür verantwortlich sein. Möglicherweise wird die eingeschränkte Stimulationsfähigkeit auch durch regulatorische T-Zellen vermittelt. Diese werden vermutlich durch das IL-10 und TGF- β der DCs induziert. Über verschiedene Mechanismen, wie z. B. die Hemmung der Kostimulation, können regulatorische T-Zellen die Fähigkeit der DCs zur T-Zell-Aktivierung beeinträchtigen [33, 87-89].

Auch aus dem Knochenmark von c-myc-Mäusen kultivierte dendritische Zellen bewirkten, sofern sie nicht durch LPS gereift wurden, eine, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, geringere T-Zell-Aktivierung. Es kommt also bereits im Knochenmark zu einer Beeinträchtigung der Vorläuferzellen, die auch nach In-vitro-Kultur bestehen bleibt. Eine vergleichbare Beeinträchtigung der aus dem Knochenmark kultivierten DCs kann bei Mäusen mit systemischer Inflammation beobachtet werden [90].

Die Aktivierung der T-Zellen ist in diesem System abhängig von Zell-Zell-Kontakt, da es bei Stimulation in einer Doppelkammer zu keiner Aktivierung kommt (s. Abb. 3.22). Zytokine scheinen hier also keine hinreichende Rolle zu spielen.

Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation der DCs wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Modellsystem der OT-1-Mäuse, die einen transgenen Rezeptor für das Peptid SIINFEKL in der Keimbahn tragen, untersucht. Zhao et al. berichteten von tumorinfiltrierenden dendritischen Zellen, deren Fähigkeit zur Kreuzpräsentation beeinträchtigt war. Die mit SIINFEKL beladenen DCs, die aus Tumorgewebe isoliert wurden, induzierten eine geringere Stimulation von T-Zellen aus OT-1-Mäusen, als normale DCs [67]. Auch die dendritischen Zellen aus c-myc-Mäusen, die ebenfalls mit SIINFEKL beladen wurden, erreichten eine geringere Stimulation von T-Zellen aus OT-1-Mäusen (s. Abb. 3.24). Die Fähigkeit der DCs

aus tumortragenden Mäusen zur Kreuzpräsentation ist folglich auch in diesem Modell beeinträchtigt.

Die MHC-II-abhängige Antigenpräsentation kann mithilfe von OT-2-Mäusen, deren transgener T-Zell-Rezeptor das OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid erkennt, untersucht werden. Liu et al. untersuchten die Fähigkeit der von ihnen beschriebenen regulatorischen dendritischen Zellen, OVA₃₂₃₋₃₃₉-spezifische CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid zur Proliferation zu bringen [19]. Die regulatorischen dendritischen Zellen wiesen eine im Vergleich zu normalen DCs verminderte Stimulationsfähigkeit auf. Im Einklang damit zeigten auch DCs aus c-myc-Mäusen, die mit OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen wurden, eine, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, verminderte Fähigkeit zur Stimulation OVA₃₂₃₋₃₃₉-spezifischer CD4⁺ T-Zellen aus OT-2-Mäusen (s. Abb. 3.25).

Die Fähigkeit dendritischer Zellen aus c-myc-Mäusen, T-Zellen zu stimulieren, ist, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, sowohl Antigen-spezifisch über MHC-Klasse I und II als auch allogene beeinträchtigt. Diese verminderte Stimulationsfähigkeit könnte durch das beschriebene immunsuppressive Zytokinprofil der DCs aus c-myc-Mäusen bedingt sein.

Es ist allerdings nicht bekannt, ob man mit der magnetischen Selektion nicht eine Subpopulation der DCs bevorzugt isoliert. Unklar ist weiterhin, welche Bedeutung solche In-vitro-Stimulationsversuche in Bezug auf die Situation in vivo haben.

5.4 MIGRATIONSVERHALTEN DENDRITISCHER ZELLEN

Die Voraussetzung für die effektive Einleitung einer Tumorabwehr des Immunsystems durch dendritische Zellen ist nicht nur die Antigenprozessierung und Stimulation von T-Zellen. Auch die Migration der DCs in die Lymphknoten, den Ort der Prägung naiver T-Zellen, ist von wesentlicher Bedeutung. Für die Migration der DCs in die Lymphknoten ist die ausreichende Expression des Chemokinrezeptors CCR7 erforderlich. Das ist der Ligand für das im Lymphknoten konstitutiv exprimierte CCL19. Während reife DCs in vivo und in vitro viel CCR7 exprimieren und somit eine hohe Migrationsfähigkeit aufweisen, besitzen unreife DCs nur wenig CCR7, exprimieren dafür erhebliche Mengen an Adhäsionsmolekülen und sind somit in ihrer Migrationsaktivität beeinträchtigt [91]. Um die Migrationsaktivität der dendritischen Zellen aus c-myc-Mäusen zu untersuchen, wurden

In-vitro-Migrationsversuche durchgeführt. Dendritische Zellen aus WT-Mäusen zeigen eine verstärkte Migration zum Tumorlymphknoten im Vergleich zur Migration zum normalen Lymphknoten (s. Abb. 3.26). Die beobachtete erhöhte Anzahl dendritischer Zellen im Tumorlymphknoten liegt also wahrscheinlich an einer vermehrten Migration der DCs dorthin. Vermutlich spielt auch eine erhöhte Expression von CCL19 im Tumorlymphknoten eine Rolle. Im Tumorlymphknoten der c-myc-Mäuse konnten tatsächlich erhöhte Mengen an CXCL9 und CXCL10 festgestellt werden [92]. Auf dendritischen Zellen in c-myc-Mäusen wurde eine verminderte Expression von CXCR3, dem Liganden von CXCL9 und CXCL10, sowie von CCR7 beobachtet [93]. Da es nach Interaktion mit ihren Liganden zu einer Internalisierung der Rezeptoren kommt, bestätigt dies die Vermutung, dass diese Chemokinrezeptoren die Migration zum tumorösen Lymphknoten steuern. Dies könnte erklären, warum die Migration der DCs aus c-myc-Mäusen sowohl zum gesunden als auch zum tumorösen Lymphknoten hin beeinträchtigt war (Abb. 3.26). Die dendritischen Zellen wurden aus der tumorösen Milz gewonnen, die wie die Tumorlymphknoten zum lymphatischen Gewebe gehört. Die Chemokinrezeptoren der DCs in der Milz sind also dort schon mit ihren Liganden in Berührung gekommen und wurden internalisiert, so dass in vitro keine weitere Migration induziert werden kann.

5.5 IMMUNANTWORT DER C-MYC-MÄUSE

Um die Konsequenzen der eingeschränkten DC-Funktion auf die Immunantwort in c-myc-Mäusen zu untersuchen, wurde eine Immunisierung mit HA-OVA durchgeführt. Insbesondere die T-Helferzell-Polarisierung sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden. Immunisiert wurden jeweils 5 WT- und 5 c-myc-Mäuse über einen Zeitraum von 60 Tagen. Die CD4⁺ sowie die CD8⁺ T-Zellen der immunisierten c-myc-Mäuse zeigten eine im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich erhöhte IL-4-Expression (s. Abb. 3.27). Dies deutet auf ein Überwiegen der Th2-Immunantwort in c-myc-Mäusen hin. In Serien nicht-immunisierter c-myc-Mäuse konnten ebenfalls deutlich größere Mengen an Th2-Zytokinen detektiert werden als in WT-Mäusen [44].

Aus der Gruppe der Th2-Zytokine besitzt das IL-4 eine essentielle Rolle [94]. Es supprimiert die zelluläre Immunantwort und hemmt die Synthese und Effekte von IFN- γ [95]. Wie bereits erwähnt wurde, ist jedoch in Bezug auf eine effektive Tumorabwehr eine Th1-Antwort

erforderlich. Th1-Zellen aktivieren Zytotoxische T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen, die Tumorzellen zerstören und eine Tumorabwehr gewährleisten können [74]. Auch durch Untersuchung der Immunglobulinsubklassen in den Seren der immunisierten Mäuse konnte ein Überwiegen der Th2-Antwort bestätigt werden. Es zeigte sich eine stärkere Suppression der Th1-assoziierten Subklassen bei einem Überwiegen der Immunglobulinsubklassen, die mit einer Th2-Antwort assoziiert sind (s. Abb. 3.28). Die Polarisierung in Richtung Th2-Antwort könnte für das Versagen des Immunsystems während der Tumorprogression bei c-myc-Mäusen verantwortlich sein. In Krebspatienten findet man typischerweise eine erniedrigte Menge an IFN- γ und anderen Th1-Zytokinen, während IL-4 oft unverändert oder erhöht ist [96]. So spielt die Th2-Polarisierung durchaus auch in der Klinik eine Rolle und ist möglicherweise ein wichtiger Mechanismus der Immunevasion von Tumoren.

Die Untersuchung der Immunglobulinsubklassen in den Seren der immunisierten Mäuse zeigt verminderte Titer aller Subklassen in den Seren der c-myc-Mäuse. Dies deutet auf eine generelle Beeinträchtigung der Immunabwehr in Tumormäusen, nicht nur in Bezug auf tumorspezifische Antigene hin.

Khuda et al. beschreiben, dass in c-myc-transgenen Mäusen sowohl die primäre als auch die sekundäre Antikörperantwort beeinträchtigt sind [97]. Das c-myc-Onkogen induziert die Apoptose von Plasmazellen im finalen Reifungsschritt, während die Affinitäts-Reifung und der Klassenwechsel noch ungehindert stattfinden [97].

5.6 AUSBLICK

In den bisher durchgeführten Untersuchungen ist gezeigt worden, dass die B-Zell-Transformation aufgrund einer Überexpression des c-myc-Onkogens das physiologische immunologische Netzwerk tiefgreifend beeinflusst. Bisher sind in diesem Modell die dendritischen Zellen und die natürlichen Killerzellen näher untersucht worden. Beide Zellpopulationen zeigen phänotypische Aktivierungszeichen bei gleichzeitig vorhandenen funktionellen Defiziten. Als nächster Schritt ist die Untersuchung der adaptiven Immunität von entscheidender Bedeutung. Weiterhin wäre es interessant, weitere Zellen des angeborenen Immunsystems oder Stromazellen und ihren Einfluss im Tumormikromilieu zu untersuchen. Die bisherigen Ergebnisse ebnen den Weg, die Mechanismen der

Immunsuppression, die durch die Überexpression des c-myc-Onkogens hervorgerufen werden, weiter zu untersuchen, mit dem Ziel, therapeutisch verwendbare Zielstrukturen zu finden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Medzhitov, R., *Approaching the asymptote: 20 years later*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 766-75.
2. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
3. Fernandez, N.C., et al., *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo*. Nat Med, 1999. **5**(4): p. 405-11.
4. Biassoni, R., et al., *Human natural killer cell receptors and co-receptors*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 203-14.
5. Lanier, L.L., *Turning on natural killer cells*. J Exp Med, 2000. **191**(8): p. 1259-62.
6. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.
7. Villadangos, J.A., *Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them*. Mol Immunol, 2001. **38**(5): p. 329-46.
8. Norment, A.M., et al., *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. Nature, 1988. **336**(6194): p. 79-81.
9. Guermonprez, P. and S. Amigorena, *Pathways for antigen cross presentation*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(3): p. 257-71.
10. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
11. Steinman, R.M., et al., *Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies*. Hum Immunol, 1999. **60**(7): p. 562-7.
12. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 10-6.
13. Randolph, G.J., G. Sanchez-Schmitz, and V. Angeli, *Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(3): p. 273-87.
14. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
15. Perrot, I., et al., *Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2763-9.
16. Munn, D.H., et al., *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1867-70.
17. Wakkach, A., et al., *Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory I cell differentiation in vivo*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 605-17.
18. Chorny, A., et al., *Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13562-7.
19. Liu, Q., et al., *Tumor-educated CD11bhighIalow regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 6207-16.
20. Norian, L.A., et al., *Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3086-94.
21. Ada, G., *Twenty years into the saga of MHC-restriction*. Immunol Cell Biol, 1994. **72**(6): p. 447-54.

22. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
23. Bottomly, K., *A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes*. *Immunol Today*, 1988. **9**(9): p. 268-74.
24. Fitch, F.W., et al., *Differential regulation of murine T lymphocyte subsets*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 29-48.
25. Wing, K., et al., *Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood*. *Immunology*, 2002. **106**(2): p. 190-9.
26. Vieweg, J., et al., *Reversal of tumor-mediated immunosuppression*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(2 Pt 2): p. 727s-732s.
27. Roncarolo, M.G., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. *Immunol Rev*, 2006. **212**: p. 28-50.
28. Suttmüller, R.P., et al., *Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses*. *J Exp Med*, 2001. **194**(6): p. 823-32.
29. Quezada, S.A., et al., *Limited tumor infiltration by activated T effector cells restricts the therapeutic activity of regulatory T cell depletion against established melanoma*. *J Exp Med*, 2008. **205**(9): p. 2125-38.
30. Scheffold, A., K.M. Murphy, and T. Hofer, *Competition for cytokines: T(reg) cells take all*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1285-7.
31. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. *J Exp Med*, 2001. **194**(5): p. 629-44.
32. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-32.
33. Read, S., V. Malmström, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 295-302.
34. Burnet, F.M., *Immunological aspects of malignant disease*. *Lancet*, 1967. **1**(7501): p. 1171-4.
35. Penn, I. and T.E. Starzl, *Malignant lymphomas in transplantation patients: a review of the world experience*. *Int Z Klin Pharmakol Ther Toxikol*, 1970. **3**(1): p. 49-54.
36. Gatti, R.A. and R.A. Good, *Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review*. *Cancer*, 1971. **28**(1): p. 89-98.
37. Naito, Y., et al., *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(16): p. 3491-4.
38. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
39. Harris, N.L., et al., *The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997*. *Ann Oncol*, 1999. **10**(12): p. 1419-32.
40. Oster, S.K., et al., *The myc oncogene: Marvelously Complex*. *Adv Cancer Res*, 2002. **84**: p. 81-154.
41. Kovalchuk, A.L., et al., *Burkitt lymphoma in the mouse*. *J Exp Med*, 2000. **192**(8): p. 1183-90.
42. Adam, C., et al., *DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction*. *Blood*, 2005. **106**(1): p. 338-44.

43. Mocikat, R., et al., *Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses*. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 561-9.
44. Brenner, C.D., *Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen in einem murinen Spontantumormodell*. 2009, Doktorarbeit, LMU München.
45. Hogquist, K.A., et al., *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. *Cell*, 1994. **76**(1): p. 17-27.
46. Schröder, T., et al., *Generation of functionally mature dendritic cells from the multipotential stem cell line FDCP-mix*. *Br J Haematol*, 2000. **111**(3): p. 890-7.
47. Kronenberger, K., et al., *A polyvalent cellular vaccine induces T-cell responses against specific self-antigens overexpressed in chronic lymphocytic B-cell leukemia*. *J Immunother*, 2008. **31**(8): p. 723-30.
48. Gabrilovich, D.I., et al., *Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors*. *Cell Immunol*, 1996. **170**(1): p. 111-9.
49. Ishida, T., et al., *Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors*. *J Immunol*, 1998. **161**(9): p. 4842-51.
50. Liu, J., Z. Xiang, and X. Ma, *Role of IFN regulatory factor-1 and IL-12 in immunological resistance to pathogenesis of N-methyl-N-nitrosourea-induced T lymphoma*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 1184-93.
51. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(3): p. 199-205.
52. Egeter, O., et al., *Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice*. *Cancer Res*, 2000. **60**(6): p. 1515-20.
53. Loser, K., et al., *An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice*. *J Immunol*, 2005. **174**(9): p. 5298-305.
54. Riemann, H., et al., *IL-12 breaks dinitrothiocyanobenzene (DNTB)-mediated tolerance and converts the tolerogen DNTB into an immunogen*. *J Immunol*, 2005. **175**(9): p. 5866-74.
55. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 685-711.
56. Menetrier-Caux, C., M. Gobert, and C. Caux, *Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome*. *Cancer Res*, 2009. **69**(20): p. 7895-8.
57. Almand, B., et al., *Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(5): p. 1755-66.
58. Treilleux, I., et al., *Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(22): p. 7466-74.
59. Tas, M.P., et al., *Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones*. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. **36**(2): p. 108-14.
60. Gabrilovich, D.I., I.F. Ciernik, and D.P. Carbone, *Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts*. *Cell Immunol*, 1996. **170**(1): p. 101-10.
61. Gabrilovich, D.I., et al., *Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(3): p. 483-90.
62. Troy, A.J., et al., *Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(3): p. 585-93.

63. Troy, A., et al., *Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer*. J Urol, 1998. **160**(1): p. 214-9.
64. Enk, A.H., et al., *Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma*. Int J Cancer, 1997. **73**(3): p. 309-16.
65. Chauv, P., et al., *Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats*. Int J Cancer, 1997. **72**(4): p. 619-24.
66. Ciavarra, R.P., et al., *Prostate tumor microenvironment alters immune cells and prevents long-term survival in an orthotopic mouse model following flt3-ligand/CD40-ligand immunotherapy*. J Immunother, 2004. **27**(1): p. 13-26.
67. Zhao, F., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in ret transgenic mice spontaneously developing melanoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(13): p. 4382-90.
68. Zhou, L.J. and T.F. Tedder, *Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3821-35.
69. Iwamoto, M., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas*. Int J Cancer, 2003. **104**(1): p. 92-7.
70. Sato, K., et al., *Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3581-9.
71. Fujita, S., et al., *Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3656-64.
72. McDyer, J.F., C.Y. Wu, and R.A. Seder, *The regulation of IL-12: its role in infectious, autoimmune, and allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(1): p. 11-5.
73. Pulendran, B., H. Tang, and S. Manicassamy, *Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses*. Nat Immunol, 2010. **11**(8): p. 647-55.
74. Shurin, M.R., et al., *Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy*. Springer Semin Immunopathol, 1999. **21**(3): p. 339-59.
75. Sharma, S., et al., *T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 5020-8.
76. Huang, M., et al., *Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3847-53.
77. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
78. Chen, M.L., et al., *Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 419-24.
79. Ghiringhelli, F., et al., *Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 919-29.
80. Zhang, Q., et al., *Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8+ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1761-9.
81. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
82. Gabrilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
83. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4772-80.
84. Enk, A.H., *Dendritic cells in tolerance induction*. Immunol Lett, 2005. **99**(1): p. 8-11.

85. Mahnke, K., et al., *Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship*. J Dermatol Sci, 2007. **46**(3): p. 159-67.
86. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
87. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars, *CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1538-43.
88. Oderup, C., et al., *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression*. Immunology, 2006. **118**(2): p. 240-9.
89. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
90. Pastille, E., et al. *Dendritic cell dysfunction after systemic infections is mediated by an altered differentiation of dendritic cells in the bone marrow*. in *40. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie*. 2010. Leipzig.
91. De Vries, I.J., et al., *Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state*. Cancer Res, 2003. **63**(1): p. 12-7.
92. Przewoznik, M., et al., *CXCL9- and CXCL10-dependent recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma proceed despite lack of IFN- γ* . 2010.
93. Hömberg, N. 2010.
94. Choi, P. and H. Reiser, *IL-4: role in disease and regulation of production*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(3): p. 317-9.
95. Koch, F., et al., *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 741-6.
96. Sato, M., et al., *Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients*. Anticancer Res, 1998. **18**(5D): p. 3951-5.
97. Khuda, S.E., et al., *Deregulation of c-Myc Confers distinct survival requirements for memory B cells, plasma cells, and their progenitors*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7537-49.

7 ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die Doktorarbeit selbstständig und nur mit erlaubten Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Marcella N. Naujoks)

München, den 18. Juli 2011

8 DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Mocikat für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen, die entscheidend zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Die gute Betreuung und das freundliche Arbeitsklima waren mir eine große Unterstützung.

Vielen Dank auch an Prof. D. J. Schendel, PhD, die mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrums München anzufertigen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kollegen aus der Arbeitsgruppe Mocikat, die mir mit Rat und Tat beiseite standen. Durch sie hat mir die Arbeit sehr viel Spaß und Freude bereitet hat.

Vielen Dank auch an das Tierhaltungspersonal für die stete Hilfsbereitschaft.

Bei den Arbeitskollegen des IMI möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen guten Hinweise und Hilfestellungen bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei Andrew Flatley bedanken, der mir bei der Immunisierung und Antikörpertiterbestimmung von großer Hilfe war.

Vielen Dank auch an Stephanie Edelmann (Institut für Immunologie der LMU München) für die Bereitstellung der OT-1- und OT-2-Mäuse.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere bei meinem Vater, für die Unterstützung während der Zeit meiner Doktorarbeit bedanken.

