

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Tumorzell-induzierte Hochregulation des Chemokins CCL22 in Immunzellen



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gabriela Wiedemann

aus Bad Tölz

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Kirchner
Priv. Doz. Dr. Reinhard Obst
Prof. Dr. Dolores Schendel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. David Anz

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2014

Meinen Eltern
und meiner Tante Maria

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Gabriela Wiedemann, an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Tumorzell-induzierte Hochregulation des Chemokins CCL22 in Immunzellen

selbstständig verfasst, mich außer der angegeben keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 14.01.2014

.....

Gabriela Wiedemann

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das angeborene und das adaptive Immunsystem	2
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	2
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	3
1.2	Chemokine	5
1.2.1	Allgemeine Eigenschaften	5
1.2.2	Das Chemokin CCL22	6
1.3	Tumorimmunologie	7
1.3.1	Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem	7
1.3.2	Immunentrinnungsstrategien von Tumorzellen	10
1.4	Fragestellung	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Geräte und Reagenzien	15
2.1.1	Technische Geräte	15
2.1.2	Reagenzien, Chemikalien und Puffer	16
2.1.3	Reagenziensätze	18
2.1.4	Materialien für die Zellkultur	18
2.1.5	Zelllinien	20
2.1.6	FACS Antikörper	21
2.1.7	Polyacrylamid-Gele	22
2.1.8	Primer für die <i>real-time</i> -PCR	22
2.1.9	Software	23
2.2	Tierversuche	24
2.2.1	Mäuse	24
2.2.2	Gewinnung von Splenozyten	24
2.2.3	Herstellung von Organlysaten	24
2.2.4	<i>In-vivo</i> -Tumormodelle	25
2.3	Zelluläre Methoden	26
2.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	26
2.3.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	26
2.3.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	27

2.3.4 Kultivierung von Tumorzellen	27
2.3.5 Herstellung von Tumorzelllysaten	27
2.3.6 Gewinnung und Kultivierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes	28
2.3.7 Kokultivierung von Tumor- und Immunzellen	28
2.3.8 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels MACS (<i>magnetic-activated cell sorting</i>)	29
2.4 Immunologische Methoden	30
2.4.1 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	30
2.4.2 Durchflussszytometrie	31
2.5 Molekularbiologische Methoden	32
2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
2.5.2 Gelelektrophorese	32
2.5.3 Anfärben von Proteinbanden	33
2.5.4 Extraktion zytoplasmatischer RNA	33
2.5.5 Reverse Transkription	34
2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion	35
2.6 Immunhistologie	37
2.7 Dialyse	38
2.8 Statistische Analyse	38
3 ERGEBNISSE	40
3.1 Tumortragende Mäuse haben systemisch erhöhte CCL22-Spiegel	40
3.1.1 CCL22 in murinen Tumoren	40
3.1.2 Subkutane Tumoren führen zur CCL22-Hochregulation auf Protein- und mRNA-Ebene	41
3.2 Erhöhte CCL22-Spiegel korrelieren mit vermehrtem Tumorwachstum	44
3.3 Ein von Tumorzellen produziertes Protein führt zur CCL22-Hochregulation in Immunzellen	46
3.3.1 Ein von murinen Tumorzellen produzierter löslicher Faktor führt zur CCL22- Hochregulation in Splenozyten	46
3.3.2 Ein von humanen Tumorzellen produzierter löslicher Faktor führt zur CCL22- Hochregulation in mononukleären Zellen des peripheren Blutes	48
3.3.3 Nicht-maligne Zellen führen zu keiner CCL22-Hochregulation in Immunzellen	50
3.3.4 CCL22-Produktion und Hochregulation findet vor allem in dendritischen Zellen statt	51

3.3.5 Die Kokultur mit Tumorzellen führt nicht zur Induktion weiterer inflammatorischer Zytokine.....	53
3.3.6 Die CCL22-Hochregulation wird nicht durch NFκB und Stat3 vermittelt	54
3.3.7 Ein von Tumorzellen sezerniertes Protein führt zur CCL22-Hochregulation in Immunzellen.....	56
3.4 CCL22-exprimierende und FoxP3-positive Zellen im hepatozellulären Karzinom.....	59
3.4.1 CCL22-exprimierende- und FoxP3-positive Zellen in HCC-infiltriertem Lebergewebe ..	60
3.4.2 Prognostische Signifikanz der Infiltration mit CCL22- und FoxP3-positiven Zellen beim HCC.....	64
4. DISKUSSION	66
4.1 Systemische CCL22-Hochregulation in Mäusen mit subkutanen Tumoren	66
4.2 Systemisch erhöhte CCL22-Werte führen zu vermehrtem Tumorwachstum	68
4.3 Ein von Tumorzellen sezerniertes Protein induziert CCL22-Produktion in Immunzellen	70
4.4 CCL22-produzierende Zellen myeloischen Ursprungs und FoxP3-positive Zellen finden sich in hoher Zahl in der Leber von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom	74
5. ZUSAMMENFASSUNG	78
Literaturverzeichnis.....	80
Abkürzungen	91
Publikationen.....	94
Danksagung.....	95

1 EINLEITUNG

Tumorerkrankungen sind derzeit nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Die Zahl der Krebsdiagnosen stieg in den letzten 20 Jahren um mehr als 20 %. Trotz enormer Fortschritte ist die Prognose vieler maligner Erkrankungen noch immer sehr schlecht, die klassischen drei Säulen der Krebstherapie - Chemotherapie, Chirurgie und Strahlentherapie - stoßen hier oftmals an ihre Grenzen. Es besteht Bedarf für neue Therapien in der Onkologie. Die Tumorimmunologie ist ein vielversprechendes, neues Feld in der Behandlung von Tumoren, welches die Möglichkeit eröffnet, Krebszellen sehr spezifisch und effektiv mit Hilfe des eigenen Immunsystems zu bekämpfen.

Die Erkenntnis, dass Tumorzellen vom eigenen angeborenen und vom adaptiven Immunsystem erkannt und eliminiert werden können, leitete ein neues Zeitalter in der Krebsforschung ein. Inzwischen sind immunostimulatorische Zytokine wie Interleukin 2 und Antikörper gegen Tumorantigene etablierte Bestandteile von Therapieschemata maligner Erkrankungen. 2010 erschien eine Phase-3-Studie, welche Therapieerfolge in der Behandlung des malignen Melanoms mit Ipilimumab nachwies, einem monoklonalen Antikörper gegen das das koinhibitorische Molekül *cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4* (CTLA-4) [Hodi et al. 2010]. Dies zeigt deutlich, dass das menschliche Immunsystem in der Lage ist, das Wachstum von Tumoren zu kontrollieren und eröffnete so eine Vielzahl neuer Möglichkeiten an immunologischen Therapieansätzen. Um diese Möglichkeiten zu nutzen ist eine genaue Kenntnis der Tumor-bedingten Unterdrückung des Immunsystems unabdingbar. Nur so ist es möglich, ihr entgegen zu wirken und eine erfolgreiche Zerstörung von Tumorzellen durch die körpereigene Abwehr zu erreichen, ohne gleichzeitig eine zu starke Immunsuppression zu provozieren. Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Mechanismen tumorinduzierter Immunsuppression und soll ein Schritt auf dem Weg zu neuen Ansätzen in der Immuntherapie von Krebserkrankungen sein.

1.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Jeder Mensch ist ständig der Gefahr eindringender pathogener Mikroorganismen aus der Umwelt oder pathologisch veränderter eigener Zellen ausgesetzt. Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk zellulärer und löslicher Bestandteile, welches den Körper vor diesen Bedrohungen schützt. Wie bei allen Wirbeltieren besteht auch das menschliche Immunsystem aus zwei Komponenten – der angeborenen und der adaptiven Abwehr. Beide Systeme sind miteinander verschaltet und kooperieren so in der effektiven Abwehr fremder Pathogene und transformierter körpereigener Zellen.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist der phylogenetisch alte Zweig der menschlichen Abwehr. Im Kampf gegen eindringende Mikroorganismen stellt es eine erste Verteidigungslinie dar [Ezekowitz and Hoffmann 1996]. Neben der Epithelbarriere und löslichen Bestandteilen wie dem Komplementsystem wird die angeborene Abwehr vor allem durch Phagozyten wie Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt. Sie exprimieren an der Zelloberfläche oder im Endosom *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), die zentralen *Pattern-recognition*-Rezeptoren der angeborenen Abwehr. Die Bindung von bestimmten, hochkonservierten molekularen Mustern auf Pathogenen oder viralen Nukleinsäuren an TLR führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, welche in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und der Aktivierung von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems endet [Hemmi et al. 2000; Jiang et al. 2000; Akira and Hemmi 2003]. Des Weiteren sind Makrophagen und dendritische Zellen in der Lage, eingedrungene Fremdorganismen anhand einfacher, spezifischer Muster zu erkennen und zu phagozytieren [Medzhitov and Janeway 1997]. Durch Aufnahme der Pathogene werden die Makrophagen aktiviert und locken mit Hilfe von Chemokinen weitere Immunzellen an den Ort der Infektion [Brightbill et al. 1999]. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine leitet eine lokale und systemische Entzündungsreaktion ein. In den dendritischen Zellen werden die phagozytierten Partikel prozessiert und auf der Oberfläche präsentiert, was die Aktivierung von T-

Zellen zur Folge hat [Austyn 1992]. Durch die Abläufe der angeborenen Abwehr wird die adaptive Immunantwort eingeleitet und eine spezifisch an die Abwehrsituation angepasste Immunreaktion kann stattfinden [Schnare et al. 2001].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive oder spezifische Abwehr setzt im Gegensatz zur angeborenen Immunreaktion mit Verzögerung ein. Sie zeichnet sich jedoch durch eine höhere Effizienz und Antigenspezifität aus und kann so auch auf Pathogene reagieren, welche nicht die verbreiteten, hochkonservierten Oberflächenmoleküle tragen, die von den Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Nach Ablauf einer spezifischen Immunantwort bleiben so genannte Gedächtniszellen zurück, welche bei erneutem Kontakt mit demselben Erreger zu einer schnelleren adaptiven Immunantwort führen.

1.1.2.1 Effektorzellen der adaptiven Immunabwehr

Die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort sind B- und T-Lymphozyten. Jede dieser Zellen exprimiert einen einzelnen, hochspezifischen Antigen-Rezeptor an der Oberfläche. Die beinahe unendliche Vielfalt dieser Rezeptoren wird durch somatische Rekombination der B- und T-Zellrezeptorgene ermöglicht [Nemazee 2000]. Um einen naiven Lymphozyten zu aktivieren bedarf es des Kontakts mit einer aktivierten Antigen-präsentierenden dendritischen Zelle. Durch Bindung des Rezeptors an das auf der dendritischen Zelle präsentierte Antigen kommt es bei gleichzeitigem Vorhandensein kostimulatorischer Signale zur klonalen Expansion des antigen-spezifischen Lymphozyten [Sharpe and Freeman 2002].

T-Lymphozyten lassen sich grob in zwei Klassen einteilen: T-Effektor-Zellen, welche das CD8-Antigen exprimieren, können direkt zytotoxisch auf Fremdzellen und Mikroorganismen einwirken [Russell and Ley 2002]. T-Helfer-Zellen hingegen, welche CD4 auf der Oberfläche tragen, führen über Zytokinausschüttung zur

Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten [Bishop and Hostager 2001; Janssen et al. 2003]. B-Lymphozyten produzieren nach ihrer Aktivierung Antikörper, welche extrazelluläres Antigen binden. Dadurch wird das Antigen neutralisiert oder für Makrophagen und Komplementsystem erkennbar gemacht.

1.1.2.2 Regulatorische T-Zellen

Die ausgefeilten Mechanismen der adaptiven Immunantwort bergen dennoch eine Gefahr: entgehen autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion im Thymus so kann dies zur Entstehung von Autoimmunität führen. Es müssen daher Immunsuppressions-Strategien bestehen, die eine T-Zell-Reaktion gegen Eigenantigene verhindert. So festigte sich in den letzten Jahrzehnten die Meinung, dass eine suppressive T-Zell-Population existiert, welche der Entstehung T-Zell vermittelter Autoimmunreaktionen entgegenwirkt [Gershon and Kondo 1970]. Im Jahr 1995 beschrieb Sakaguchi eine immunsuppressive Subgruppe CD4-positiver T-Zellen, welche zugleich das Oberflächenantigen CD25 exprimiert [Sakaguchi et al. 1995]. Die Depletion dieser Zellen resultierte in einer schweren systemischen Autoimmunität [Suri-Payer et al. 1998]. Später wurden diese Suppressor-T-Zellen regulatorische T-Zellen (Treg) genannt. Sie stellen 5 bis 10 % der CD4-Antigen-tragenden Zellen im Blut und können durch die spezifische Expression des Transkriptionsfaktor *forkhead box protein3* (FoxP3) identifiziert werden [Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003].

Es finden sich zwei Hauptgruppen von Treg. Die natürlich vorkommenden Treg (nTreg) reifen ähnlich den konventionellen T-Zellen im Thymus. Die induzierten Treg (iTreg) hingegen entstehen in der Peripherie aus naiven CD4+ T-Zellen in Anwesenheit von *transforming growth factor beta* (TGF- β) [Chen et al. 2003; Josefowicz and Rudensky 2009]. Die Funktion der Treg besteht in der Unterdrückung von angeborenen und adaptiven Immunreaktionen und der Vermittlung von Toleranz [Sakaguchi 2000; Sakaguchi and Powrie 2007]. Dies wird unter anderem durch die Hemmung zytotoxischer und CD4+ CD25- T-Zellen erreicht.

Die genauen Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression sind bis heute nicht vollständig geklärt, jedoch scheinen eine Vielzahl von Mechanismen mit und ohne Zellkontakt-Abhängigkeit eine Rolle zu spielen. Der Konsum von Interleukin-2 (IL-2) durch Treg beispielsweise führt zur Inhibition konventioneller T-Zellen [Furtado et al. 2002]. Auch dem Protein *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4), welches auf der Zelloberfläche von T-Helfer Zellen exprimiert wird, wird eine Rolle in der Treg-vermittelten Suppression zugesprochen [Boden et al. 2003]. Des Weiteren sind auch Zytokine wie TGF- β und Interleukin-10 (IL-10) an der Unterdrückung von einer Immunantwort durch Treg beteiligt [Asseman et al. 1999; Fahlen et al. 2005].

Neben ihrer zentralen Funktion in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und der Prävention von Autoimmunerkrankungen spielen Treg auch eine Rolle in der Tumor-induzierten Immunsuppression. So wurde eine hohe Anzahl an Treg in Tumoren verschiedenster Entitäten [Liyanage et al. 2002; Sato et al. 2005; Hiraoka et al. 2006; Gobert et al. 2009], sowie in malignem Aszites [Sasada et al. 2003; Curiel et al. 2004], in Tumor-drainierenden Lymphknoten und im peripheren Blut von Tumorpatienten gefunden [Liyanage et al. 2002]. Eine hohe Infiltration mit Treg korrelierte in vielen Fällen interessanterweise mit einem erhöhten Tumorstadium [Curiel et al. 2004; Hiraoka et al. 2006] und einer verschlechterten Prognose [Sasada et al. 2003; Curiel et al. 2004; Sato et al. 2005; Bates et al. 2006; Hiraoka et al. 2006].

1.2. Chemokine

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften

Um ihre Funktion effizient ausüben zu können müssen die Zellen des Immunsystems gezielt zum Ort der Infektion oder in sekundäre Lymphorgane gelangen, wo sie auf Antigen-präsentierende Zellen treffen. Dies geschieht mit der Hilfe von Chemokinen, welche im Zielgewebe sezerniert werden und so eine gerichtete Leukozytenwanderung dorthin induzieren. Entlang dem Konzentrationsgradienten migrieren die verschiedenen Leukozytenpopulationen, welche ihrer Herkunft und funktionellen Reife entsprechend spezifische

Chemokinrezeptoren exprimieren, zum Ort der Chemokinausschüttung und können dort eine Immunantwort initiieren [Schall and Bacon 1994]. Dieser Prozess wird als Chemotaxis bezeichnet.

Chemokine sind eine Gruppe strukturell verwandter Zytokine mit einer molaren Masse von 8 bis 14 kDa. Sie können anhand der Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus in vier Gruppen aufgeteilt werden: CC, CXC, CX3C und XC [Zlotnik and Yoshie 2000]. Zielstruktur der Chemokine sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren in der Zellwand verschiedenster Zellen. Da jede Immunzelle ein spezifisches Chemokinrezeptor-Repertoire an ihrer Oberfläche exprimiert kann so die Immunantwort entsprechend der jeweiligen Abwehrsituation moduliert werden.

1.2.2 Das Chemokin CCL22

CCL22, auch bekannt als *Macrophage-derived chemokine* (MDC), ist ein CC-Chemokin, welches Ende der 90er Jahre entdeckt und erstmals im Jahr 2000 von Mantovani genauer beschrieben wurde [Mantovani et al. 2000]. Wie der Name vermuten lässt, wurde eine konstitutive CCL22-Expression zunächst in differenzierten Makrophagen gefunden [Godiska et al. 1997], bis heute sind aber eine Reihe weiterer CCL22-produzierender Zellen entdeckt worden. Hauptquelle von CCL22 sind neben Zellen monozytären Ursprungs dendritische Zellen [Vulcano et al. 2001]. Viele andere Immunzellen sind außerdem in der Lage, CCL22 unter bestimmten Bedingungen hoch zu regulieren, so beispielsweise T-Helfer Zellen und B-Zellen [Schaniel et al. 1998; Iellem et al. 2000]. Stimuli, welche zur CCL22-Produktion führen sind unter anderem die typischen Th2-Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) sowie Tumornekrosefaktor (TNF), bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) und T-Zell-Rezeptor-Aktivierung [Bonecchi et al. 1998; Rodenburg et al. 1998]. Th1-Reaktionen zuzuordnende Zytokine wie Interferon und Interleukin-12 (IL-12) hingegen inhibieren die Produktion von CCL22 in bestimmten Immunzellen [Bonecchi et al. 1998].

CCL22 ist der funktionelle Ligand für den CC-Chemokin Rezeptor 4 (CCR4) [Imai et al. 1998], welcher von Th2-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert wird [Imai

et al. 1999; Iellem et al. 2001]. Es ist seit längerem bekannt, dass CCL22 eine Rolle in Th2-vermittelten Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis und dem Asthma bronchiale spielt [Vestergaard et al. 1999; Pilette et al. 2004]. Aufgrund seiner Fähigkeit, suppressive regulatorische T-Zellen spezifisch anzulocken wurde CCL22 in den letzten Jahren zudem vermehrt eine Funktion in der Generierung eines immunsuppressiven Milieus durch Tumoren zugesprochen.

1.3 Tumormmunologie

1.3.1 Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem

Zur Entstehung von Krebserkrankungen bedarf es multipler Genmutationen in einer einzelnen somatischen Zelle, welche in ihrer Summe zum unkontrollierten Wachstum und zur Expansion dieser Zelle führen. Diese genetischen Mutationen resultieren in der Produktion veränderter Proteine, welche auf der im eigentlichen Sinne körpereigenen Tumorzelle präsentiert werden. Werden diese Tumor-assoziierten Antigene (TAA) über MHC-I auf der Zelloberfläche präsentiert, so können sie vom adaptiven Immunsystem als fremd erkannt werden [Old and Boyse 1964; Boon et al. 1997]. Die Idee, dass Krebserkrankungen einer Kontrolle durch das Immunsystem unterliegen, ist seit mehr als 100 Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Erst in den letzten Jahrzehnten wurden jedoch umfassendere Kenntnisse über die Immunüberwachung von Tumoren gewonnen. Man geht von drei unterschiedlichen Aufgaben des Immunsystems bei der Abwehr von Krebserkrankungen aus:

- 1) Es schützt vor viralen Infektionen und so auch vor Virus-induzierten Tumoren [Butel 2000; Vesely et al. 2011].
- 2) Es bewahrt durch die schnelle Elimination von Pathogenen den Körper vor der Entstehung eines chronisch inflammatorischen Milieus, welches die Tumorentstehung fördert [Coussens and Werb 2002].
- 3) Es eliminiert veränderte Körperzellen, welche es über Tumor-spezifische Antigene als fremd erkennt [Boon et al. 1997; Shankaran et al. 2001].

Der letzte Punkt gewann 2001 an Interesse als eine Studie zeigte, dass die Elimination von Tumorzellen zugleich zur Selektion immunkompetenter Tumorzellen führte und so in der Entstehung neoplastischer Zellen mit verminderter Immunogenität resultierte [Shankaran et al. 2001]. Diese Erkenntnis ist die Basis der *Tumor Immunoediting* Hypothese, welche sowohl die abwehrende als auch die fördernde Auswirkung des Immunsystems auf sich entwickelnde Tumoren berücksichtigt. Der Prozess der Formung des Tumors durch das Immunsystem läuft in drei Phasen ab, der Eliminationsphase, der Gleichgewichtsphase und dem Entrinnen [Dunn et al. 2002; Schreiber et al. 2011] (Abbildung 1.1):

In der Phase der Eliminierung werden die Tumorzellen in einer Zusammenarbeit von angeborenem und adaptivem Immunsystem zerstört, bevor ein klinisch manifester Tumor auftritt. Die genauen Mechanismen der Eliminierung sind noch nicht erforscht. Die Erkennung von Tumorantigenen durch das adaptive Immunsystem führt im Zusammenspiel mit der Ausschüttung von Gefahrensignalen und Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ) zur Aktivierung der angeborenen Abwehr [Smyth et al. 2000; Smyth et al. 2000; Street et al. 2002]. Entkommen einzelne Tumorzellen der Zerstörung durch das Immunsystem so treten sie in das Equilibriumsstadium ein, in welchem sie in einer Art Gleichgewichtszustand der Kontrolle durch das adaptive Immunsystem unterliegen [Koebel et al. 2007]. Diese Phase kann über eine sehr lange Zeit bestehen und auch Endpunkt des Prozesses sein. Entgeht eine Tumorzelle jedoch der Kontrolle durch das Immunsystem und tritt in einen proliferativen Zustand ein, so ist dies der Beginn der Entrinnungsphase und der klinischen Manifestation einer Krebserkrankung.

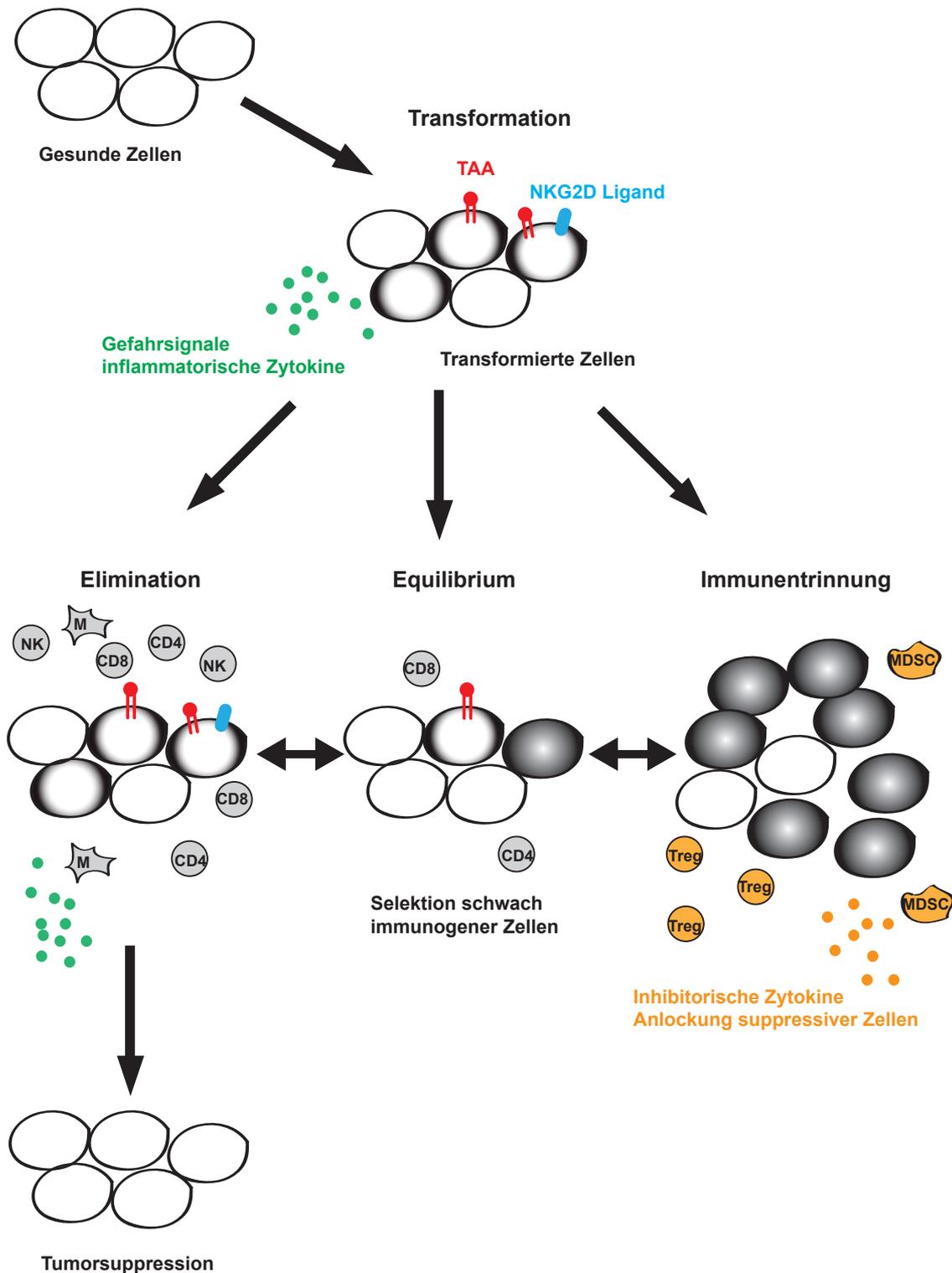


Abbildung 1.1 Formung des Tumors durch das Immunsystem – *tumor immunoediting* (modifiziert nach [Schreiber et al. 2011])

Es werden drei Phasen beschrieben: in der Phase der Elimination wird das angeborene Immunsystem über Gefahrsignale aktiviert und die angeborene sowie die adaptive Abwehr erkennen Tumorzellen anhand spezifischer Rezeptorliganden (z. B. NKG2D) oder Tumorassoziierten Antigenen (TAA). Die Tumorzellen werden angegriffen und durch Effektorzellen des Immunsystems zerstört. Ist dies erfolgreich, so kann die Tumorentstehung erfolgreich verhindert werden. Überleben jedoch einzelne Tumorzellen, so können sie in das

Equilibriumsstadium eintreten. Hier verbleiben Tumorzellen unter der Kontrolle der adaptiven Immunität in einem Ruhezustand, in dem sie über lange Zeit überdauern können. Der Druck durch das Immunsystem führt jedoch zur Selektion schwach immunogener Tumorzellen. So entstehen Krebszellen, welche sich der Erkennung und Vernichtung durch das Immunsystem entziehen. In der Phase der Immunentrinnung kommt es zur unkontrollierten Proliferation einzelner Tumorzellen stark reduzierter Immunogenität. Durch intrazelluläre Modifikationen, aktive Hemmung des Immunsystems und Anlockung suppressiver Leukozyten entziehen sich die Tumorzellen einer effektiven Elimination durch das Immunsystem. Dies ist der Beginn einer klinisch bedeutsamen Krebserkrankung. Jedes der drei Stadien kann auch Endpunkt der Entwicklung sein und nicht jede Phase muss in der Tumorentstehung zwangsläufig durchwandert werden. (TAA = Tumor-assoziiertes Antigen; CD4 = CD4+ T-Lymphozyten; CD8 = CD8+ T-Lymphozyten; M = Makrophagen; MDSC = *myeloid-derived suppressor cells*; NK = Natürliche Killerzelle; Treg = regulatorische T-Zelle.)

1.3.2 Immunentrinnungsstrategien von Tumorzellen

Tumorzellen greifen auf eine Vielzahl an Mechanismen zurück, um der kompletten Elimination durch das Immunsystem zu entgehen. Diese beinhalten sowohl die Modifikationen der Tumorzellen, welche die Erkennung oder die effektive Zerstörung der Krebszellen durch das Immunsystem verhindert, als auch die Generierung eines immunsuppressiven Milieus.

1.3.2.1 Modifikationen auf Tumorzellebene

Defekte in der Antigenprozessierung und –präsentation können zu einer fehlerhaften Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem führen. Der Verlust des *Major histocompatibility complex class I* (MHC I), von dessen Bestandteil β -Mikroglobulin oder Komponenten des MHC I Antigenprozessierungswegs wird durch den Selektionsdruck, welchen das Immunsystem auf die Tumorzellen ausübt, begünstigt und resultiert in einem Verlust der Immunogenität der Tumorzelle [Restifo et al. 1996; Garcia-Lora et al. 2003]. Des Weiteren kann es durch genetische Instabilität zum Ausfall der Bildung Tumor-spezifischer Antigene kommen, wodurch die Tumorzelle sich der Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entzieht.

Weitere Modifikationen, welche Tumorzellen vor einer effektiven Immunantwort schützen, sind der Verlust des Effektormoleküls für Natürliche Killerzellen (NK) NKG2D, eine verminderte Interferon- γ Sensitivität und die konstitutive Aktivierung

des Transkriptionsfaktors *Signal transducer and activator of transcription 3* (Stat3), welche zur verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und zu einer Beeinträchtigung der funktionellen Reifung von dendritischen Zellen führt [Wang et al. 2004; Dunn et al. 2005; Stern-Ginossar et al. 2008]. In einem Zellkontakt-abhängigen Mechanismus können Tumorzellen darüber hinaus über die Expression verschiedener inhibitorischer Liganden auf der Zelloberfläche die zytotoxische Funktion von Immunzellen beeinträchtigen oder T-Zell-Apoptose induzieren [Dong et al. 2002; Derre et al. 2006].

1.3.2.2 Ausbildung eines immunsuppressiven Milieus

Neben den zahlreichen zelleigenen Modifikationen können Tumorzellen auch auf ihre unmittelbare Umgebung einwirken und ein immunsuppressives Mikromilieu generieren, welches Schutz vor einer effektiven Immunantwort bietet [Radoja et al. 2000]. Dies geschieht einerseits durch die Ausschüttung inhibitorischer Faktoren, welche die Funktion von Effektorzellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems hemmen. So können Tumorzellen über lösliche Faktoren die Reifung, Funktion und die Migration dendritischer Zellen zu den Lymphknoten hemmen und so die Immunantwort bereits im Anfangsstadium der Antigenpräsentation unterbinden [Herber et al. 2010; Villablanca et al. 2010]. Auch sezernieren Tumorzellen lösliche Liganden für T-Zell- und NK-Zellrezeptoren, wodurch sie deren Aktivierung und Funktion blockieren [Groh et al. 2002]. Die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine wie *Transforming growth factor beta* (TGF- β), Interleukin-10 (IL-10), Galektin 1 und *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und die Expression des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) durch Tumorzellen inhibieren verschiedenste Stadien der durch dendritische Zellen, NK-Zellen und T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort [Gabrilovich et al. 1996; Aruga et al. 1997; Fujii et al. 2001; Uyttenhove et al. 2003; Rubinstein et al. 2004; Wrzesinski et al. 2007] (Abb. 1.2).

Zum anderen können suppressive Immunzellen wie Treg und *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) an den Ort des Tumors gelockt werden. Treg inhibieren in der Tumorumgebung die Funktion tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen und die

Depletion CD25+ Treg resultiert so im Mausmodell in einer verbesserten Immunantwort gegen Tumorzellen [Onizuka et al. 1999; Shimizu et al. 1999]. Die Mechanismen welche zur Akkumulation von Treg im Tumor führen sind vielfältig und noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit ist die intratumorale Produktion des Chemokins CCL22 welches die Chemotaxis von Treg zum Tumor auslöst [Curiel et al. 2004; Ishida et al. 2006]. MDSC sind eine heterogene Gruppe myeloider Progenitorzellen und unreifer myeloider Zellen, welche die Funktion und Aktivierung von T-Lymphozyten und NK-Zellen inhibieren und regulatorische T-Zellen induzieren [Huang et al. 2006; Li et al. 2009; Srivastava et al. 2010] (Abb. 1.2).

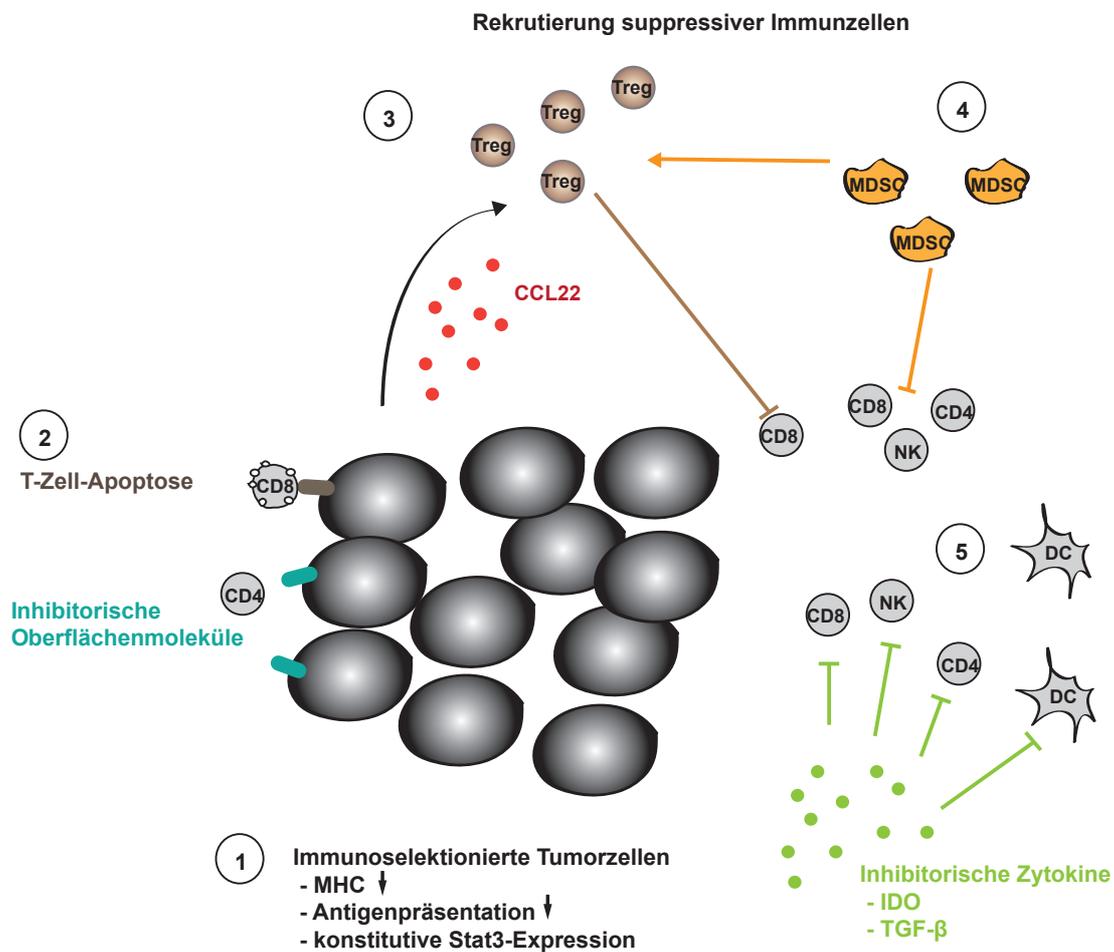


Abb. 1.2 Tumor-Immunentrinnungsmechanismen (modifiziert nach [Vesely et al. 2011])

Tumorzellen bilden multiple Mechanismen aus, um eine gegen sie gerichtete Immunantwort zu supprimieren. (1) Durch Immunselektion entstehen Tumorzellen, welche sich der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem entziehen. Eine verminderte Antigenpräsentation durch Modifikationen in der MHC-Expression und der Antigenprozessierung verhindert eine Erkennung durch T-Lymphozyten. Konstitutive Stat3-Expression führt zur verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und verhindert so die Aktivierung dendritischer Zellen. (2) Auf der Tumorzelloberfläche exprimierte inhibitorische Moleküle und Apoptose-induzierende Liganden wie der Fas-Ligand blockieren die T-Zell-Immunantwort und leiten T-Zell-Apoptose ein. (3) Intra- und peritumoral produziertes CCL22 lockt regulatorische T-Zellen zum Tumor, wo diese die Funktion tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen supprimieren. (4) Eine weitere Gruppe suppressiver

Immunzellen, myeloide Suppressorzellen (MDSC), werden zum Tumor rekrutiert. Sie hemmen die Funktion von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen und induzieren die Neubildung regulatorischer T-Zellen. (5) Die Ausschüttung inhibitorischer Zytokine wie Galektin-1, Interleukin-10, *Transforming growth factor beta* (TGF- β) und *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) sowie von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) führt zur Suppression von T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen. CD4 = CD4+ T-Lymphozyt; CD8 = CD8+ T-Lymphozyt; DC = Dendritische Zelle; MDSC = *myeloid-derived suppressor cell*; NK = Natürliche Killerzelle; Treg = regulatorische T-Zelle;

1.4 Fragestellung

2004 zeigten Curiel et al. erstmals, dass die Migration von Treg zum Tumor unter dem Einfluss der Interaktion zwischen dem von Tumorzellen und Tumorassoziierten Makrophagen produzierten Chemokin CCL22 und dessen auf Treg exprimiertem Rezeptor CCR4 steht [Curiel et al. 2004]. Seither wurde in vielen murinen und humanen Tumoren CCL22-Expression gefunden, so beispielsweise im Mammakarzinom, dem Hodgkin Lymphom, der chronischen B-Zelleukämie, dem Glioblastom, dem Ösophagus-, Magen- und kolorektalen Karzinom und dem Lungenkarzinom [Ghia et al. 2002; Ishida et al. 2006; Mizukami et al. 2008; Wagsater et al. 2008; Gobert et al. 2009; Mailloux and Young 2009; Jacobs et al. 2010; Maruyama et al. 2010]. In vielen dieser Tumoren korrelierten hohe CCL22-Werte mit einer vermehrten Infiltration durch regulatorische T-Zellen und einem verschlechterten klinischen Ausgang. Die Mechanismen der CCL22-Freisetzung in Tumoren und ihre detaillierte Bedeutung für die Tumor-induzierte Immunsuppression sind nicht vollständig bekannt. Aufgrund seiner nachweislichen Beteiligung an der Ausbildung eines immunsuppressiven Tumormilieus scheint CCL22 jedoch ein vielversprechendes Ziel für neuartige Tumortherapieansätze. Es ist daher wichtig, genaue Einsicht in die Zusammenhänge von CCL22-Expression und Immunsuppression durch Tumoren zu erlangen. Dies war die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

Es sollte zunächst die intratumorale und systemische CCL22-Expression in verschiedenen murinen Tumormodellen untersucht werden. In einem murinen Tumormodell sollte festgestellt werden, wie sich systemisch erhöhte CCL22-Spiegel auf das Tumorwachstum auswirken.

Um die genauen Mechanismen der durch Tumore vermittelten CCL22-Hochregulation in Immunzellen zu analysieren wurden *in-vitro* Kokulturen von Tumorzellen und Immunzellen durchgeführt. Im Folgenden sollte die CCL22-produzierende Zellpopulation im Tumor identifiziert werden. Insbesondere sollte geklärt werden, welche Mechanismen zur Induktion von CCL22 führen. Dabei sollte überprüft werden, ob Zellkontakt-abhängige Faktoren oder lösliche Proteine die CCL22-Induktion verursachen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Technische Geräte

Amicon Zentrifugenfilter (3 kD bzw. 30 kD)	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
CO ₂ – Brutschrank (BD6220)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
FACSCanto II	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Float-A-Lyzer G2 Dialyseeinheit	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez CA, USA)
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühl- und Gefrierschränke 4°C, -20°C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Lamin Air	Heraeus (Hanau, Deutschland)
LightCycler480 System	Roche (Mannheim, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena, Deutschland)
MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mithras LB940 ELISA Reader	Bertold (Bad Wildbad, Deutschland)
Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Multifuge 4KR	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Nanophotometer	Implen GmbH (München, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht (Balgach, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
PowerPac Basic Spannungsgerät	Biorad (München, Deutschland)
Slide-A-Lyzer Dialysekassetten	Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford IL, USA)
Thermocycler T3	Biometra (Göttingen, Deutschland)

Vortex	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Waage CPA 1003S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BrefeldinA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BD Pharm Lyse Lysing Buffer (10x)	BD Biosciences (New Jersey USA)
CCL22, rekombinant	Preprotech (Hamburg, Deutschland)
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Cycloheximid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DNase I	Roche (Mannheim, Deutschland)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA (Pasching, Österreich)
Ethanol 100%	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Heparin-Natrium 2.500 IE / 5ml	B.Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Isofluran	Abbott (Zug, Schweiz)
Isopropanol (70%, 100%)	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)

Kollagenase D	Roche (Mannheim, Deutschland)
Natriumchlorid 0,9%	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)
RiboShredder RNase Blend	Epicentre Biotechnologies Madison, USA)
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis Lösung 30%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure 2N	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

ELISA Coating Puffer 1

PBS
Wasser

ELISA Coating Puffer 2

0,2 M Natriumphosphat in
pH 6,5/ pH 9,5

ELISA Verdünnungspuffer 1

FCS in PBS

ELISA Verdünnungspuffer 210%

1% BSA in PBS

ELISA Waschpuffer

0,05% Tween20 in PBS

MACS Puffer

2mM EDTA
1% BSA / 10% FCS
in PBS

Erylyse Puffer

10% BD Pharm Lyse in destilliertem Wasser

Laufpuffer (10x) für SDS-PAGE Gelelektrophorese

ddH₂O
1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,25 M Tris-Cl
2 M Glycin
pH 8,3

2.1.3 Reagenziensätze

Protein-Quantifizierung mittels Bradford-Assay

Protein Assay Kit Biorad (München, Deutschland)

Organlysate

Bio-Plex Cell Lysis Kit Biorad (München, Deutschland)

RNA-Isolation, cDNA Synthese, *rt*-PCR

Trizol Reagent Invitrogen (Carlsbad CA, USA)

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit
Deutschland) Fermentas (St. Leon-Rot,

LightCycler 480 Probes Master Roche (Mannheim, Deutschland)

Silver Stain von Proteinen auf Polyacrylamid-Gel

SilverSNAP Stain for Mass Spectrometry Pierce (Rockford IL, USA)

Zytokin-ELISA

human IL-1 β , IL-4, TNF, INF- γ BD Biosciences (New Jersey, USA)

murin IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12p40 BD Biosciences (New Jersey, USA)

murin/ human CCL22 R&D Systems (Minneapolis, USA)

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

Dulbecco's modified Eagles medium DMEM, PAA (Pasching, Österreich)

High Glucose

FBS (Fetales Kälberserum) Gibco Products (Grand Island NY, USA)

HEPES-Puffer 1M Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

L-Glutamin 200mM	PAA (Pasching, Österreich)
MEM Non-essential amino acids (NEAA, 100x)	Gibco Products (Grand Island NY, USA)
Natrium-Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
Opti-MEM	Gibco Products (Grand Islands NY, USA)
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA (Pasching, Österreich)
Roswell Park Memory Institute (RPMI)	PAA (Pasching, Österreich)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin (10x)	PAA (Pasching, Österreich)
VLE (Very Low Endotoxine) RPMI Deutschland)	Biochrom AG (Berlin,

Zellkultur-Medien

T-Zell Medium

VLE-RPMI
10% FBS
2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 μ g/ml Streptomycin
1mM Natrium-Pyruvat
1% MEM-NEAA
1/1000 β -Mercaptoethanol

RPMI – Vollmedium

RPMI
10% FBS
2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 μ g/ml Streptomycin
1mM Natrium-Pyruvat
1% MEM-NEAA

DMEM - Vollmedium

DMEM High Glucose
10% FBS
2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 μ g/ml Streptomycin

humanes T-Zell Medium

VLE RPMI
2 % humanes AB-Serum
2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 μ g/ml Streptomycin
1mM Natrium-Pyruvat
1% MEM-NEAA
50 μ M β -Mercaptoethanol

Kryo-Medium

90 % FBS

10 % DMSO

Serumfreies Medium

OptiMEM

100 IU/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen BD Falcon (Franklin Lakes NJ, USA), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Corning (Corning NY, USA), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Deutschland), Millipore (Billerica, USA) und Sartorius (Göttingen, Deutschland) erworben.

2.1.5 Zelllinien

Folgende murine und humane Zelllinien wurden verwendet:

Zelllinie	Zellart	Verwendetes Medium	Herkunft (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von)
A-375	Humane Melanom-Zelllinie	RPMI-Vollmedium	PD Dr. rer. nat. E. Nöbner (Helmholtz Zentrum München, Deutschland)
B16	Murine Melanom-Zelllinie (C57BL/6)	DMEM-Vollmedium	LGC Promochem (Teddington, UK)
CT26	Murine Kolonkarzinom-Zelllinie (balb/c)	DMEM-Vollmedium	Cell Lines Service (Heidelberg, Deutschland)
DC2.4	Murine immortalisierte Dendritische Zelllinie (C57BL/6)	DMEM-Vollmedium	Kenneth Rock (Harvard Medical School, Boston, MA, USA)
EL4	Murine Lymphom-Zelllinie (C57BL/6)	DMEM-Vollmedium	<i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>
HEK-293	Humane Embryonale Nierenzelllinie	DMEM-Vollmedium	ATCC
IMIM PC1	Humane Pankreaskarzinom-	DMEM-Vollmedium	Prof. Dr. med. Patrick Michl (Abteilung für

	Zelllinie		Gastroenterologie und Endokrinologie der Universität Marburg, Deutschland)
MC38	Murine Kolorektales-Adenokarzinom-Zelllinie (C57BL/6)	DMEM-Vollmedium 5mM HEPES-Puffer	Dr. rer. nat. Sabine Hoves (Abteilung für Klinische Pharmakologie der LMU München, Deutschland)
MDAMB-231	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie	DMEM-Vollmedium	PD Dr. med. C. Scholz (Frauenklinik der LMU München, Deutschland)
Ovcar-3	Humane Ovar-Adenokarzinom-Zelllinie	DMEM-Vollmedium	PD Dr. med. C. Scholz (Frauenklinik der LMU München, Deutschland)
PancO2	Murine Pankreaskarzinom-Zelllinie (C57BL/6)	DMEM-Vollmedium	Prof. Dr. med. C. Bruns (Chirurgische Klinik der LMU München, Deutschland)
SK-Mel23	Humane Melanom-Zelllinie	RPMI-Vollmedium	PD Dr. rer. nat. E. Nöbner (Helmholtz Zentrum München, Deutschland)
4T1	Murine Mammakarzinom-Zelllinie (balb/c)	RPMI-Vollmedium	Dr. med. M. Wartenberg (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland)

2.1.6 FACS Antikörper

anti-B220	Biolegend (San Diego CA, USA)
anti-CD11c	Biolegend (San Diego CA, USA)
anti-CD25	Biolegend (San Diego CA, USA)
anti-CD3	Biolegend (San Diego CA, USA)
anti-CD4	Biolegend (San Diego CA, USA)
anti-CD8	Biolegend (San Diego CA, USA)
anti-FoxP3	Biolegend (San Diego CA, USA)
anti-MHC-II	Biolegend (San Diego CA, USA)
Propidium-Iodid	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)

2.1.7 Polyacrylamid-Gele

Gele für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden wie folgt angemischt:

<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel (10/ 12/ 15 %)</u>
ddH ₂ O	ddH ₂ O
5 % Acrylamid	10% / 12% / 15 % Acrylamid
25% 0.5M Tris-HCl, pH 6,8	25% 1,5M Tris-HCl, pH 8,8
2,5% SDS (Natriumdodecylsulfat) (Natriumdodecylsulfat)	2,5% SDS
0,1% Ammoniumpersulfat (APS)	0,1 % Ammoniumpersulfat
0,1% TEMED	0,04 % TEMED

2.1.8 Primer für die *real-time*-PCR

Die Primersequenzen und die zugehörigen Sonden wurden mit dem Assay Design Center der Universal Probe Library von Roche Applied Science entworfen. Die Sonden wurden von der Roche Universal Probe Library (Mannheim, Deutschland) bezogen, die Primer von Metabion (Martinsried, Deutschland).

Gen	Sequenz	Accession Code	Position	Son-de N°	Effizienz
CCL22 human	L: ccccctgaccctctaac R: ggaacaggaccctctgactg	NM_00 2990.3	L: 466 – 483 R: 506 – 525	13	2,00
CCL22 murin	L: tcttgctgtggcaattcaga R: gagggtgacggatgtagtcc	NM_00 9137.2	L: 72 – 91 R: 144 – 163	84	2,08

CD11c murin	L: atggagcctcaagacaggac R: ggatctgggatgctgaaatc	NM_02 1334.2	L: 1725 – 1744 R: 1768 – 1787	20	2,00
HPRT human	L: tgacctgattatattgcatacc R: cgagcaagacgttcagtct	NM_00 0194.2	L: 218 – 241 R: 300 – 319	73	2,00
HPRT murin	L: Cctcctcagaccgctttt R: aacctggtcatcatcgctaa	NM_01 3556.2	L: 104 – 122 R: 173 - 193	95	1,90

2.1.9 Software

Adobe Creative Suite

FlowJo

GraphPad Prism

Microsoft Office

Adobe Systems (San Jose, USA)

Tree Star (Ashland OR, USA)

GraphPad Software (La Jolla,
USA)

Microsoft (Redmond, USA)

2.2 Tierversuche

2.2.1 Mäuse

Weibliche balb/c und C57BL/6 Mäuse wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Experimente 6 bis 12 Wochen alt. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (Regierung von Oberbayern, München, Deutschland).

2.2.2 Gewinnung von Splenozyten

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Genickbruch unter Isofluran-Anästhesie. Nach Entnahme der Milz wurde unter sterilen Bedingungen 1 ml einer 1 mg/ml Kollagenase und 0,05 mg/ml DNase Lösung in die Milzen injiziert, die Milzen mit einem Skalpell mehrere Male inzisiert und in der Kollagenase-DNase Mischung für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde mit einem 40 µm Zellsieb eine Einzelzellsuspension hergestellt und Erythrozyten mittels 3-minütiger Inkubation in Erylyse-Puffer entfernt. Die so gewonnenen Splenozyten wurden gewaschen und in T-Zellmedium für weitere Experimente gelöst.

2.2.3 Herstellung von Organlysaten

Zur Bestimmung des CCL22-Levels in den Organen von Mäusen, wurden diese entnommen und lysiert. Der Proteingehalt wurde mit dem Bradford Test bestimmt und die enthaltene Zytokinkonzentration, welche mit der ELISA Technik gemessen wurde, auf das Gesamtprotein normiert.

2.2.3.1 Herstellung von Organlysaten aus Splenozyten-Einzelzellsuspensionen

Splenozyten wurden wie oben beschrieben gewonnen und in einem Eppendorf Röhrchen bei 400 g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich abgenommen und das zurückbleibende Pellet in 15 – 25 μ l Bio-Rad Zellyse-Puffer gelöst. Das Zellysat wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen mehrmals mit dem Vortex gemischt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 13000 g und 4° C wurden die Überstände abgenommen und als Zellysat bei -80° C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von Organlysaten aus Lymphknoten und Tumor

Nach Töten der Mäuse wurden Tumor und inguinale und axilläre Lymphknoten entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Organe wurden mit einem gekühlten Mörser pulverisiert und in Eppendorf Röhrchen überführt. Entsprechend der Menge an pulverisiertem Organ wurden 15 bis 80 μ l Bio-Rad Zellyse-Puffer zugefügt, so dass eine visköse Lösung entstand. Diese wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und während der Inkubation mehrere Male gevortext. Nach Zentrifugation bei 13000 g und 4° C für 30 Minuten wurden die Überstände abgenommen und als Organlysate bei -80° C gelagert.

2.2.4 *In-vivo*-Tumormodelle

Für Maus-Tumormodelle wurden die adhärenen Tumorzellen mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und dreimal in PBS gewaschen um FBS-Reste zu entfernen. Daraufhin wurden sie vereinzelt und mit der Trypanblau Exklusionstechnik gezählt. 250.000 bis 1 Million Tumorzellen wurden in 100 μ l PBS gelöst und den Mäusen subkutan in die Flanke injiziert.

Das Tumorstadium wurde jeden zweiten Tag gemessen und die Mäuse bei einer Tumorstadium von 120 mm² getötet. Die Tumoren wurden nach Entnahme gewogen

und dann zusammen mit den Organen wie oben beschrieben lysiert und analysiert. Folgende Tumormodelle wurden in der Arbeit verwendet:

Tumormodell	Mauslinie
B16 Melanom	C57BL/6
CT26 Kolonkarzinom	balb/c
MC38 kolorektales Karzinom	C57BL/6
pancO2 Pankreaskarzinom	C57BL/6
4T1 Mammakarzinom	balb/c

Zur Überprüfung des Einflusses eines systemisch erhöhten CCL22-Spiegels auf das Tumorwachstum wurde in einem CT26 Tumormodell einer Gruppe (n = 5) tumortragender Mäuse jeden zweiten Tag 3 µg rekombinantes CCL22 in 100 µl PBS subkutan injiziert. Das Tumorwachstum wurde im 48-Stunden-Intervall im Vergleich zu tumortragenden Mäusen ohne CCL22-Injektion gemessen.

2.3 Zelluläre Methoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte bei 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % CO₂-Luftgemisch in Begasungsbrutschränken. Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurde der Trypanblau-Exklusionstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, während tote Zellen ihn

aufnehmen und sich blau anfärben. Die Zellzahl wurde unter adäquater Verdünnung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und folgenderweise berechnet:

Zellen / ml = Zellzahl in einer Kammer x Verdünnungsfaktor x 10.000

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vor dem Einfrieren wurden je 5 – 10 Millionen Zellen in Kryo-Röhrchen in 900 μ l FBS gelöst und 100 μ l DMSO zugefügt. Daraufhin wurden die Zellen zunächst auf -80° C gekühlt und nach 24 h in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem Stickstoff entnommen und schnellstmöglich in 37° C warmem Medium gelöst. Die Zellen wurden gewaschen, gezählt und dann wiederum in adäquater Verdünnung in Medium gelöst und kultiviert.

2.3.4 Kultivierung von Tumorzellen

Tumorzellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und regelmäßig im Lichtmikroskop auf Zeichen von Zelltod oder mikrobieller Infektion untersucht. Entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurde das Medium ausgewechselt oder die Zellen in frische Zellkulturflaschen überführt. Vor dem Umsetzen wurden die Zellen mit einer Lösung aus Trypsin und 0,02 % EDTA gelöst, gewaschen und in frischem Medium gelöst. Die Infektion mit Mikroorganismen wurde durch Testung der Zelllinien ausgeschlossen.

2.3.5 Herstellung von Tumorzelllysaten

Die adhärennten Tumorzellen wurden mit Trypsin gelöst und 5 Millionen Tumorzellen pro Milliliter in Medium suspendiert. Durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem

Stickstoff und darauffolgendes Auftauen bei 37° C wurden die Tumorzellen lysiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Lysate auf vollständige Lyse kontrolliert.

2.3.6 Gewinnung und Kultivierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die venöse Blutentnahme erfolgte in 50 ml Spritzen, welche zuvor mit 250 IE Heparin versetzt wurden. Je 25 ml Blut wurden mit 20 ml sterilem 0,9%igen Natriumchlorid verdünnt und 30 ml des verdünnten Blutes auf 15 ml Biocoll Separating Solution aufgetropft. Die Schicht mononukleärer Zellen des peripheren Blutes war nach 20-minütiger Zentrifugation bei 1000 g und 20° C, während derer die Bremse der Zentrifuge auf 1 heruntergestellt war, sichtbar und wurde in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt. Nach dreimaligem Waschen in 0,9 %igem Natriumchlorid wurden die Zellen in humanem T-Zell-Medium gelöst und weiter kultiviert oder für spätere Experimente in Kryo-Medium eingefroren.

2.3.7 Kokultivierung von Tumor- und Immunzellen

Für die Kokultur wurden 50 μ l pro Well einer Suspension (4 Mio/ml) aus murinen Splenozyten oder humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes in Medium in einer 96-Well-Platte ausgesät. 150 μ l einer Tumorzellsuspension (0,3 Mio/ml), von zellfreiem Kulturüberstand der Tumorzellen oder Medium wurden zugefügt. Die Gewinnung des Tumorzellüberstands erfolgte nach 48- bis 72-stündiger Kultur von 5 Millionen Tumorzellen in 25 ml Medium. Der Überstand wurde bei 400 g für 7 Minuten zentrifugiert und anschließend durch ein 0,2 μ m Sieb steril filtriert.

Die Kokulturen wurden für 24, 48 oder 72 h im Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach Zentrifugation bei 400 g für 7 Minuten wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinkonzentrationen mit dem ELISA gemessen. Für die Untersuchung der mRNA wurde RNA aus Splenozyten und mononukleären Zellen extrahiert,

mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben und mit der *real-time*-PCR quantifiziert.

2.3.8 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels MACS (*magnetic-activated cell sorting*)

Die magnetische Zellsortierung (MACS) ist eine Technik, die die Aufreinigung von lebenden und funktionell aktiven Zellen erlaubt. Zellen werden für eine gewisse Zeit mit paramagnetischen Mikropartikeln inkubiert, welche an spezifische Oberflächenantigene der Zellen binden. Die so markierten Zellen werden gewaschen und daraufhin durch eine Säule geleitet, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Magnetgebundene Zellen werden in der Säule zurückgehalten, während ungebundene Zellen durch die Säule fließen. Auf diese Weise lassen sich Zellen positiv und negativ aufreinigen. Bei der Positivsortierung wird die gesuchte Zellpopulation mit den antigenspezifischen Magnetpartikeln gebunden und verbleibt in der Säule. Werden alle Zellen außer der gesuchten Zellen mit magnetisch gebunden und die aufzureinigenden Zellen befinden sich im Durchfluss, so spricht man von Negativsortierung. Nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld können die markierten Zellen aus der Säule ausgewaschen werden. Sowohl die gebundene Zellpopulation als auch die durchgelaufenen Zellen lassen sich anschließend in Kultur nehmen.

Für die Aufreinigung von dendritischen Zellen wurden Splenozyten mit magnetischen CD11c Mikropartikeln inkubiert, gewaschen und in der Trennsäule aufgetrennt. Für eine maximale Anreicherung an dendritischen Zellen wurde die durchgelaufene Zellpopulation auf eine zweite Trennsäule gegeben. Die Aufreinigung wurde mittels CD11c-Durchflusszytometrie überprüft.

Die magnetische Zellsortierung erfolgte mit den Kits von Miltenyi Biotec und nach den Herstellerprotokollen.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Die Konzentrationen von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden mit Hilfe von ultrasensitiven *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) bestimmt. Bei dieser Methode werden Antigene detektiert, indem sie an antigen-spezifische Antikörper gebunden werden, welche an eine Platte angeheftet sind. Nach dem Abwaschen unspezifischer Antigene wird ein zweiter spezifischer Antikörper hinzugefügt, welcher an ein Enzym gebunden ist. Nach der Inkubationszeit werden wiederum die ungebundenen Antikörper abgewaschen und das Enzym-Substrat wird zugegeben. Wo antikörper-gebundenes Enzym vorhanden ist wird das farblose Substrat in eine lichtemittierende Form umgewandelt. Die Farbintensität, welche mit dem ELISA-Reader gemessen wird, ist proportional zur Antigenmenge. Die exakte Konzentration kann mittels einer Standardreihe bereits bekannter Konzentration berechnet werden.

In dieser Arbeit wurden die Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen mit kommerziell erwerblichen ELISA-Kits gemessen. Platten wurden über Nacht mit einem monoklonalen, für das gesuchte Antigen spezifischen Antikörper beschichtet und am nächsten Tag mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden die Platten für mindestens eine Stunde in ELISA-Verdünnungspuffer inkubiert um nicht antikörperbeschichtete Stellen zu blockieren. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Standardreihe und die Proben in adäquaten Verdünnungen zugefügt. Die Verdünnung von Zellkulturüberständen erfolgte mit dem jeweiligen ELISA-Verdünnungspuffer, Organlysate wurden mit Eselserum verdünnt. Nach Inkubation wurden die Platten gewaschen und ein zweiter, biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Peroxidase zugegeben. Nach ausgiebigem Waschen wurde das Substrat zugefügt, welches durch das Biotin-gebundene Enzym Streptavidin-Peroxidase in eine farbemittierende Form umgewandelt wird. Die Lichtintensität wurde bei 450 nm mit dem Mithras Platten-Leser gemessen und die exakten Konzentrationen mit Hilfe der Standardgeraden berechnet.

2.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch *fluorescence-activated cell sorting* (FACS), ist eine Methode zum Zählen und Sortieren von Zellen nach ihrem Phänotyp. Die Zellen werden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene markiert, in eine Kapillare eingesaugt und passieren dann einzeln in hoher Geschwindigkeit einen Laserstrahl.

Bei der Passage des Laserstrahls kann einerseits das Streulicht gemessen werden. Zellen, die am Laserstrahl vorbeigeleitet werden streuen das Licht des Laserstrahls, wobei Vorwärtsstreulicht und senkrecht zum Laserstrahl stehendes Seitwärtsstreulicht entstehen. Das Vorwärtsstreulicht hängt vor allem von der Größe der Zelle ab, wohingegen das Seitwärtsstreulicht umso größer ist, je höher die Granularität der Zelle ist. Durch das Streulicht kann ein Gate erstellt werden, welches die gewünschte Zellpopulation (z.B. Lymphozyten) enthält. Andererseits wird beim Kreuzen des Laserstrahls der zellgebundene Fluoreszenzfarbstoff angeregt und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch eine Linse gebündelt, in verschiedene Wellenlängengebiete aufgetrennt und daraufhin von mehreren Detektoren gemessen. Jeder Farbstoff hat sein Anregungs- und Emissionsmaximum bei einer bestimmten Wellenlänge. So können verschiedene Farbstoffe zur gleichen Zeit getrennt gemessen werden.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie mit dem FACSCanto II Durchflusszytometer durchgeführt, welcher Laser in drei Wellenlängen besitzt – violett (405 nm), blau (488 nm) und rot (633 nm). Für jeden Laser stehen mindestens zwei Detektoren zur Verfügung, wodurch bis zu acht Farben gleichzeitig gemessen werden können.

Für die Messung von Oberflächenantigenen wurden 1×10^6 bis 2×10^6 Zellen in Einzelzellsuspension in PBS mit 2% FBS gebracht. $0,5 \mu\text{l/ml}$ der fluorochrom-konjugierten Antikörper wurden zugegeben und die Zellen mit den Antikörpern für 25 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in PBS + 2 % FBS resuspendiert und im Zytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Messung von Proteinkonzentrationen erfolgte kolorimetrisch mit dem Bio-Rad Protein Assay. Dieser basiert auf der Bradford-Methode, bei welcher eine saure Lösung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue G250 zur Proteinlösung gegeben wird. Durch die Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm auf 595 nm. Nach spektrometrischer Messung kann die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Standardkurve berechnet werden.

Für den Bradford Test von Organlysaten wurden die Lysate 1:100 mit PBS verdünnt. Duplikate der Standardreihe und der verdünnten Lysate wurden in eine 96-Well Platte pipettiert und die Bio-Rad Reagenzien für den Protein Assay wurden nach Protokoll zugegeben. Die Messung erfolgte bei 750 nm mit dem Mithras Plattenleser. Die exakte Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Standardreihe aus Verdünnungen einer BSA Stocklösung bekannter Konzentration berechnet.

2.5.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus Zellkulturüberständen erfolgte mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese. Bei dieser Methode werden Proteinlösungen auf ein Gel aufgetragen, welches als Trennmatrix fungiert. Nach Einbringen des Gels in ein elektrisches Feld wandern die Proteine von der negativen Katode in Richtung der positiven Anode durch die Gelmatrix. Kleinere Proteine wandern weiter auf die Anode zu während größere Proteine in Nähe der Katode im Gel hängen bleiben.

In dieser Arbeit wurden 10 – 15 %ige SDS Polyacrylamid Gele hergestellt. Die Überstände wurden mit reduzierendem Lämmli-Puffer verdünnt und für 25 Minuten bei 95° C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 – 25 μ l der Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Zur Kontrolle wurde die

vorgefärbte Proteinleiter SDS PageRuler von Fermentas aufgetragen, welche zehn Banden von 10 kD bis 170 kD markiert. Das Gel wurde an eine Stromquelle angeschlossen und die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke 30 – 40 mA und nicht begrenztem Spannungswert.

2.5.3 Anfärben von Proteinbanden

Das Anfärben der Proteinbanden im SDS Gel erfolgte mit der Silberfärbung. Hierbei werden die Proteine zunächst mit einer Fixierlösung im Gel denaturiert und können so nicht mehr weiterwandern. Nach mehrmaligem Waschen wird das Gel in Silbernitrat inkubiert. So lagern sich Silberionen an die Proteine im Gel an. Durch Zugabe von Formaldehyd werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert und färben so die Proteinbanden schwarz an. Die Silberfärbung bietet eine weitaus höhere Sensitivität als die weit verbreitete Coomassiefärbung. So kann bereits eine 1 ng Protein Bande angefärbt werden.

Für die Silberfärbung wurde das SilverSNAP Kit von Pierce nach Protokoll verwendet. Das Gel wurde nach der Elektrophorese zweimal in ultrareinem Wasser gewaschen und daraufhin in Fixierlösung inkubiert. Nach je zweimaligem Waschen in Ethanol-Waschpuffer und ultrareinem Wasser wurde das Gel für eine Minute in Sensitizer-Lösung inkubiert. Daraufhin wurde wiederum gewaschen und die Silbernitratlösung auf das Gel gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde das Gel extensiv gewaschen und die Formaldehyd-haltige Entwicklungslösung zugegeben. Sobald die Proteinbanden ausreichend ausgeprägt waren wurde mit 5 % Essigsäure abgestoppt und die Banden abgelesen.

2.5.4 Extraktion zytoplasmatischer RNA

Die Extraktion zytoplasmatischer RNA erfolgte mit Trizol Reagenz. Die Zellen werden hierbei in Trizol suspendiert, was zur Lyse der Zellen und ihrer Zellkomponenten führt. Die RNA-Integrität bleibt jedoch erhalten. Durch Zugabe von

Chloroform und Zentrifugation wird die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase aufgetrennt. Die RNA befindet sich in der wässrigen Phase. Zugabe von 100 % Isopropyl-Alkohol zur wässrigen Phase führt zur Ausfällung der RNA.

Zur RNA-Isolation wurden 5 bis 10×10^6 Zellen in 1 ml Trizol gelöst. 200 μ l Chloroform wurden zugegeben, gut untergemischt und die Lösung bei 12000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die daraufhin sichtbare wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt und die RNA mit Isopropanol ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation war das RNA Pellet am Boden des Eppendorf-Röhrchens sichtbar und konnte mit 75 % Ethanol gewaschen werden. Nach Zentrifugation bei 7500 g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen, das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 20 bis 40 μ l ultrareinem, RNase-freiem Wasser gelöst. Nach Inkubation bei 56° C für 10 Minuten wurden die RNA-Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt.

Sämtliche Arbeiten wurden mit RNase-freien Materialien durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde entweder als Pellet in 75 % Ethanol bei -80° C gelagert oder im gelösten Zustand direkt zur reversen Transkription weiterverwendet.

2.5.5 Reverse Transkription

Um die RNA in der Polymerase Kettenreaktion zu amplifizieren, muss sie in einen *copy*-DNA (cDNA) Einzelstrang umgeschrieben werden. Die reverse Transkription wurde mit dem Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt.

Der Reaktionsansatz für eine Probe enthielt laut Protokoll

- 4 μ l 5x Reaction Buffer
- 1 μ l 20 U/ μ l RNase Inhibitor
- 2 μ l 10 mM dNTP Mix
- 1 μ l 200 U/ μ l Reverse Transkriptase

1 bis 5 μg der extrahierten RNA in 11 μl sterilem Wasser und 1 μl Oligo-dT-Primer wurden pro Probe hinzugefügt und für 60 Minuten bei 42°C im Thermocycler T3 inkubiert. Die Reaktion wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 70° C gestoppt. Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -80° C gelagert.

2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion

2.5.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch, zum Beispiel aus Zellen extrahierte DNA oder aus mRNA umgeschriebene cDNA. Die gewünschte DNA-Matrix, auch *template* genannt, wird mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfältigt. Hierfür werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotidprimer benötigt, welche homolog zu den Enden des *templates* sind. Die Reaktion verläuft daraufhin in 3 Schritten:

1. Denaturierung: Auftrennung doppelsträngiger DNA, Denaturierung der DNA
2. Primerhybridisierung: Anlagerung der Primer an die homologe DNA
3. Elongation: Die fehlenden Stücke zwischen den Primern werden von der DNA-Polymerase aufgefüllt.

Die so synthetisierten DNA-Fragmente können im nächsten Zyklus als Matrix für Primer dienen. So ist in den darauf folgenden Amplifikationsrunden eine exponentielle Anreicherung der gewünschten DNA-Sequenz möglich. Für die PCR wurde der LightCycler 480 von Roche verwendet.

2.5.6.2 Quantitative real-time PCR

Die quantitative *real-time* PCR ist eine Methode, die die Quantifizierung der in der PCR entstandenen DNA-Fragmente erlaubt. Dies erfolgt mit Hydrolyse-Sonden, welche an ihrem einen Ende einen Quencher und an ihrem anderen Ende einen Reporterfluorophor markiert sind. Während der Amplifikation schneidet die Taq-Polymerase die Sonde und trennt so den Reporter vom Quencher. Durch die Entfernung des Quenchers steigt die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Diese wird am Ende jedes Zyklus gemessen und mit dem jeweiligen Amplifikationszyklus abgeglichen. Um die spezifische mRNA-Expression des gesuchten Gens zu quantifizieren, wird die Anzahl an Kopien des gesuchten Gens ins Verhältnis gesetzt zu den Transkripten eines Referenzgen. Dieses Referenzgen ist ein ubiquitär verbreitetes, konstitutiv exprimiertes Gen, welches durch die Versuchskonditionen nicht beeinflusst wird. In dieser Arbeit wurde als Referenzgen Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet, ein Enzym des Purin-Stoffwechsels.

Für die *real-time* PCR wurde der LightCycler 480 Probes Master von Roche benutzt. Der Reaktionsansatz enthielt entsprechend dem Protokoll pro Probe:

3,5 μ l DEPC-behandeltes Wasser

0,2 μ l Primer *sense*

0,2 μ l Primer *antisense*

5,0 μ l Probes Master

0,1 μ l Sonde

9 μ l des Reaktionsgemisches und 1 μ l cDNA wurden pro Well in die LightCycler Platte pipettiert, kurz bei 2500 g zentrifugiert und dann im LightCycler 480 amplifiziert und analysiert. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen.

Die Primer wurden entsprechend des Roche Universal ProbeLibrary Assay Design Centers entwickelt und die entsprechenden Hydrolyse-Sonden aus dem Universal ProbeLibrary Set verwendet.

2.6 Immunhistologie

Gewebeschnitte der Leber von 101 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden für die histologische Analyse genutzt. Alle Schnitte entstammten dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München und die immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen CCL22 und gegen FoxP3 wurde nach Standardprotokollen durch das Pathologische Institut durchgeführt. Zur Bestimmung der Anzahl infiltrierender CCL22-positiver und FoxP3-positiver Zellen wurde die gesamte Präparatoberfläche unter dem Lichtmikroskop analysiert. Das folgende semiquantitative Auszählssystem wurde gewählt:

- 0 keine infiltrierenden Zellen
- + einzelne infiltrierende Zellen
- ++ wenige infiltrierende Zellen
- +++ mittlere Anzahl infiltrierender Zellen
- ++++ viele infiltrierende Zellen

Zur genaueren örtlichen Differenzierung der Infiltration durch CCL22-positive und FoxP3-positive Zellen wurden die Gewebeschnitte der Leber nach histomorphologischen Gesichtspunkten in folgende Bereiche eingeteilt: Tumor, peritumorales Stroma, Leberepithel, Leberstroma. Die Abbildungen der histologischen Schnitte wurden in 20-facher und 40-facher Vergrößerung aufgenommen, Kontrast und Größe wurden anschließend mit dem Adobe Photoshop angeglichen.

Die statistische Korrelation zwischen der histologisch quantifizierten Infiltration und dem Überleben der Patienten wurde von Herrn Dr. Enrico de Toni aus der Arbeitsgruppe für chronische Lebererkrankungen des Klinikums der Universität München analysiert. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte hierbei mittels Chi-Quadrat Test mit der SPSS-Software.

2.7 Dialyse

Die Dialyse von Zellkulturüberständen erfolgte mit den Slide-A-Lyzer G2 Dialysenkassetten von Thermo Scientific und mit den Float-A-Lyzer Dialyseröhrchen von Spectrumlabs.

Vor der Dialyse wurden die Kassetten für 2 Minuten im Dialysepuffer schwimmen gelassen, um die Membranen zu befeuchten. Dann wurde pro Kassette 2,5 ml FBS-freier Überstand in die Kassette gegeben und die Kassetten wurden über Nacht in Dialysepuffer bei 4° C mit einem Magnetrührer inkubiert. Die Float-A-Lyzer Tubes wurden vor der Dialyse 30 Minuten in destilliertes Wasser gelegt, dann mit dem Dialysepuffer gespült. In jedes Dialyseröhrchen wurden 5 ml FBS-freier Zellkulturüberstand pipettiert und die Röhrchen dann zur Dialyse in Dialysepuffer über Nacht bei 4° C mit Magnetrührer inkubiert.

Als Dialysepuffer wurden entweder 50 bis 500 ml OptiMEM oder 3 l PBS bzw. ultrareines Wasser verwendet. Die Dialysenkassetten wurden in den Größen 2 kD, 7 kD, 10 kD und 20 kD verwendet, die Float-A-Lyzer-Röhrchen in den Größen 100-500 D, 500-1000 D, 20 kD, 50 kD und 100 kD. Am nächsten Tag wurde der Überstand aus der Kassette bzw. dem Röhrchen entnommen, mit einem 0,2 µm Spritzenaufsatz steril filtriert und mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes kultiviert.

2.8 Statistische Analyse

In dieser Arbeit wurden bei multiplen Experimenten die Werte als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung als Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean SEM*) dargestellt ist. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen Student-t-Test für gepaarte Stichproben oder dem einseitigen Anova-Test mit Bonferroni-Korrektur. Statistische Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ und mit den Markierungen *, ** und *** gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem

Programm GraphPad Prism. Die mathematische Analyse und die graphische Darstellung erfolgten mit GraphPad Prism, Microsoft Office Excel und Adobe Illustrator.

3 ERGEBNISSE

3.1 Tumortragende Mäuse haben systemisch erhöhte CCL22-Spiegel

3.1.1 CCL22 in murinen Tumoren

Im Jahr 2004 fanden Curiel und seine Gruppe erhöhte CCL22-Werte im malignen Aszites von Ovariakarzinom-Patientinnen. Dies führte laut ihrer Ergebnisse zu einer vermehrten Rekrutierung von CCR4-positiven regulatorischen T-Zellen und damit zu einer verschlechterten klinischen Prognose [Curiel et al. 2004]. Seither wurde in vielen weiteren Tumorentitäten intratumorales CCL22 gefunden, so beispielsweise im humanen Glioblastom [Jacobs et al. 2010], Magenkarzinom [Mizukami et al. 2008], Ösophaguskarzinom [Maruyama et al. 2010] und kolorektalen Adenokarzinom [Wagsater et al. 2008]. Die Bedeutung des Chemokins für das Tumorstadium ist jedoch bisher noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit wurden zunächst die in unserem Labor verwendeten murinen Tumormodelle auf CCL22-Expression untersucht. Gesunden Mäusen wurden hierfür subkutane Tumoren gesetzt, welche bei adäquater Größe wieder entnommen und auf ihren CCL22-Gehalt untersucht wurden. Es wurden Tumoren verschiedener Mausstämmen untersucht: die balb/c-Tumormodelle CT26 (kolorektales Karzinom) und 4T1 (Mammakarzinom) und die C57BL/6-Modelle pancO2 (Pankreaskarzinom), MC38 (kolorektales Karzinom) und B16 (Melanom) wurden mittels ELISA auf intratumorales CCL22 analysiert. Intratumorale CCL22-Expression wurde in jedem dieser Tumormodelle gefunden, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration. Die höchsten CCL22-Konzentrationen wurden im Lysat von pancO2-Tumoren gefunden (Abb. 3.1).

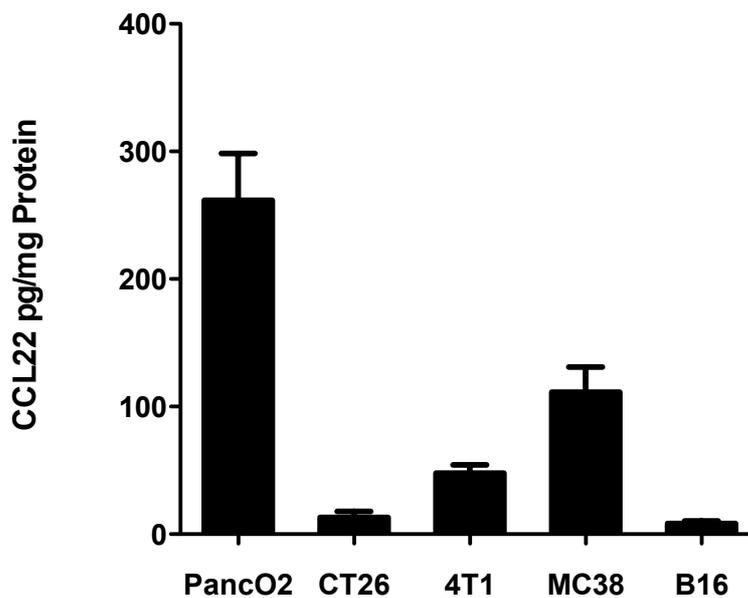


Abb. 3.1 CCL22-Spiegel in murinen soliden Tumoren.

Die subkutanen Tumoren wurden reseziert und lysiert. Die Proteinkonzentrationen in den Tumorlysaten wurden durch den Bradford Assay bestimmt. CCL22-Spiegel wurden mittels ELISA gemessen und auf die Proteinkonzentration normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM für sieben (pancO2), acht (CT26) und fünf (4T1, MC38, B16) Mäuse.

3.1.2 Subkutane Tumoren führen zur CCL22-Hochregulation auf Protein- und mRNA-Ebene

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die CCL22-Produktion auf den Tumor selbst beschränkt ist, oder ob auch in den lymphatischen Geweben und im Serum der Maus eine Hochregulation des Chemokins erfolgt. Für die folgenden Experimente wurden das 4T1 und das pancO2 Tumormodell ausgewählt, da sie die Tumormodelle mit den jeweils höchsten intratumoralen CCL22-Konzentrationen in ihrer jeweiligen Mauslinie waren. Das 4T1 Brustkrebsmodell ist ein sehr physiologisches Tumormodell auf balb/c Hintergrund, welches ein dem humanen Mammakarzinom ähnliches Metastasierungsverhalten vorweist [Lelekakis et al. 1999]. Das pancO2 Tumormodell ist ein Pankreas-Adenokarzinom auf C57BL/6 Hintergrund. Den Mäusen wurden subkutane Tumoren aus diesen Zelllinien gesetzt. Sobald eine ausreichende Tumorgroße erreicht war wurde den Mäusen Blut für die

Serumuntersuchung entnommen. Daraufhin wurden die Mäuse getötet und Lymphknoten und Milzen entnommen. Die Proteinkonzentrationen in Serum und Splenozytenlysat wurden mittels ELISA bestimmt. Mittels reverser Transkription und quantitativer *real-time* PCR wurde des Weiteren die CCL22 mRNA mit HPRT als Referenzgen in Lymphknoten und Splenozyten quantifiziert. Das 4T1 Mammakarzinommodell ist bekannt für eine starke Metastasierungstendenz. Da in den Milzen 4T1-Tumortragender Mäuse bereits makroskopisch Metastasen zu erkennen waren, erschien es uns richtig, nicht HPRT als Referenzgen in der *rt*-PCR zu verwenden, da dies durch Einschluss der Tumorzellen in die Analyse zu verfälschten Ergebnissen führen konnte. Für die Analyse der CCL22-mRNA-Hochregulation in Splenozyten wurde daher beim 4T1 Modell der Oberflächenmarker für dendritische Zellen, CD11c, als Referenzgen benutzt. Es wurden jeweils 4T1-Tumor tragende Mäuse mit tumorfreien balb/c-Mäusen und pancO2-Tumor tragende Mäuse mit tumorfreien C57BL/6-Mäusen verglichen.

Interessanterweise führten beide Tumormodelle zum gleichen Ergebnis: Mäuse, die einen subkutanen 4T1- bzw. pancO2-Tumor trugen, zeigten eine deutliche Hochregulation von CCL22 in Splenozyten, welche sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gezeigt wurde (Abb. 3.2 A und B). Auch in den Lymphknoten tumortragender Mäuse konnte eine Hochregulation von CCL22-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.2. C). Des Weiteren ließen sich bei beiden Tumormodellen deutlich erhöhte Serum-CCL22-Spiegel nachweisen, was einer systemischen CCL22-Hochregulation entspricht (Abb. 3.2 D).

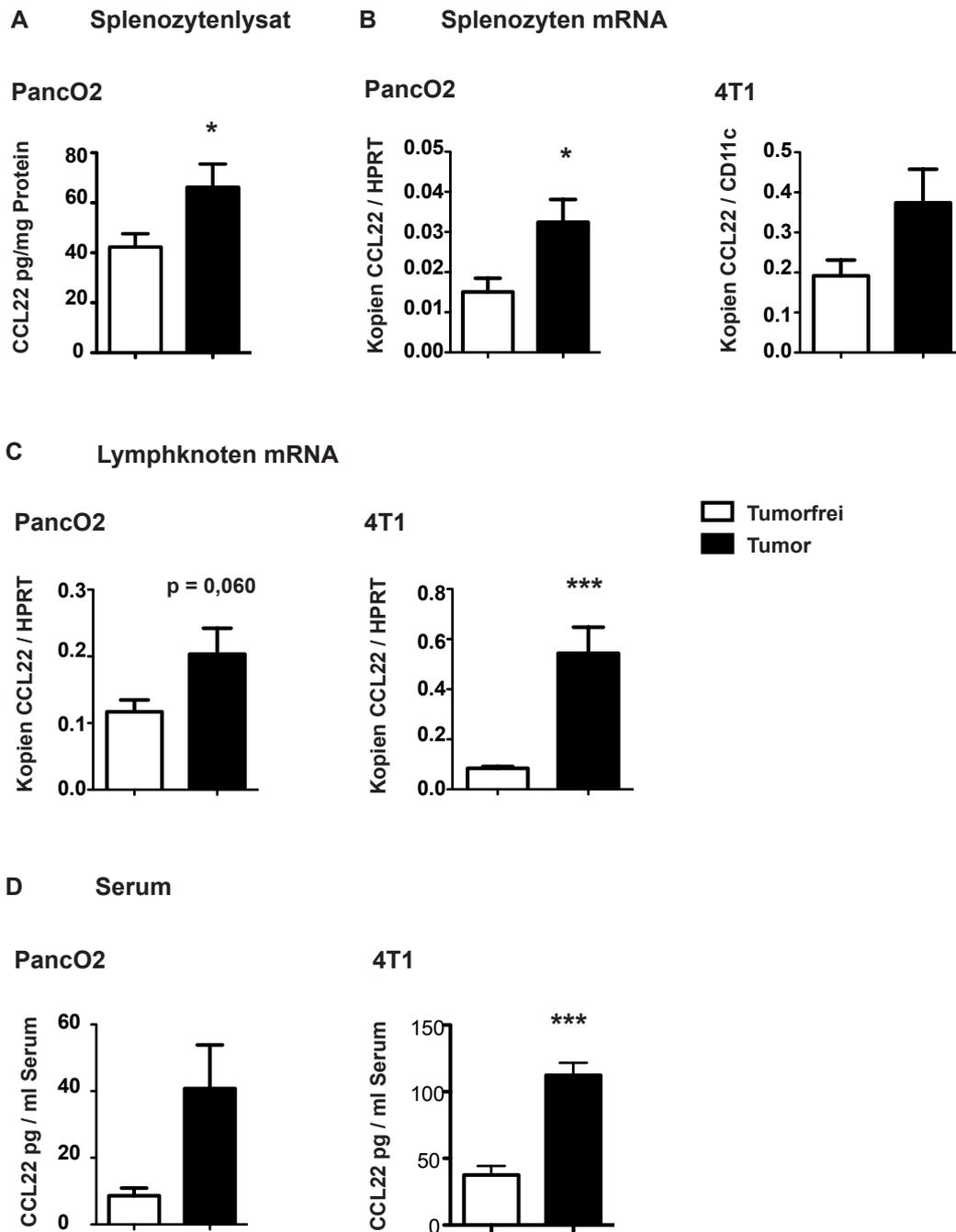


Abb. 3.2 CCL22-Hochregulation in tumortragenden Mäusen.

Tumortragenden und tumorfreien Mäusen wurden Serum, Milz und Lymphknoten entnommen. **(A, D)** Die Messung der CCL22-Konzentration in Serum und Splenozytenlysat erfolgte mittels ELISA. **(B, C)** RNA wurde aus Splenozyten- und Lymphknoten-Einzelsuspensionen extrahiert und mit reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Menge an CCL22-mRNA wurde daraufhin in der *real-time*-PCR bestimmt, wobei HPRT als Referenzgen diente. Angezeigt sind die Mittelwerte + SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$. **(A)** CCL22-Konzentration normalisiert auf den Gesamtproteingehalt im Splenozyten-Lysat pancO2-Tumor tragender Mäuse im Vergleich zu tumorfreien C57BL/6 Mäusen. Die Proteinkonzentration in den Splenozytenlysaten wurde mit dem Bradford Test bestimmt. $n = 14$ (tumorfrei); $n = 18$ (Tumor). **(B)** CCL22-mRNA in Splenozyten tumortragender Mäuse im Vergleich zu tumorfreien Mäusen (pancO2 jeweils $n = 6$; 4T1 jeweils $n = 5$). Aufgrund makroskopisch sichtbarer Metastasierung der 4T1-Tumoren in die Milz wurde hier CD11c als

Referenzgen für die *real-time*-PCR benutzt. (C) CCL22-mRNA in Lymphknoten tumortragender Mäuse im Vergleich zu tumorfreien Mäusen (pancO2 jeweils n = 6; 4T1 jeweils n = 5). (D) CCL22-Level im Serum pancO2-Tumor tragender Mäusen im Vergleich zu tumorfreien C57BL/6 Mäusen (tumorfreie Mäuse n = 4; tumortragende Mäuse n = 7) und im Serum 4T1-Tumor tragender Mäusen im Vergleich zu tumorfreien balb/c Mäusen (jeweils n = 5).

3.2 Erhöhte CCL22-Spiegel korrelieren mit vermehrtem Tumorwachstum

Unsere bisherigen Experimente zeigten einen CCL22-Anstieg sowohl auf mRNA-Ebene in Splenozyten und Lymphknoten als auch auf Proteinebene im Serum und in der Milz tumortragender Mäuse im Vergleich zu tumorfreien Mäusen. Im nächsten Schritt sollte die Bedeutung des systemischen CCL22-Anstiegs in tumortragenden Tieren untersucht werden.

Um den Effekt von CCL22 auf das Tumorwachstum zu untersuchen, nutzten wir das CT26-Tumormodell. Es handelt sich hierbei um ein Kolonkarzinom auf balb/c Hintergrund, welches bei unserer Analyse vergleichsweise niedrige Konzentrationen an CCL22 enthielt (Abb 3.1). Zehn Mäusen wurden subkutane CT26-Tumoren gesetzt. Eine Gruppe von fünf Mäusen erhielt daraufhin alle 48 Stunden $3\mu\text{g}$ rekombinantes CCL22 in subkutanen Injektionen, um eine langsame Resorption und möglichst konstant erhöhte CCL22-Serumwerte zu erhalten. Das Tumorwachstum wurde in beiden Gruppen beobachtet. Bei Erreichen einer adäquaten Tumorgröße wurde das Experiment beendet und Serum, Tumor und Milz wurden zur Analyse des CCL22-Spiegels entnommen.

Es zeigte sich nach zwei Wochen ein signifikant höheres Tumorwachstum bei den Mäusen mit CCL22-Injektionen (Abb. 3.3) und auch das Tumorgewicht war in dieser Gruppe signifikant höher als bei in den unbehandelten Mäusen ($p = 0,0405$; Daten nicht gezeigt). Die Analyse des Serums und des Tumors zeigte wie erwartet bei den mit CCL22 behandelten Mäusen erhöhte Serum-CCL22-Werte und ein erhöhtes CCL22-Level im Tumor (Abb. 3.3). Wir konnten so zeigen, dass erhöhte CCL22-Spiegel in Serum und Tumor zu einem signifikant vermehrten Tumorwachstum

führen. Die zuvor gezeigte Hochregulation von CCL22 in tumortragenden Mäusen scheint also in einem Wachstumsvorteil für den Tumor zu resultieren.

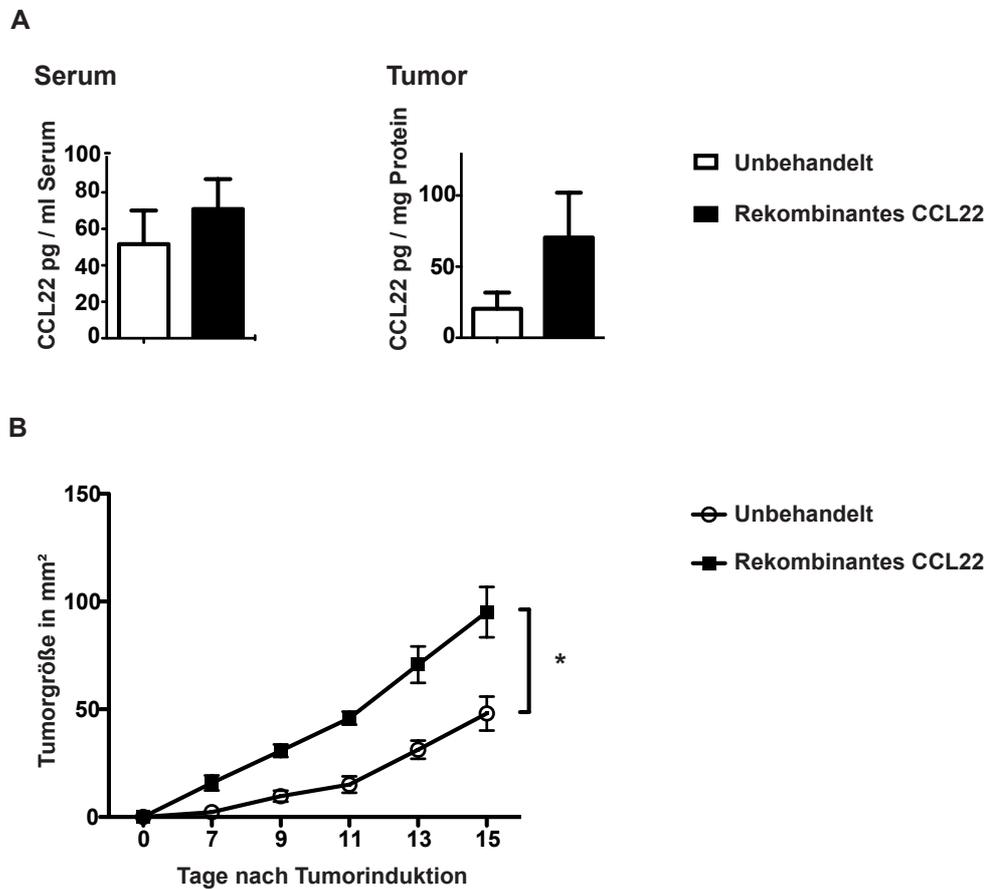


Abb. 3.3 Einfluss erhöhter CCL22-Spiegel auf das Tumorstadium.

CT26-Tumor tragenden balb/c Mäusen wurden im 48-Stunden-Intervall $3\mu\text{g}$ CCL22 subkutan injiziert. Die Tumorstadien wurden jeden zweiten Tag bestimmt. **(A)** Nach dem Töten der Mäuse wurden Tumoren und Serum entnommen. Die CCL22-Konzentration in Serum und Tumorstadien wurde mittels ELISA gemessen. Die Proteinkonzentrationen im Tumorstadien wurde mit dem Bradford Test bestimmt. Angezeigt sind die Mittelwerte + SEM von je 5 individuellen Mäusen. **(B)** Tumorstadium in Mäusen mit und ohne CCL22-Injektionen dargestellt als Tumorstadium in mm^2 aufgetragen über Anzahl der Tage nach Induktion. Angezeigt ist der jeweilige Mittelwert +/- SEM von 5 individuellen Mäusen. * $p < 0,05$.

3.3 Ein von Tumorzellen produziertes Protein führt zur CCL22-Hochregulation in Immunzellen

Die von uns beobachtete CCL22-Hochregulation in Serum und lymphatischem System tumortragender Mäuse resultierte in einem signifikanten Wachstumsvorteil für den Tumor. Daher sollten im nächsten Schritt die Mechanismen der CCL22-Induktion aufgedeckt werden.

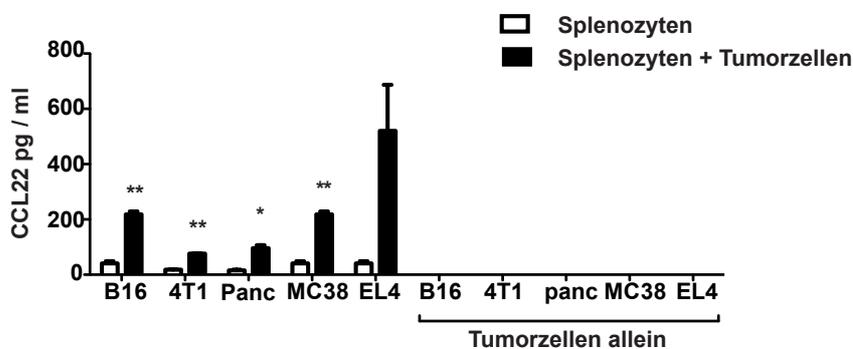
3.3.1 Ein von murinen Tumorzellen produzierter löslicher Faktor führt zur CCL22-Hochregulation in Splenozyten

In einem Kokultur-Ansatz sollte untersucht werden, ob Tumorzellen Einfluss auf die CCL22-Expression durch Splenozyten haben. Durch die Kultur von Splenozyten mit Tumorzellen und deren zellfreiem Überstand sollte weiterhin aufgedeckt werden, ob dieser Einfluss Zellkontakt-abhängig ist. Murine Splenozyten wurden mit verschiedenen Tumorzelllinien kultiviert. Nach 48 h wurden die CCL22-Konzentrationen in den Kokultur-Überständen gemessen. Des Weiteren wurden Splenozyten in zellfreiem Tumorzellüberstand für 48 h kultiviert. Nach Ablauf der 48 h wurde wiederum CCL22 in den Überständen mit dem ELISA bestimmt und RNA aus den Splenozyten extrahiert. Diese wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die Menge an CCL22-mRNA in den Splenozyten mittels *real-time*-PCR (*rt*-PCR) quantifiziert. Die Kokulturen wurden entsprechend der Tumorzelllinie mit Splenozyten aus balb/c oder C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Verwendet wurden die C57BL/6 Tumorzelllinien B16 (Melanom), pancO2 (Pankreaskarzinom), MC38 (kolorektales Karzinom) und EL4 (Lymphom) sowie die 4T1 Mammarkarzinom-Zelllinie auf balb/c Hintergrund.

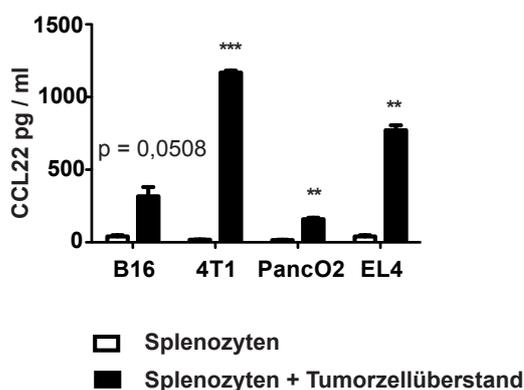
Die in Medium kultivierten Splenozyten zeigten lediglich eine geringe CCL22-Ausschüttung. In der Kokultur mit Tumorzellen kam es jedoch zu einer starken Hochregulation der CCL22-Sekretion durch die Splenozyten. Dieser Effekt war bei allen von uns verwendeten Tumorzelllinien zu beobachten. Im Kulturüberstand von Tumorzellen konnte hingegen kein CCL22 gefunden werden (Abb. 3.4 A). Um zu differenzieren, ob dieser Effekt auf direkten Interaktionen zwischen Tumorzellen und

Splenozyten beruhte oder durch einen löslichen, von Tumorzellen sezernierten Faktor ausgelöst war, wurden Splenozyten im zellfreien Kulturüberstand von Tumorzellen kultiviert. Auch hier zeigte sich eine deutliche CCL22-Induktion durch die Kulturüberstände aller untersuchten Tumorzelllinien (Abb. 3.4 B). Auch auf mRNA-Ebene konnte eine signifikante Induktion von CCL22 in Splenozyten durch den Kulturüberstand von Tumorzellen beobachtet werden (Abb.3.4 C). Da die CCL22-Hochregulation in Splenozyten sowohl durch Tumorzellen als auch durch deren Kulturüberstand ausgelöst werden kann, ist es naheliegend, dass ein von den Tumorzellen produzierter, löslicher Faktor für diesen Effekt verantwortlich ist.

A Splenozyten-Kulturüberstand



B Splenoyten-Kulturüberstand



C Splenozyten mRNA

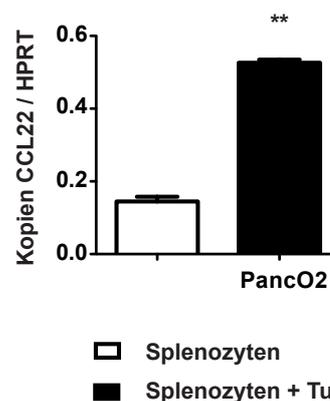


Abb. 3.4 CCL22 in der Kokultur muriner Splenozyten mit Tumorzellen oder deren Kulturüberstand.

(A, B) C57BL/6 (B16, MC38, pancO2, EL4) oder balb/c (4T1) Splenozyten (1 Mio/ml) wurden 48h mit Tumorzellen (250.000/ml) oder in deren zellfreiem Kulturüberstand (= Tumorzellüberstand) kultiviert. CCL22 im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. panc = pancO2. Angezeigt sind Mittelwert + SEM (n = 3). Die Werte sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (C) C57BL/6 Splenozyten (1Mio/ml) wurden für 48h in Kulturüberstand von pancO2 Zellen oder Medium kultiviert. Aus den Splenozyten wurde RNA extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Menge an CCL22-mRNA wurde daraufhin in der *real-time*-PCR quantifiziert, wobei HPRT als Referenzgen diente. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n=3). ** $p < 0,01$.

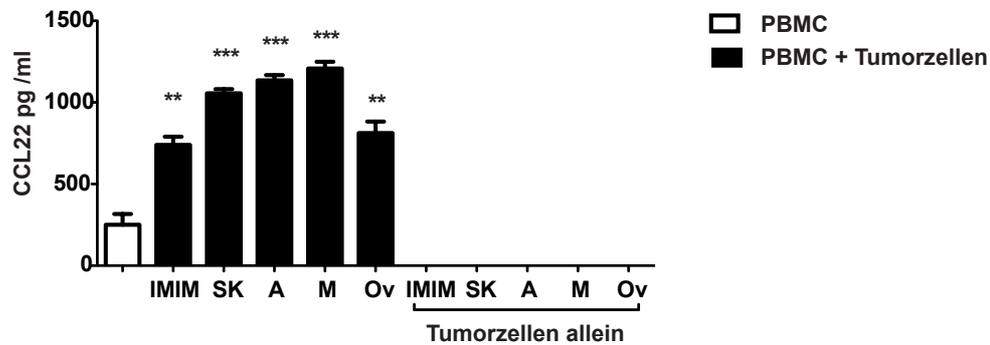
3.3.2 Ein von humanen Tumorzellen produzierter löslicher Faktor führt zur CCL22-Hochregulation in mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Da alle von uns verwendeten murinen Tumorzelllinien zu einer CCL22-Induktion in Splenozyten führten, sollte nun herausgefunden werden, ob auch im humanen System eine Tumorzell-vermittelte CCL22-Hochregulation in Immunzellen beobachtet werden kann.

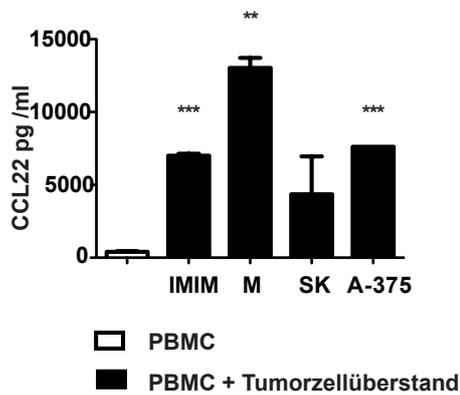
Es wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gewonnen und für 48h mit humanen Tumorzelllinien oder deren zellfreiem Kulturüberstand kultiviert. Verwendet wurden die Tumorzelllinien A-375 (Melanom), MDAMB-231 (Mammakarzinom), SK-Mel23 (Melanom), IMIM (Pankreaskarzinom) und Ovar3 (Ovarialkarzinom). Nach 48 h wurden die Überstände mittels ELISA auf CCL22 untersucht. Des Weiteren wurde RNA aus den in Tumorzell-Kulturüberstand kultivierten PBMC extrahiert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der CCL22-mRNA erfolgte mit der *real-time-PCR*.

Entsprechend der Ergebnisse, die mit murinen Splenozyten erzielt wurden, konnte auch im humanen Ansatz eine signifikante CCL22-Hochregulation in der Kokultur von PBMC mit Tumorzellen beobachtet werden. Vergleichbar mit den murinen Splenozyten wiesen die humanen PBMC eine niedrige Basalsekretion von CCL22 auf. Durch Kultivierung mit Tumorzellen oder in deren zellfreiem Kulturüberstand ließ sich eine signifikante Erhöhung der CCL22-Sekretion durch die PBMC beobachten (Abb. 3.5. A und B). Dieser Effekt konnte auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Abb.3.5 C). Wie schon in den murinen Ansätzen war die CCL22-Induktion bei allen untersuchten humanen Tumorzelllinien zu beobachten, wohingegen keine der Tumorzelllinien selbst CCL22 produzierte (Abb. 3.5 A).

A PBMC-Kulturüberstand



B PBMC-Kulturüberstand



C PBMC-mRNA

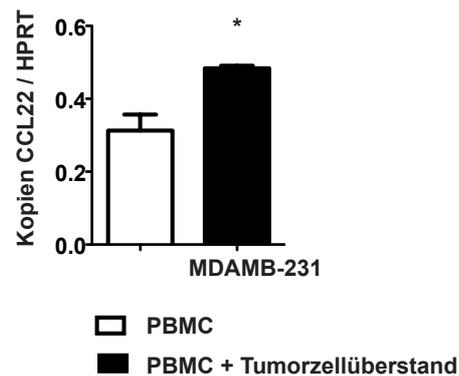


Abb. 3.5 CCL22 in der Kokultur humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mit Tumorzellen oder deren Überstand.

(A,B) Humane PBMC (1 Mio/ml) wurden mit Tumorzellen oder deren zellfreiem Kulturüberstand (= Tumorzellüberstand) kultiviert. Verwendet wurden die humanen Tumorzelllinien IMIM, SK-Mel23 (SK), A-375 (A), MDAMB-231 (M) und Ovar3 (O). Nach 48h wurde CCL22 im Überstand mittels ELISA gemessen. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n = 2). ** p < 0,01; *** p < 0,005. (C) Humane PBMC wurden für 48 h im Kulturüberstand von MDAMB-231 Tumorzellen kultiviert. Nach Extraktion der RNA wurde diese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. CCL22 mRNA wurde mit der *real-time*-PCR bestimmt, wobei HPRT als Referenzgen diente. Angezeigt sind Mittelwerte (n = 3) + SEM. * p < 0,05.

3.3.3 Nicht-maligne Zellen führen zu keiner CCL22-Hochregulation in Immunzellen

Nachdem ausnahmslos alle untersuchten murinen und humanen Tumorzelllinien und deren Überstände zu einer CCL22-Induktion in Immunzellen führten, sollte als nächstes herausgefunden werden, ob dieser Effekt spezifisch für Tumorzellen ist oder auch durch andere schnell wachsende Zelllinien ausgelöst werden kann.

Um dies zu untersuchen, sollten murine Splenozyten und humane PBMC mit einer Zelllinie inkubiert werden, die ein vergleichbares Wachstum wie eine Tumorzelllinie aufweist, jedoch keinen Tumorphintergrund hat. Für die murinen Kulturen wählten wir die DC2.4 Zelllinie. DC2.4 Zellen sind retroviral immortalisierte, unreife dendritische Zellen auf C57BL/6 Hintergrund [Shen et al. 1997]. Für den humanen Ansatz wurden HEK-293 Zellen benutzt, humane embryonale Nierenzellen. Sowohl DC2.4 als auch HEK-293 Zellen zeichnen sich durch ein mit Tumorzellen vergleichbares sehr schnelles Wachstum aus und stellen dadurch eine gute Negativkontrolle für die CCL22-Induktion durch Tumorzellen dar.

Murine C57BL/6 Splenozyten wurden für 48 h mit pancO2 Pankreaskarzinomzellen bzw. der gleichen Anzahl DC2.4 Zellen oder deren zellfreiem Kulturüberstand kultiviert. Dementsprechend wurden humane PBMC mit MDAMB-231-Mammakarzinomzellen bzw. der gleichen Anzahl HEK-Zellen oder in deren zellfreiem Überstand inkubiert. Nach 48 h wurde CCL22 im Überstand mittels ELISA gemessen. Es zeigte sich sowohl im murinen als auch im humanen Ansatz die bereits bekannte Induktion von CCL22 bei der Kultur mit Tumorzellen oder in deren Kulturüberstand. Die Kokultur mit DC2.4-Zellen oder HEK-Zellen führte jedoch nicht zu einer Hochregulation von CCL22. Ebenso war auch in der Kultur von Splenozyten bzw. PBMC in DC2.4- bzw. HEK-Kulturüberstand keine CCL22-Induktion zu beobachten (Abb.3.6). Auch auf mRNA-Ebene konnte keine CCL22-Induktion durch DC2.4- und HEK-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es ist daher davon auszugehen, dass die CCL22-Induktion in Splenozyten und humanen PBMC spezifisch durch Tumorzellen verursacht wird.

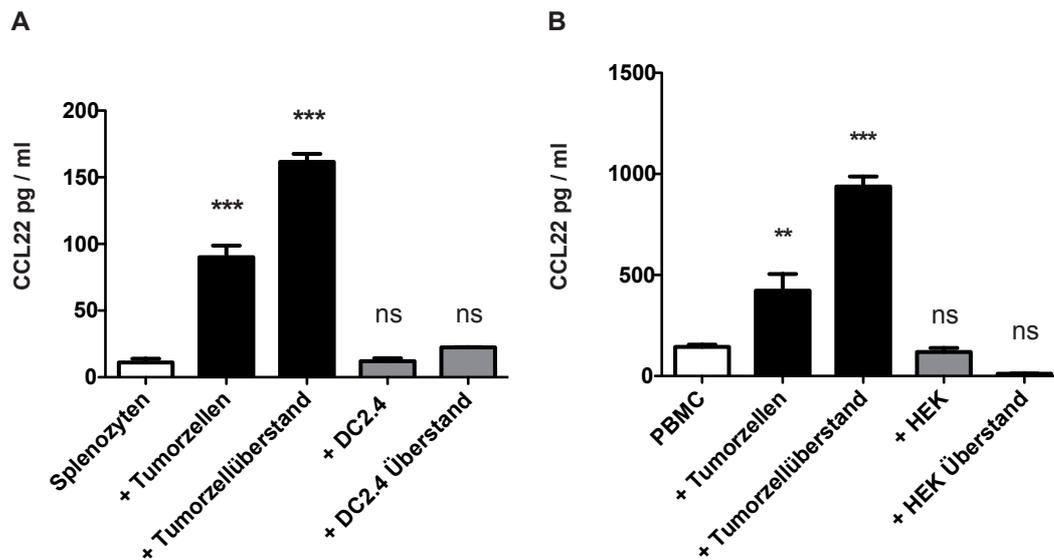


Abb. 3.6 CCL22 in der Kokultur von Immunzellen mit nicht-malignen Zelllinien.

Immunzellen wurden mit Tumorzellen und Zellen ohne Tumorhintergrund oder deren Kulturüberstand für 48h kultiviert. CCL22 im Kulturüberstand wurde im ELISA bestimmt. Angezeigt sind Mittelwert + SEM (n = 3). Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. ** p < 0,01; *** p < 0,005; ns = nicht signifikant. **(A)** C57BL/6 Splenozyten (1 Mio/ml) wurden für 48h mit pancO2-Pankreaskarzinomzellen beziehungsweise DC2.4-Zellen oder in deren zellfreiem Kulturüberstand kultiviert. **(B)** Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, 1Mio/ml) wurden für 48h mit MDAMB-231-Mammakarzinomzellen bzw. humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) oder in zellfreiem Kulturüberstand dieser Zellen kultiviert.

3.3.4 CCL22-Produktion und Hochregulation findet vor allem in dendritischen Zellen statt

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Zellpopulation für die erhöhte CCL22-Ausschüttung verantwortlich sind. Da dendritische Zellen (DC) im gesunden Organismus konstitutiv CCL22 produzieren [Vulcano et al. 2001], sollte hier ihre Rolle in der Tumor-induzierten CCL22-Hochregulation untersucht werden.

Dendritische Zellen wurden aus murinen C57BL/6 Splenozyten mittels magnetischer Sortierung (MACS) auf den Oberflächenmarker CD11c angereichert. CD11c ist ein Integrin, welches von den meisten DC-Subpopulationen exprimiert wird [Shortman and Liu 2002]. Die Reinheit der so erhaltenen dendritischen Zellen wurde mittels

Durchflusszytometrie bestimmt und lag bei 70 % (Abb. 3.7 A). CD11c-Positivfraktion und CD11c-Negativfraktion wurden daraufhin mit B16-Melanomzellen kultiviert. Nach 48h wurde CCL22 im Überstand gemessen. Es zeigte sich eine deutliche Produktion von CCL22 in der CD11c⁺-Fraktion und eine signifikante Hochregulation durch Kokultivierung mit B16-Zellen. In der CD11c-negativen Fraktion hingegen konnte kaum CCL22 nachgewiesen werden und auch durch die Inkubation mit Tumorzellen konnte keine signifikante Induktion von CCL22 erzielt werden (Abb. 3.7 B). CCL22-Produktion und Tumorzell-induzierte CCL22-Hochregulation in murinen Splenozyten finden also vorwiegend in der Fraktion der CD11c⁺ dendritischen Zellen statt.

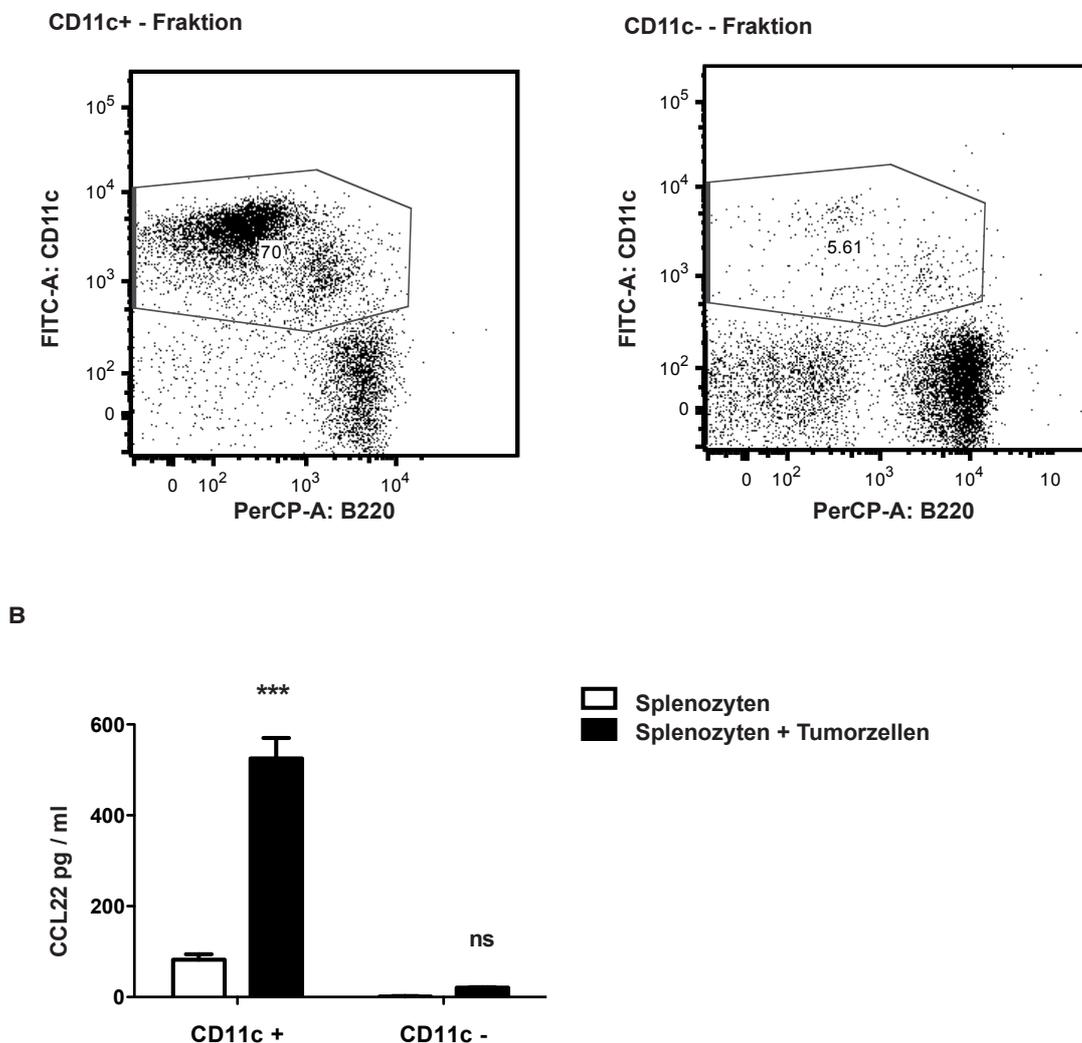


Abb. 3.7 Kokultur muriner Tumorzellen mit Splenozyten nach Separation CD11c-positiver Zellen.

Aus murinen C57BL/6 Splenozyten wurden CD11c-positive Zellen mittels MACS-Sort aufgereinigt. Die Reinheit der CD11c-Positiv- und Negativfraktion wurde in der Durchflusszytometrie ermittelt. (A) Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenantigene CD11c und B220 in der aufgereinigten CD11c-Positivfraktion und in der CD11c-

Negativfraktion. **(B)** Je 200.000 CD11c+ und CD11c- Zellen wurden für 48h mit B16-Melanomzellen kultiviert. CCL22-Messung im Kokulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Angezeigt sind Mittelwert + SEM (n=2). Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. *** p < 0,005; ns = nicht signifikant.

3.3.5 Die Kokultur mit Tumorzellen führt nicht zur Induktion weiterer inflammatorischer Zytokine

Die CCL22-Produktion durch Immunzellen wird unter normalen Umständen und in nicht tumortragenden Organismen durch eine Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Signale reguliert. So wird CCL22-Sekretion beispielsweise durch die klassischen inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor (TNF) stimuliert, jedoch durch Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- γ (IFN- γ) herunterreguliert [Mantovani et al. 2000]. Die Th2-Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) wiederum führen zu einer Induktion der CCL22-Produktion [Bonecchi et al. 1998].

Es sollte daher im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Kulturüberstände von Tumorzellen zur Induktion weiterer inflammatorischer Zytokine in Immunzellen führen, welche wiederum sekundär die CCL22-Expression beeinflussen. Es wurden murine Splenozyten und humane PBMCs für 48 h in Kulturüberstand von Tumorzellen kultiviert. Die Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand wurden daraufhin mit dem ELISA gemessen. Der Überstand der murinen Splenozytenkultur wurde auf die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-12p70 und auf *transforming growth factor* β (TGF- β) untersucht. Im humanen PBMC-Kulturüberstand wurden IL-1 β , IL-4, IFN- γ und TNF- α gemessen. In beiden Kulturen wurde außerdem CCL22 bestimmt. Bis auf die uns schon bekannte CCL22-Induktion fand sich weder in der murinen noch in der humanen Kultur der Nachweis eines der anderen untersuchten Zytokine. Lediglich geringe Level an IL-6 in der murinen und TNF- α in der humanen Kultur der Immunzellen ließen sich im Tumorzellüberstand detektieren. Diese waren jedoch im Vergleich zur Kultur in Medium nicht signifikant erhöht (Abb. 3.8). Unter allen untersuchten Zytokinen ist also lediglich CCL22 durch Tumorzellen induzierbar.

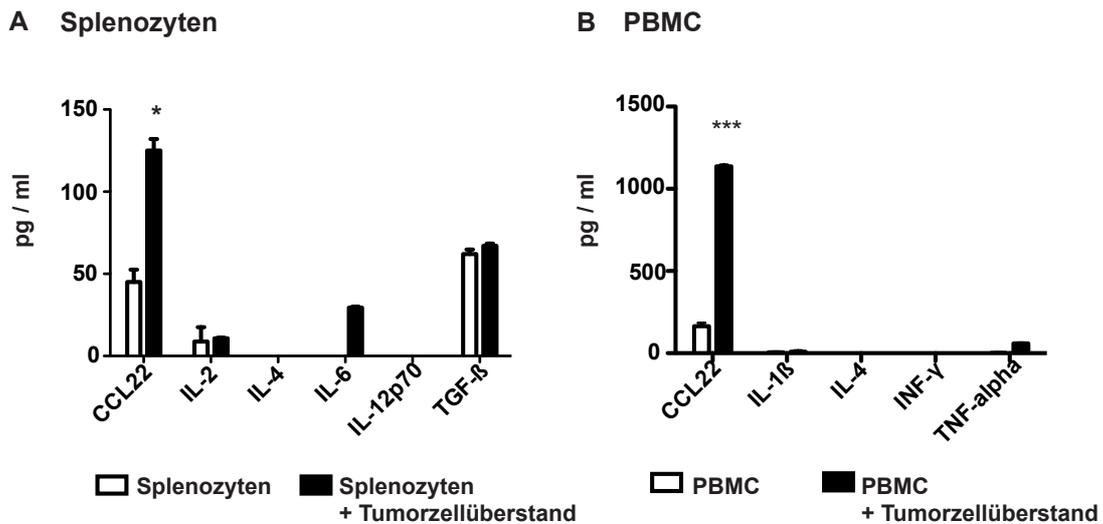


Abb. 3.8 Bestimmung von Zytokinen im Kokulturüberstand.

Murine Splenozyten (A) oder humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) (B) wurden in pancO2 bzw. MDAMB-231-Überstand für 48 h kultiviert. Zytokinkonzentrationen im Überstand wurden mit dem ELISA bestimmt. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n = 3). * p < 0,05; *** p < 0,005.

3.3.6 Die CCL22-Hochregulation wird nicht durch NFκB und Stat3 vermittelt

Im nächsten Schritt sollte die Abhängigkeit der CCL22-Induktion von den zwei bedeutenden Transkriptionsfaktoren *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB) untersucht werden. STAT3 ist ein zytoplasmatischer Transkriptionsfaktor, welcher durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert wird. Nach der Aktivierung dimerisiert er und wandert in den Nukleus, um dort die Transkription verschiedener Zielgene zu aktivieren, welche essenziell an Zellzyklus, Apoptose und Zelldifferenzierung beteiligt sind. STAT3 ist Bestandteil des Januskinase (Jak)/ STAT Signalwegs, welcher für viele Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren eine große Rolle spielt [Darnell et al. 1994; Grivennikov and Karin 2010]. Auch der Transkriptionsfaktor NFκB wird durch eine Vielzahl an Stimuli wie reaktive Sauerstoffspezies, Zytokine, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder *Toll-like*-Rezeptor-Signale aktiviert [Baldwin 1996; Chandel et al. 2000]. Da beide Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Immunzellen spielen und Bestandteile zahlreicher Zytokin-Signalkaskaden sind, sollte nun untersucht werden, ob sie auch

in der Hochregulation von CCL22 eine Rolle spielen. Für die Überprüfung der Beteiligung von STAT3 und NFκB wurden die Inhibitoren Stattic, Parthenolide und Bay11-7082 benutzt. Stattic ist ein *small-molecule*-Inhibitor der STAT3-Aktivierung [Schust et al. 2006]. Parthenolide ist ein Extrakt des Mutterkrauts, welches durch Inhibition der IκB-Kinase die Aktivierung von von NFκB spezifisch hemmt [Hegner et al. 1998; Saadane et al. 2007]. Auch Bay11-7082 inhibiert die Aktivierung von NFκB durch Hemmung der IκB-α-Phosphorylierung [Pierce et al. 1997; Mori et al. 2002].

Es wurden C57BL/6 Splenozyten mit B16-Melanomzellen kultiviert. Die Zugabe der Transkriptionsfaktor-Inhibitoren Stattic, Parthenolide und Bay11-7082 erfolgte in den in der Literatur üblichen Dosierung. Nach 48 h wurden die CCL22-Konzentration in den Überständen mittels ELISA gemessen. Es zeigte sich in allen Konditionen, auch unter Zugabe der STAT3- und NFκB-Inhibitoren, eine signifikante CCL22-Induktion bei Kokultur der Splenozyten mit Tumorzellen. Die CCL22-Level waren in der Kultur mit den Inhibitoren generell niedriger, was sich auf deren zytotoxische Wirkung zurückführen lässt (Abb 3.9). Da jedoch trotz Inhibition von STAT3 und NFκB eine deutliche Tumorzell-induzierte CCL22-Hochregulation zu beobachten war, ist anzunehmen dass diese ohne wesentliche Beteiligung der Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT3 stattfindet.

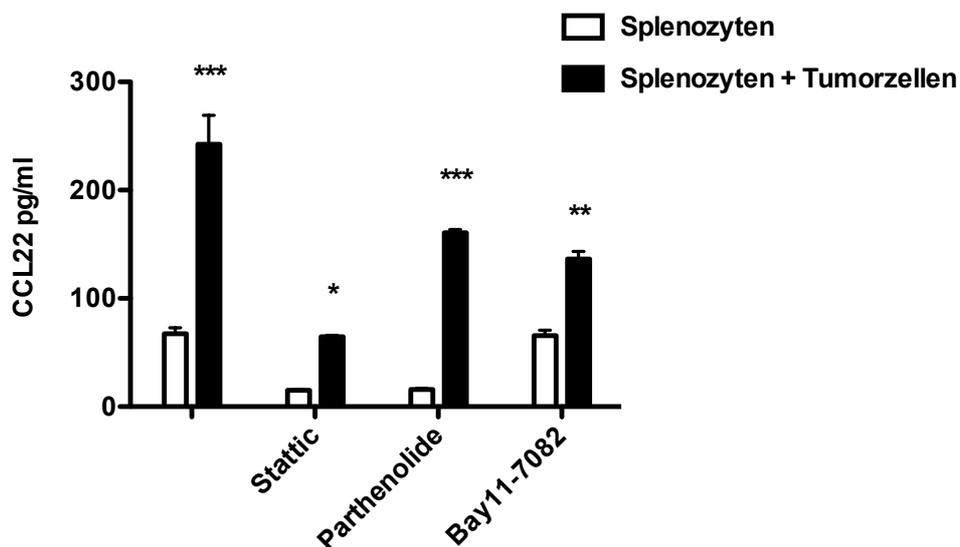


Abb. 3.9 Kokultur aus Splenozyten und Tumorzellen mit Inhibitoren des NFκB- und Stat3-Signalwegs.

C57BL/6 Splenozyten (Spl, 1 Mio/ml) wurden mit B16 Zellen unter Zugabe von 1μM Stattic, 5μM Parthenolide oder 0,5μM Bay11-7082 kultiviert. CCL22-Konzentrationen im Überstand wurden nach 48h mit dem ELISA bestimmt. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n = 3). * p < 0,05; *** p < 0,005.

3.3.7 Ein von Tumorzellen sezerniertes Protein führt zur CCL22-Hochregulation in Immunzellen

In den nächsten Experimenten sollten die Eigenschaften des CCL22-induzierenden Faktors im Tumorzellüberstand näher untersucht werden. Um die Hypothese, dass es sich bei dem von Tumorzellen sezernierten Faktor um ein Protein handelt, zu untersuchen, wurden in einem ersten Experiment die Tumorzellen mit den Antibiotika Cycloheximid und BrefeldinA vorbehandelt. Cycloheximid blockiert die Translation an den Ribosomen und inhibiert so die Proteinsynthese [Munro et al. 1968]. BrefeldinA hingegen interferiert in den Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi Apparat und führt zu einem retrograden Transport zurück zum ER. Dies verhindert die Freisetzung von Proteinen und führt zu einer Akkumulation von Proteinen im ER [Pelham 1991; Klausner et al. 1992]. Sollte es sich bei dem Faktor also um ein Protein handeln, so wäre davon auszugehen, dass seine Synthese durch Cycloheximid inhibiert und seine Freisetzung durch BrefeldinA blockiert wäre.

B16 Melanomzellen wurden mit Cycloheximid oder BrefeldinA in üblichen Dosierungen für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrmals gewaschen und mit Splenozyten kultiviert. Nach 48-stündiger Kultur wurde das CCL22 im Überstand bestimmt. Die Tumorzellvitalität wurde durchflusszytometrisch vor und nach der Kultur bestimmt, wobei keine Unterschiede zwischen den Konditionen mit BrefeldinA, Cycloheximid oder ohne Behandlung zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt). Durch die Vorbehandlung der Tumorzellen sowohl mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid als auch mit dem Exozytose-Inhibitor BrefeldinA wurde die Tumorzell-induzierte CCL22-Hochregulation komplett aufgehoben (Abb. 3.10). Es liegt daher nahe, dass der Faktor welcher zur CCL22-Induktion in Splenozyten führt ein von den Tumorzellen produziertes und freigesetztes Protein ist.

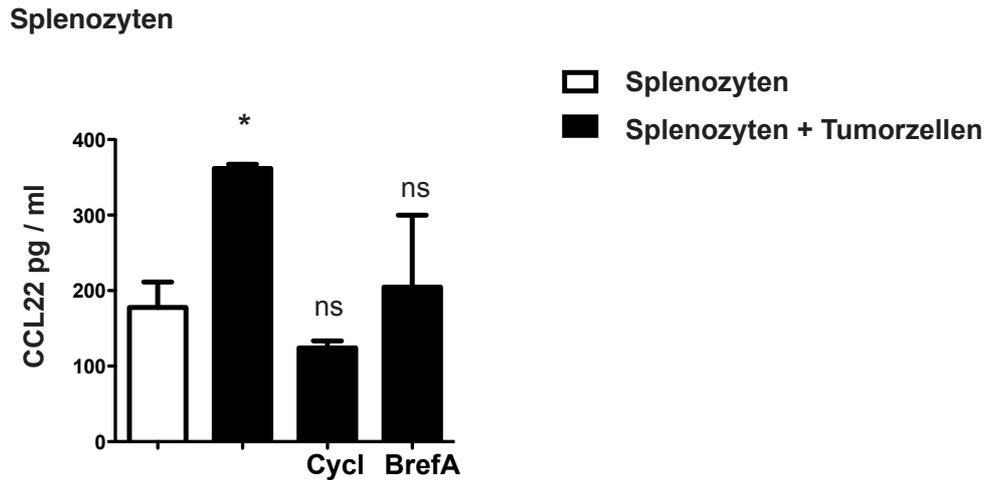


Abb. 3.10 Vorbehandlung der Tumorzellen mit Cycloheximid oder BrefeldinA

B16 Melanomzellen wurden für 60 Minuten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (Cycl) bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ BrefeldinA (BrefA) bei 37° C inkubiert. Nach extensivem Waschen wurden die Tumorzellen mit C57BL/6 Splenozyten (1 Mio/ml) für 48h kultiviert und CCL22 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n = 2). * p < 0,05; n.s. = nicht signifikant.

Um die Vermutung, dass es bei dem gesuchten Faktor um ein Protein handelt, zu bestätigen wurde Kulturüberstand von MDAMB-231-Tumorzellen für 25 Minuten auf 65°C erhitzt, um die darin enthaltenen Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden erhitzter und nicht erhitzter Überstand für 48 h mit humanen PBMC kultiviert. Im darauf folgenden ELISA konnte die erwartete CCL22-Induktion in PBMC durch Tumorzellüberstand gesehen werden, diese war im Vergleich beim abgekochten Überstand erheblich reduziert (Abb. 3.11 A). Auch in der murinen Kultur von Splenozyten mit B16 Melanomzell-Überstand konnte die CCL22-Induktion durch vorhergehendes Abkochen des Überstandes aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Beteiligung von Nukleinsäuren an der CCL22-Induktion auszuschließen, wurden im nächsten Ansatz Tumorzell-Lysate mit DNase und RNase behandelt. Die MDAMB-231-Tumorzellen wurden lysiert, da so erfahrungsgemäß eine höhere Konzentration des CCL22-stimulierenden Faktors zu erwarten war als im Überstand. Die Lysate wurden mit 50 $\mu\text{g/ml}$ DNase oder 10 U/ml RNase für 2 h inkubiert. Um eine zytotoxische Wirkung auf die PBMC zu verhindern wurden die Lysate daraufhin 1:100 verdünnt. Humane PBMC wurden für 48 h in den Lysaten kultiviert, um daraufhin CCL22 im Überstand zu messen. Es war eine vergleichbare Induktion in allen Konditionen, auch unter Zugabe von DNase und RNase zu sehen. Das HEK-

Zelllysat, welches als Negativkontrolle diente, führte zu keiner CCL22-Hochregulation (Abb. 3.11 B). Dies deutet darauf hin, dass weder DNA noch RNA an der CCL22-Induktion durch Tumorzellen beteiligt sind.

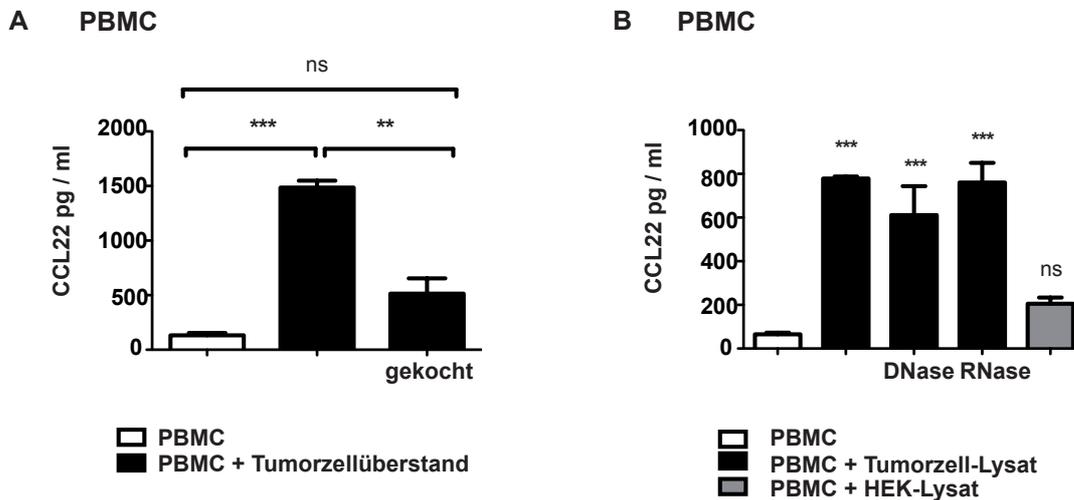


Abb. 3.11 Abkochen des Überstands und Vorbehandlung mit DNase und RNase

Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, 1 Mio/ml) wurden mit Tumorzellüberständen bzw. Tumorzelllysat kultiviert. Nach 48 h wurde CCL22 im Überstand mit dem ELISA gemessen. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n = 3). Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. ** p < 0,01; *** p < 0,005; ns = nicht signifikant. (A) Zellfreier Kulturüberstand von MDAMB-231 Mammakarzinomzellen wurde für 25 Minuten auf 65° C erhitzt (gekocht). (B) MDAMB-231- und HEK-Zelllysat wurden mit 50 µg/ml DNase I bzw. 10 u/ml Riboshredder RNase Mischung für 120 Minuten bei 37° C inkubiert. Vor der Kultivierung mit humanen PBMC wurde das Tumorzelllysat 1:100 verdünnt.

Im nächsten Schritt sollten die Proteine im Tumorzellüberstand anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, um die Größe des CCL22-induzierenden Faktors zu bestimmen. Hierfür wurden Dialysekassetten und Dialyseröhrchen in verschiedenen Porengrößen benutzt. 2,5 bzw. 5 ml FBS-freier MDAMB-231 Überstand wurden in den Filter pipettiert und über Nacht bei 4° C mit einem Magnetrührer in Dialysepuffer inkubiert. Der dialysierte Überstand wurde für 48 h mit PBMC kultiviert. Die erfolgreiche Größenauftrennung wurde mittels Gelelektrophorese verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Es zeigte sich für alle verwendeten Filtergrößen (0,5 kD, 20 kD, 50 kD und 100 kD) eine starke CCL22-Induktion durch die im Filter verbliebene Fraktion, welche die

größeren Proteine enthält. Bei Kultivierung von PBMC mit der filtrierten Fraktion, in der die Proteine mit einer Größe kleiner als 20 kD zu finden sind, zeigte sich hingegen keine CCL22-Hochregulation (Abb. 3.12). Es ist also anzunehmen, dass das von Tumorzellen freigesetzte Protein, welches zur CCL22-Hochregulation in Immunzellen führt, eine Größe von über 100 kD besitzt.

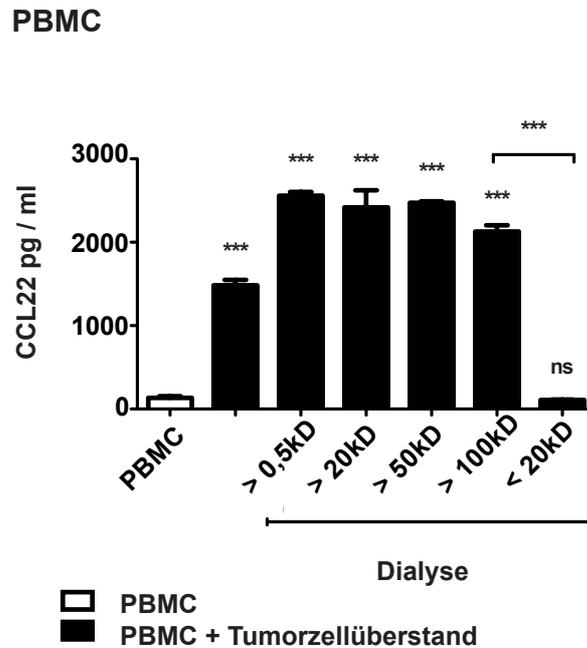


Abb. 3.12 Kultur von PBMC in dialysierten MDAMB-231-Kulturüberständen

Serumfreier MDAMB-231-Kulturüberstand wurde mit Float-A-Lyzer Dialyseröhrchen der Porengröße 0,5 kD, 20 kD, 50 kD und 100 kD in je zwei Fraktionen aufgeteilt. Der Gesamtüberstand, sowie die Fraktionen, welche Proteine größer als 0,5 (>0,5 kD), 20 kD (>20kD), 50 kD (>50 kD) oder 100 kD (>100 kD) bzw. kleiner als 20 kD (<20 kD) enthielten, wurden für 48h mit PBMC kultiviert. Die Messung von CCL22 im Überstand erfolgte mittels ELISA. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n = 3). Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. *** p < 0,005; ns = nicht signifikant.

3.4 CCL22-exprimierende und FoxP3-positive Zellen im hepatozellulären Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit die fünfthäufigste Krebserkrankung. Trotz neuer Therapieoptionen wie der Radiofrequenzablation, der perkutanen Ethanolinjektion und dem Einsatz des Multityrosinkinaseinhibitors Sorafenib bleibt die Prognose insgesamt schlecht [Schutte et al. 2009]. Da das hepatozelluläre Karzinom eine im Vergleich zu hepatischen Metastasen von

kolorektalen Karzinomen hohe Infiltration mit Lymphozyten aufweist [Yoong et al. 1998], liegt die Vermutung nahe, dass das Immunsystem bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des Tumors eine große Rolle spielt. Tatsächlich wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass die Höhe der lymphozytären Infiltration und die Zusammensetzung der infiltrierenden Lymphozytensubtypen einen Einfluss auf die Prognose des HCC hat [Unitt et al. 2006]. Auch wurde mehrfach eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen in Leber, Blut und Aszites von HCC-Patienten beschrieben [Ormandy et al. 2005; Fu et al. 2007]. Im Hinblick auf die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von CCL22 auf Treg-Infiltration und Überleben beim HCC untersucht werden.

3.4.1 CCL22-exprimierende- und FoxP3-positive Zellen in HCC-infiltriertem Lebergewebe

Um zu untersuchen, ob CCL22-exprimierende Zellen im Lebergewebe von HCC-Patienten zu finden sind und inwiefern diese mit der Infiltration durch FoxP3-positive regulatorische T-Zellen korrelieren, wurden Gewebeschnitte auf die Expression von CCL22 und FoxP3 untersucht. Die Analyse erfolgte an 101 bereits gefärbten Schnitten eines bestehenden Kollektivs von Patienten mit bekanntem HCC.

Zunächst wurde die gesamte Oberfläche der Gewebeschnitte auf CCL22- und FoxP3-positive Zellen untersucht. Die Infiltrationsdichte wurde semiquantitativ und anhand ihrer örtlichen Verteilung zum Tumor ausgewertet. Es konnten in fast allen von uns untersuchten Schnitten CCL22-positive und auch FoxP3-positive Zellen gefunden werden, in einer großen Anzahl an Schnitten waren beide Zelltypen zu finden.

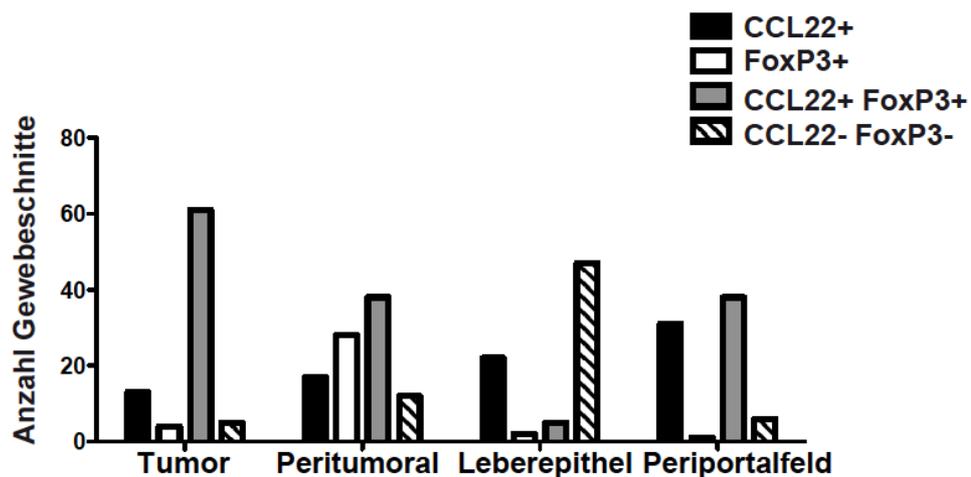


Abb. 3.13 CCL22-positive und FoxP3-positive Zellen in HCC-Gewebeschnitte

Gewebeschnitte der Leber von HCC-Patienten (n = 101) wurden immunhistologisch mit Antikörpern gegen CCL22 und FoxP3 gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Für die Analyse wurden die Schnitte in die Bereiche Tumor, peritumorales Stroma (= Peritumoral), Leberepithel und Leberstroma (= Periportalfeld) eingeteilt. Dargestellt ist die Anzahl an Gewebeschnitten, welche nur CCL22-positive Zellen (= CCL22+), nur FoxP3-positive Zellen (= FoxP3+), sowohl CCL22-positive als auch FoxP3-positive Zellen (= CCL22+ FoxP3+) oder keine der beiden Zellarten (= CCL22- FoxP3-) enthielten.

CCL22-Expression zeigte sich durch zytoplasmatische Anfärbung in Immunzellen, welche morphologisch Zellen myeloischen Ursprungs zuzuordnen waren. Es zeigte sich keine CCL22-Expression durch Tumorzellen. FoxP3-positive Zellen hingegen waren wie erwartet Lymphozyten, welche eine nukleäre Anfärbung aufwiesen (Abb. 3.14).

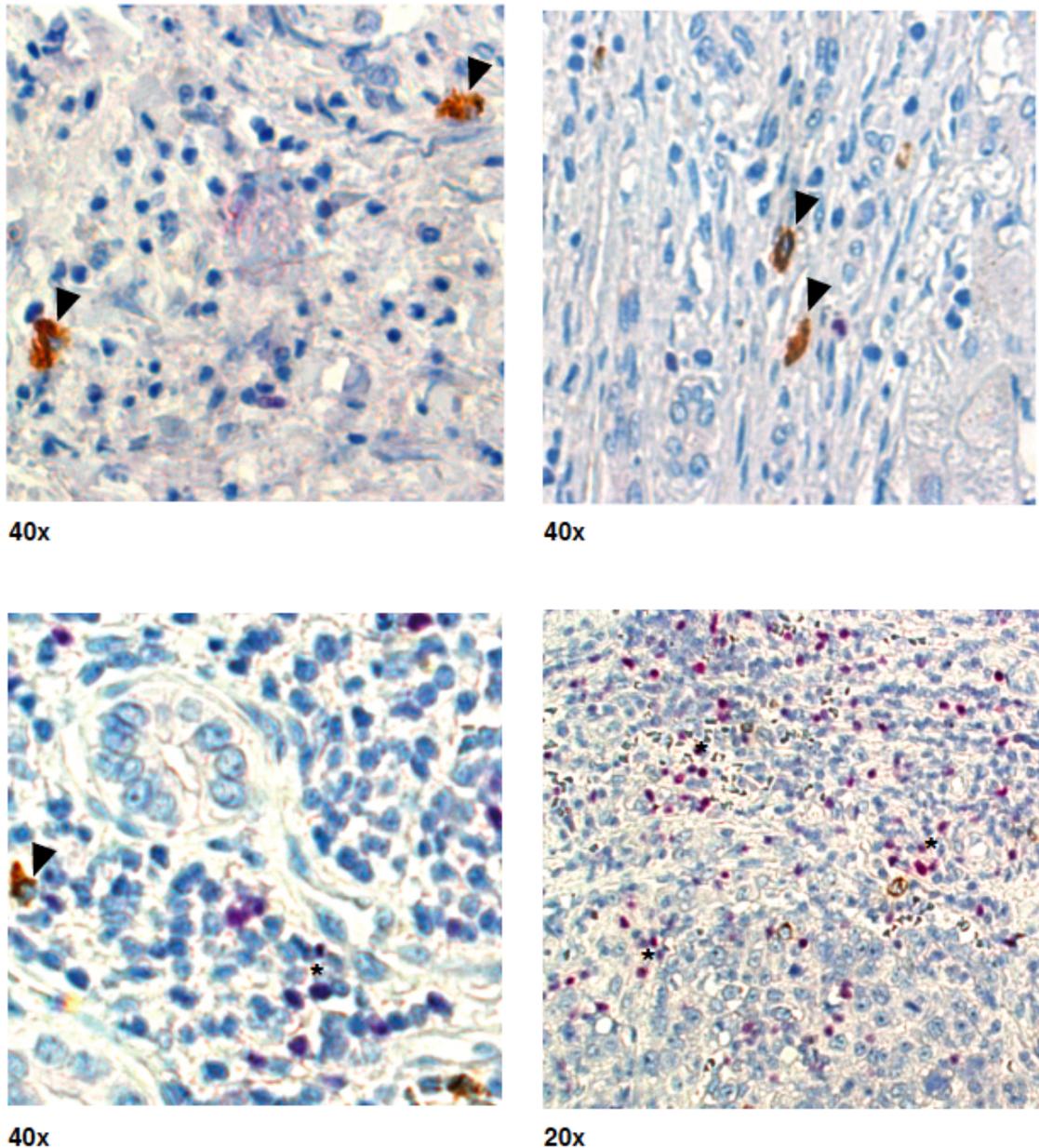


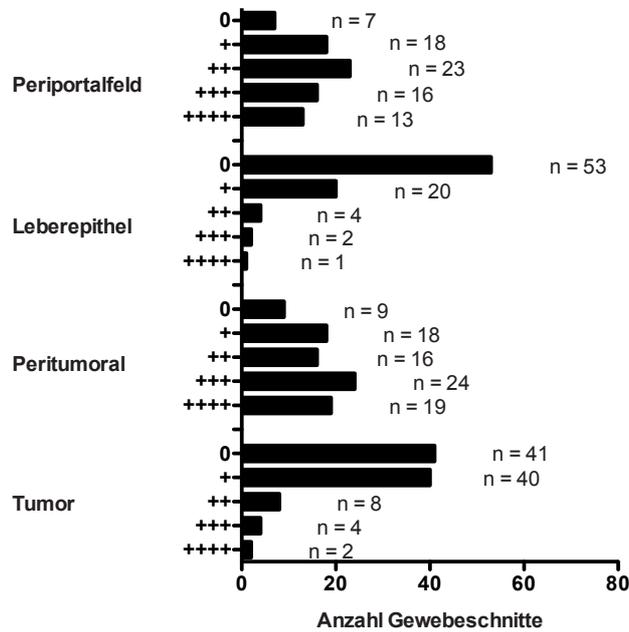
Abb. 3.14 Immunhistologische Färbung von HCC-Gewebeschnitten

Gewebeschnitte der Leber von HCC-Patienten wurden mit Antikörpern gegen CCL22 und FoxP3 gefärbt. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen in 40-facher (= 40x) oder 20-facher (= 20x) Vergrößerung. CCL22-positive Zellen (Pfeilspitzen) sind durch zytoplasmatisch braune Färbung zu erkennen, FoxP3-positive Zellen (Sternchen) zeigen eine nukleäre rötliche Färbung.

Es ließen sich Unterschiede in der räumlichen Verteilung CCL22-positiver und FoxP3-positiver Zellen im Hinblick auf den Tumor feststellen: Hohe Mengen CCL22-exprimierender Zellen waren vor allem im peritumoralen lymphozytären Infiltrat und im Periportalfeld zu finden, intratumoral fanden sich nur einzelne CCL22-exprimierende Zellen. FoxP3-positive Zellen hingegen infiltrierten in hoher Anzahl auch intratumoral, in ähnlich hoher Dichte waren sie zudem im peritumoralen

Stroma und Periportalfeld zu sehen. Im gesunden Leberepithel hingegen zeigte sich kaum Infiltration durch CCL22- oder FoxP3-positive Zellen (Abb.3.15).

CCL22



FoxP3

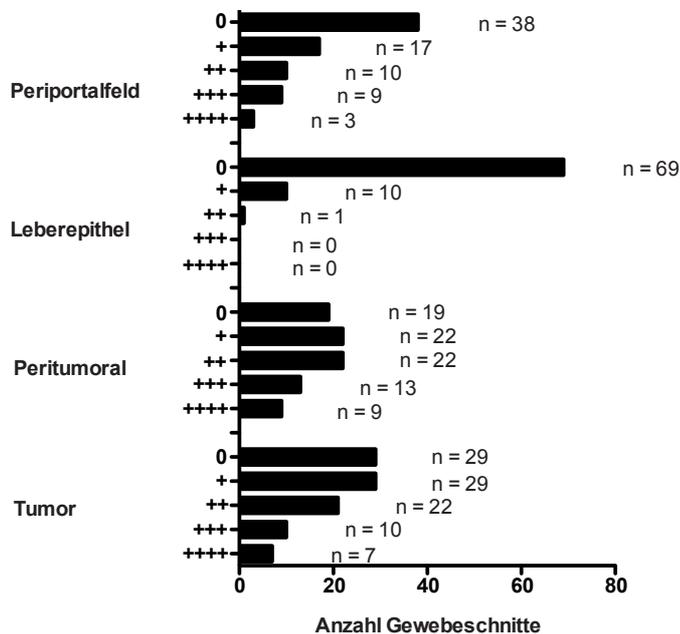


Abb. 3.15 Dichte der Infiltration mit CCL22-positiven und FoxP3-positiven Zellen

HCC-Gewebeschnitte (n = 101) wurden mit Antikörpern gegen CCL22 und FoxP3 gefärbt. Die Analyse der Infiltration mit CCL22-exprimierenden und FoxP3-positiven Zellen erfolgte semiquantitativ, wobei das Gewebe nach histologischen Kriterien in die Bereiche Tumor, peritumorales Stroma, Leberepithel und Leberstroma eingeteilt wurde. Dargestellt ist die Anzahl der Gewebeschnitte, welche eine Infiltration durch CCL22- oder FoxP3-positive Zellen in einer bestimmten Höhe vorwies. 0 = keine Infiltration; + = einzelne infiltrierende Zellen; ++ = wenige infiltrierende Zellen; +++ = mittlere Anzahl infiltrierender Zellen; ++++ = viele infiltrierende Zellen; P = peritumorales Stroma; L Epithel = Leberepithel; L Stroma = Leberstroma.

Um den Einfluss CCL22-positiver Zellen auf die Rekrutierung von Treg zu bestimmen, sollte die Korrelation zwischen dem Ausmaß an Infiltration mit CCL22-exprimierenden Zellen und FoxP3-positiven Zellen bestimmt werden. Obwohl in einer Mehrzahl der Schnitte gleichzeitig CCL22- und FoxP3-Expression zu finden war und auch eine räumliche Nähe zwischen CCL22- und FoxP3-exprimierenden Zellen festgestellt werden konnte, ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an CCL22-positiven Zellen und dem Grad der Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Prognostische Signifikanz der Infiltration mit CCL22- und FoxP3-positiven Zellen beim HCC

In einem nächsten Schritt sollte die Auswirkung der Infiltration mit CCL22- und FoxP3-positiven Zellen auf das Überleben der HCC-Patienten untersucht werden. Hierfür wurden die Überlebensdaten der Patienten mit den von uns erhobenen histopathologischen Daten abgeglichen. Die Auswertung erfolgte bei einem kleineren Kollektiv, da nicht zu allen von uns lichtmikroskopisch ausgewerteten Schnitten Überlebensdaten verfügbar waren.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grad der Infiltration mit CCL22-positiven Zellen oder FoxP3-positiven Zellen und dem Überleben der Patienten. Die Anzahl der intratumoralen und peritumoralen CCL22-exprimierenden Zellen hatte in unserer Auswertung keinen Einfluss auf das Überleben der HCC-Patienten (Daten nicht gezeigt). Ein tendenziell verkürztes Überleben zeigte sich hingegen bei höherer Infiltration mit CCL22-positiven Zellen im Periportalfeld und im Leberepithel (Abb. 3.16 A). Hohe Anzahl an FoxP3-positiven Zellen zeigte hingegen in allen Bereichen, also intratumoral, peritumoral, in Periportalfeld und Leberepithel, einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten (Abb. 3.16 B), der allerdings nicht signifikant war.

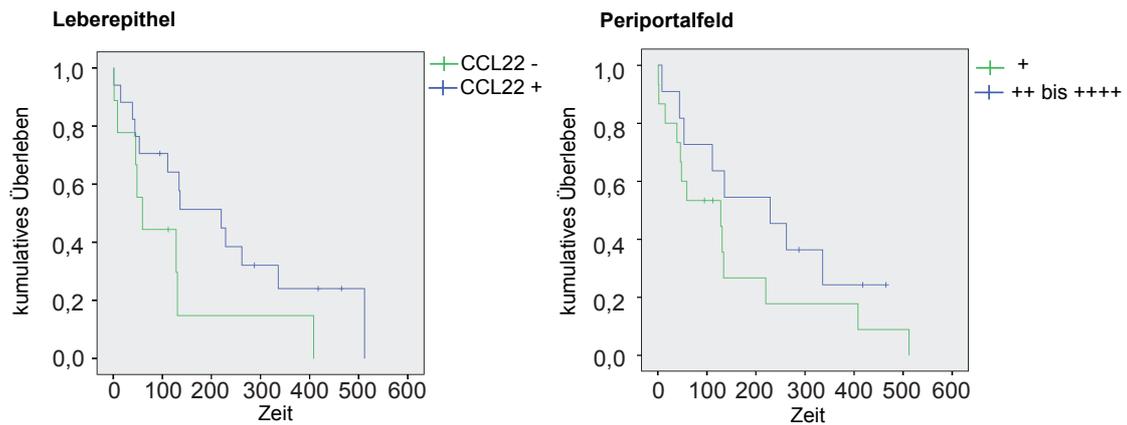
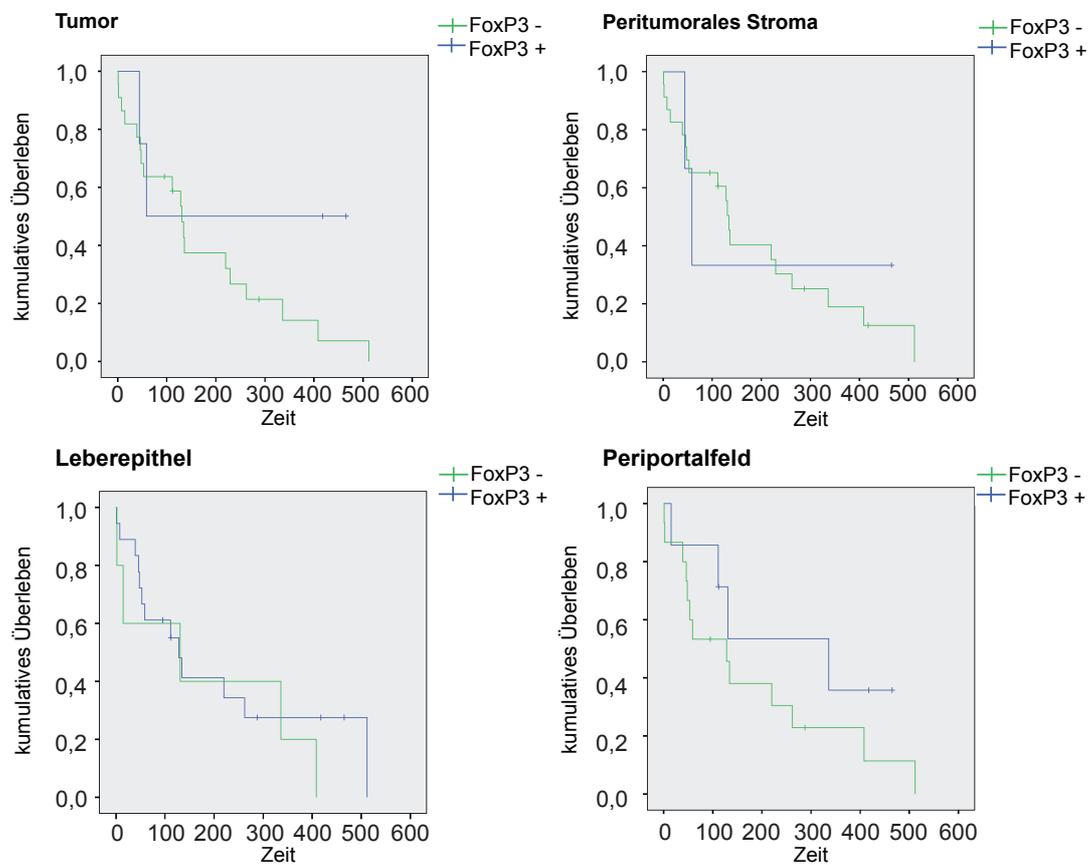
A CCL22**B FoxP3**

Abb. 3.16 Auswirkung der Infiltration mit CCL22-positiven und FoxP3-positiven Zellen auf das Überleben bei HCC-Patienten

Dargestellt ist das kumulative Überleben von HCC-Patienten abhängig von der intrahepatischen Infiltration mit CCL22-exprimierenden Zellen (**A**) bzw. FoxP3-positiven Zellen (**B**) in Überlebenskurven nach Kaplan Meier. Signifikanzniveau nach χ^2 -Test: $p = 0,102$ (CCL22 Leberepithel), $p = 0,199$ (CCL22 Periportalfeld), $p = 0,211$ (FoxP3 Tumor), $p = 0,757$ (FoxP3 Peritumorales Stroma), $p = 0,536$ (FoxP3 Leberepithel), $p = 0,245$ (FoxP3 Periportalfeld).

4. Diskussion

Um einer Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen, bedienen sich Tumoren einer Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen. Wie bereits beschrieben, ist einer dieser Mechanismen die Generierung eines immunsuppressiven Mikromilieus. Dadurch wird die Abwehrreaktion am Ort des Tumors unterdrückt und somit eine ungehinderte Proliferation der Tumorzellen ermöglicht. Die Rekrutierung suppressiver Treg spielt hierbei eine zentrale Rolle. Es wurde gezeigt, dass die Infiltration mit Treg in vielen Tumorentitäten mit einer verschlechterten Prognose korreliert [Sasada et al. 2003; Sato et al. 2005; Bates et al. 2006]. Die Stimuli, welche zur selektiven Anlockung regulatorischer T-Zellen führen, sind komplex und noch nicht vollständig erforscht. Das Chemokin CCL22 ist der physiologische Ligand für den auf Treg exprimierten CCR4-Rezeptor und ist daher in der Lage, regulatorische T-Zellen an den Ort des Tumors zu locken.

4.1 Systemische CCL22-Hochregulation in Mäusen mit subkutanen Tumoren

CCL22-Überexpression in tumortragenden Organismen ist ein möglicher Mechanismus der Immunentrinnung. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass CCL22 in tumortragenden Mäusen systemisch hochreguliert ist. Wir untersuchten zunächst Tumorsysate muriner Pankreaskarzinome, kolorektaler Karzinome, Mammakarzinome und Melanome auf intratumorale CCL22-Expression. CCL22 ließ sich in allen genannten Tumoren nachweisen, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen. Die höchsten CCL22-Spiegel wurden im C57BL/6 Pankreaskarzinommodell pancO2 gemessen. Korrespondierend zu unseren Ergebnissen wurde in der Literatur auch in humanen Tumoren intratumorale CCL22-Expression beschrieben: eine erhöhte Anzahl CCL22-positiver Zellen wurde sowohl in der durchflusszytometrischen Untersuchung von Ösophagus- als auch von Magenkarzinomen im Vergleich zur normalen Mukosa nachgewiesen [Mizukami et al. 2008; Maruyama et al. 2010]. Darüber hinaus zeigten unsere Untersuchungen neben der intratumoralen CCL22-Expression auch eine CCL22-Überexpression in systemischen lymphatischen Organen. Es wurde

eine signifikante Hochregulation von CCL22-mRNA in Lymphknoten und Splenozyten von Mäusen, welche subkutane Pankreas- oder Mammakarzinome trugen, nachgewiesen. Dieses Ergebnis ließ sich auf Proteinebene bestätigen. CCL22 war im Splenozytenlysat der tumortragenden Tiere im Vergleich zu tumorfreien Kontrolltieren deutlich erhöht. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die CCL22-Hochregulation nicht auf lymphatische Gewebe beschränkt war: Mäuse mit subkutanem Pankreas- oder Mammakarzinom wiesen stark erhöhte CCL22-Serumspiegel im Vergleich zu tumorfreien Tieren auf.

Eine CCL22-Hochregulation im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wurde bereits in einer Studie beschrieben, die erhöhte CCL22-Expression in der Lunge 4T1-Mammakarzinom tragender Mäuse beobachtete, welche durch die intraperitoneale Injektion von 4T1-Kulturüberständen in gesunde Mäuse reproduzierbar war [Olkhanud et al. 2009]. Auch bei humanen Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereich wurde immunhistochemisch eine CCL22-Expression im Tumor und in den Tumor-drainierenden Lymphknoten nachgewiesen [Tsujikawa et al. 2013]. In beiden genannten Fällen wurde die CCL22-Expression mit vermehrter Metastasierung CCR4-positiver Tumorzellen an den Ort der CCL22-Hochregulation, also die Lunge bzw. den Tumor-drainierenden Lymphknoten, in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zu den in der Literatur gefundenen Ergebnissen war die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene CCL22-Hochregulation nicht lokal beschränkt. Nicht nur Tumor-drainierende Lymphknoten, sondern auch kontralaterale und axilläre Lymphknoten sowie Splenozyten wiesen in unseren Untersuchungen vermehrte CCL22-Expression auf. Im auch in der Arbeit von Olkhanud et al. genutzten 4T1-Brustkrebsmodell fanden wir CCL22-Hochregulation in Splenozyten sowohl bei makroskopisch sichtbarer als auch bei makroskopisch fehlender Metastasierung in die Milz. Auch die von uns gemessenen, gleichzeitig erhöhten CCL22-Serumspiegel weisen auf eine systemisch erhöhte CCL22-Ausschüttung hin.

Somit zeigt unsere Studie erstmals in zwei unabhängigen Tumormodellen eine CCL22-Hochregulation sowohl in systemischen lymphatischen Organen als auch im Serum tumortragender Mäuse. Es war hierbei nicht von Bedeutung, ob die lymphatischen Organe in direkter örtlicher Beziehung zum subkutanen Tumor standen oder makroskopisch vom Tumor infiltriert waren. Die genaue Funktion der systemischen CCL22-Hochregulation ist noch unklar. Aufgrund der im gesamten

lymphatischen System erhöhten CCL22-Spiegel halten wir es für unwahrscheinlich, dass es sich alleine um einen Schritt im Metastasierungsweg der Tumorzellen handelt. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die systemische CCL22-Hochregulation zu einem immunsuppressiven Milieu beiträgt, welches den Tumor vor einer Elimination durch das Immunsystem bewahrt. Erst kürzlich wurden auch in der Literatur erstmals erhöhte CCL22-Serumspiegel bei Patienten, welche an einem follikulären Lymphom erkrankt waren, beschrieben. Hohe CCL22-Werte korrelierten hierbei mit einem verschlechtertem rezidivfreiem Überleben [Rawal et al. 2013]. Dies unterstreicht die prognostische Signifikanz systemischer CCL22-Erhöhung in tumortragenden Organismen, auch wenn in genannter Studie keine Daten zu CCL22-Hochregulation in lymphatischen Organen zu finden sind. Die exakten Auswirkungen systemisch erhöhter CCL22-Werte auf das Tumorwachstum und das immunologische Milieu müssen in weiteren Studien aufgedeckt werden.

4.2 Systemisch erhöhte CCL22-Werte führen zu vermehrtem Tumorwachstum

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass subkutane Tumoren zu einer systemischen CCL22-Hochregulation führen. Die Auswirkungen von CCL22 auf Tumorwachstum und Tumorprogression sind jedoch weitgehend unklar. CCL22 ist der physiologische Ligand für den CCR4-Rezeptor [Imai et al. 1998], welcher unter anderem von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird [Iellem et al. 2001], und ist somit in der Lage, die Migration regulatorischer T-Zellen zu beeinflussen. Hohe intratumorale CCL22-Spiegel können also zur vermehrten Rekrutierung immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen führen. Erstmals wurde dieser Zusammenhang von Curiel et al 2004 beschrieben: erhöhte CCL22-Spiegel wurden im Ovarialkarzinom und im assoziierten malignen Aszites gemessen. Beim adoptiven Transfer regulatorischer T-Zellen in Ovarialkarzinom-tragende *nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency*-Mäuse (NOD/SCID-Mäuse), welche keine eigenen T-Zellen ausbilden, zeigte sich eine deutliche Migration der transferierten Treg in Richtung Tumor. Diese Migration ließ sich durch CCL22-Antikörper signifikant reduzieren [Curiel et al. 2004]. Dies zeigte erstmalig, dass das Chemokin CCL22 tatsächlich die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen zum Tumor hin verursacht. Auch für das Magenkarzinom wurde eine Korrelation zwischen

intratumoraler CCL22-Expression und der Infiltration durch Treg beschrieben, wobei tumorinfiltrierende regulatorische T-Zellen ein starkes Migrationsverhalten zu CCL22 zeigten [Mizukami et al. 2008]. Es ist daher anzunehmen, dass CCL22 die Migration regulatorischer T-Zellen zum Ort des Tumors zu begünstigt. Eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen wiederum wurde bereits mehrfach mit einer verschlechterten Prognose bei Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht, unter anderem beim Glioblastom, bei gastrointestinalen Tumoren, dem Ovarialkarzinom, dem Pankreaskarzinom und beim Mammakarzinom [Liyanage et al. 2002; Sasada et al. 2003; Curiel et al. 2004; Sato et al. 2005; Bates et al. 2006; Hiraoka et al. 2006; Jacobs et al. 2010]. Daten zur direkten Auswirkung systemisch erhöhter CCL22-Spiegel auf das Tumorwachstum sind bisher jedoch noch ausstehend.

Die Arbeit von Rawal et al. zeigte zwar einen negativen Einfluss erhöhter CCL22-Serumspiegel auf das rezidivfreie Überleben beim follikulären Lymphom [Rawal et al. 2013], jedoch ließ sich auch hier keine konkrete Aussage über die Auswirkung der CCL22-Hochregulation auf das Tumorwachstum treffen. Ein direkter Zusammenhang zwischen CCL22-Überexpression und erhöhtem Tumorwachstum wurde bisher einzig beim hepatozellulären Karzinom gezeigt. In einem Mausmodell mit CCL22-überexprimierenden HCC-Zellen wurde das Tumorwachstum sowie die Metastasierungstendenz im Vergleich zu Mäusen mit Tumoren normaler CCL22-Expression bestimmt. Es zeigten sich ein signifikant erhöhtes Tumorwachstum, erhöhte intraabdominale Metastasierung sowie eine vermehrte Infiltration mit regulatorischen T-Zellen in der Gruppe mit CCL22-überexprimierenden Lebertumoren [Yang et al. 2012]. Da wir in der vorliegenden Arbeit nicht von nur intratumoraler, sondern einer durch Tumore bedingten systemischen CCL22-Hochregulation ausgehen, sollte deren Einfluss auf das Tumorwachstum in einem geeigneten Modell untersucht werden. Durch regelmäßige subkutane Injektion von rekombinantem CCL22 erzielten wir - im Gegensatz zu dem von Yang et al. genutzten Modell - systemisch sowie intratumoral erhöhte CCL22-Spiegel bei Mäusen mit subkutanen kolorektalen Karzinomen. Die Messung der Tumorgroße zeigte ein signifikant erhöhtes Tumorwachstum in der Gruppe mit CCL22-Injektionen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit zeigten wir erstmals, dass systemisch erhöhte CCL22-Level in signifikant vermehrtem Tumorwachstum resultieren.

Die genauen Mechanismen, die diesem Wachstumsvorteil für den Tumor zu Grunde liegen, sind nicht bekannt. Es ist durchaus anzunehmen, dass die Rekrutierung und

Aktivierung regulatorischer T-Zellen hierbei eine Rolle spielt. Welche Auswirkungen eine systemische CCL22-Induktion auf intratumorale und zirkulierende regulatorische T-Zellen und deren suppressive Aktivität hat, muss in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Dennoch ist die Tumor-bedingte CCL22-Hochregulation schon heute ein vielversprechendes Ziel für therapeutisches Eingreifen in die Tumor-induzierte Immunsuppression. Durch Inhibition der CCL22-Induktion oder durch CCL22-blockierende Antikörper könnte das Tumorwachstum gehemmt und eine antitumorale Immunantwort gefördert werden. Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist der Einsatz von Antikörpern gegen den CCL22-Rezeptor CCR4. Es wurde gezeigt, dass CCR4-blockierende Antikörper die Migration CCR4-positiver maligner T-Lymphozyten in Richtung CCL22 inhibieren [Chang et al. 2012]. Auch die Migration reifer Treg zum Tumor kann durch Blockierung von CCR4 verhindert werden, wodurch sich eine bessere antitumorale Immunantwort ergibt [Sugiyama et al. 2013]. In welchem Maße der Wachstumsvorteil, welchen Tumoren durch CCL22-Überexpression erfahren, mit Hilfe von CCR4-blockierenden Antikörpern beeinflusst werden kann, muss in weiterreichenden Studien gezeigt werden. Die therapeutische Signifikanz der systemischen CCL22-Hochregulation wurde in der hier vorliegenden Arbeit demonstriert.

4.3 Ein von Tumorzellen sezerniertes Protein induziert CCL22-Produktion in Immunzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde systemische CCL22-Hochregulation in tumortragenden Mäusen beschrieben. Das Chemokin CCL22 wird physiologisch im gesunden Organismus von unterschiedlichen Zellen exprimiert, so beispielsweise von Makrophagen und dendritischen Zellen [Godiska et al. 1997; Vulcano et al. 2001], jedoch auch in T-Helfer-Zellen, B-Lymphozyten und Epithelzellen [Schaniel et al. 1998; Iellem et al. 2000; Hino et al. 2007]. Über die Quelle Tumor-assoziiertes CCL22-Expression herrscht in der Literatur Uneinigkeit.

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass CCL22 Tumorzell-vermittelt in Immunzellen hochreguliert wird. Wir identifizierten CD11c-positive dendritische Zellen als Hauptproduzenten von CCL22. Murine Splenozyten wurden

mittels magnetischer Sortierung in eine CD11c-positive und eine CD11c-negative Fraktion aufgeteilt. CCL22-Sekretion konnte in hohen Mengen in der CD11c-Positivfraktion nachgewiesen werden. In der Negativfraktion war hingegen kaum CCL22-Produktion nachweisbar. Die CCL22-produzierende Zellpopulation innerhalb humaner PBMC wurde in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Fest steht jedoch, dass weder in murinen noch in humanen Tumorzellen CCL22 exprimiert wird. Diese Ergebnisse decken sich nur teilweise mit der Literatur, in der widersprüchliche Aussagen zu CCL22-produzierenden Zellen im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen zu finden sind. Verschiedene Arbeiten beschreiben Immunzellen als intratumorale CCL22-Quelle. Im *Lewis* Lungenkarzinom wurde eine zugleich CD11b-positive und CD11c-positive Zellfraktion von myeloidem Ursprung als CCL22-Produzenten beschrieben [Mailloux et al. 2010]. Im humanen Magenkarzinom wurde CCL22-Expression vor allem in der CD14-positiven Zellfraktion gefunden, welche Monozyten und Makrophagen beinhaltet [Mizukami et al. 2008]. Andere Studien beschreiben sowohl Immun- als auch Tumorzellen als CCL22-Quelle: In humanen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wurde beispielsweise CCL22-Expression neben Makrophagen auch in Tumorzellen gefunden [Tsuji-kawa et al. 2013]. Auch Curiel et al. beschrieben sowohl Ovarialkarzinomzellen als auch Tumor-infiltrierende Makrophagen als CCL22-Produzenten, obwohl hierfür keine ausreichenden Beweise im Manuskript zu finden sind [Curiel et al. 2004]. CCL22-Sekretion wurde außerdem durch maligne B-Zell-Lymphome und Hodgkin-Lymphom-Zelllinien beobachtet [Ghia et al. 2001; Ishida et al. 2003]. Die meisten Hinweise auf CCL22-Produktion durch Tumorzellen finden sich für das Mammakarzinom, hier wurde bereits mehrfach CCL22-Produktion durch die Brustkrebszellen beschrieben [Gobert et al. 2009; Faget et al. 2011]. Histologisch ließen sich jedoch neben den CCL22-produzierenden Mammakarzinomzellen auch hier morphologisch dendritischen Zellen ähnliche, CCL22-exprimierende Zellen nachweisen [Gobert et al. 2009; Anz et al. 2011]. Dies deckt sich mit unserer Erkenntnis, nach der Immunzellen - im Mausmodell dendritische Zellen – die Hauptproduzenten von CCL22 sind. Auch CCL22-Induktion durch Kokultur mit Tumorzellen konnte in unseren Untersuchungen in hohem Maße in der CD11c-positiven Fraktion nachgewiesen werden. In der CD11c-Negativfraktion ließ sich hingegen keine CCL22-Hochregulation durch Kultur mit Tumorzellen beobachten. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass Immunzellen die Effektorzellen der CCL22-Hochregulation in tumortragenden Organismen sind. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien,

welche CCL22-Expression in Lymphomzellen, Ovarial-, Plattenepithel- und Mammakarzinomzellen beschreiben, war in unseren Untersuchungen *in vitro* keinerlei CCL22-Sekretion durch die von uns verwendeten Tumorzelllinien nachweisbar.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten weiterhin erstmals, dass Tumorzellen ein lösliches Protein sezernieren, welches spezifisch zur CCL22-Hochregulation in Immunzellen führt. Dieser Effekt wurde für murine Melanom-, Mammakarzinom-, Pankreaskarzinom-, Kolonkarzinom- und Lymphomzellen sowie für humane Pankreaskarzinom-, Melanom-, Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen gezeigt. Trotz kontroverser Ergebnisse in der Literatur fanden wir in keiner der genannten Tumorzelllinien eigene CCL22-Ausschüttung *in vitro*. Die Kulturivierung von murinen Splenozyten oder humanen PBMC in zellfreiem Kulturüberstand der Tumorzelllinien führte hingegen zu einer signifikant erhöhten CCL22-Ausschüttung und CCL22-mRNA-Expression in den Immunzellen. Durch Vorbehandlung der Tumorzellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid oder dem Hemmstoff des intrazellulären Proteintransports BrefeldinA konnte die zuvor beobachtete CCL22-Induktion aufgehoben werden. Daraus ist zu schließen, dass der von Tumorzellen in den Kulturüberstand sezernierte Faktor, welcher zu CCL22-Hochregulation führt, ein Protein ist. Interessanterweise beschreibt eine Studie in einem ähnlichen Versuchsaufbau CCL22-Induktion in Mammakarzinom-Zelllinien durch deren Kultivierung in PBMC-Kulturüberstand [Faget et al. 2011]. Dies scheint widersprüchlich zu den von uns gewonnenen Ergebnissen, da wir keine CCL22-Sekretion durch Mammakarzinom-Zelllinien *in vitro* beobachten konnten, hingegen eine starke, durch den Kulturüberstand von Mammakarzinomzellen ausgelöste, CCL22-Induktion in PBMC. Eine Erklärung für diese scheinbar kontroversen Ergebnisse ist die Zugabe von rekombinantem humanen INF- γ zu den Kokulturen in der Arbeit von Faget et al. INF- γ induziert CCL22-Produktion in Zellen epithelialen Ursprungs [Berin et al. 2001] und hemmt die CCL22-Sekretion durch PBMC [Andrew et al. 1998; Berin et al. 2001]. Somit ist INF- γ in der Lage, die von uns beobachtete CCL22-Induktion in PBMC zu inhibieren, während die CCL22-Produktion in Mammakarzinomzellen durch INF- γ stimuliert wird. Übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen konnten auch Faget et al. keine CCL22-Produktion durch primäre Mammakarzinom-Zelllinien ohne INF- γ -Addition beobachten.

Wir kamen in der vorliegenden Arbeit des Weiteren zu der Erkenntnis, dass außer CCL22 keine weiteren inflammatorischen Zytokine durch Kultivierung von Immunzellen in Kulturüberstand von Tumorzellen hochreguliert werden. Dies zeigten wir sowohl für bekannte Stimulatoren der CCL22-Sekretion wie IL-4, IL-1 β und TNF [Bonecchi et al. 1998; Rodenburg et al. 1998; Mantovani et al. 2000] als auch für Inhibitoren der CCL22-Expression wie IL-12 und IFN- γ [Bonecchi et al. 1998; Mantovani et al. 2000]. Eine Beteiligung der genannten Zytokine bei der von uns beobachteten CCL22-Hochregulation konnten wir damit ausschließen. Es ist also davon auszugehen, dass der von Tumorzellen ausgeschüttete Faktor spezifisch das Chemokin CCL22 hochreguliert. Mögliche, der CCL22-Hochregulation zu Grunde liegende Mechanismen sind weiterhin die Signalketten der Transkriptionsfaktoren NF κ B und STAT3. NF κ B-Inhibition führt zu verminderter CCL22-Expression in Kolonepithelzellen [Berin et al. 2001], jedoch hatte NF κ B-Inhibition in unseren Untersuchungen keinen Effekt auf die beschriebene CCL22-Hochregulation in PBMC. Dem Transkriptionsfaktor STAT3 wird eine zentrale Rolle in der Transformierung normaler Zellen zu Tumorzellen zugeschrieben [Bromberg et al. 1999] und konstitutive STAT3-Aktivierung in Tumorzellen und Tumor-assoziierten Immunzellen ist ein zentraler Bestandteil in der Entstehung eines immunsuppressiven Mikromilieus, welches das immunologische Entweichen des Tumors begünstigt [Catlett-Falcone et al. 1999; Wang et al. 2004; Kortylewski et al. 2005; Yu et al. 2007]. Inhibition von STAT3 führte jedoch in der vorliegenden Arbeit zu keiner Verminderung der CCL22-Induktion in Immunzellen durch Tumorzellen.

Welche Signalwege nach der Ausschüttung des CCL22-induzierenden Proteins durch Tumorzellen aktiviert werden, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Die genauere Charakterisierung des hier beschriebenen Proteins und der zur CCL22-Überexpression führenden Signalkaskade ist für die mögliche therapeutische Nutzung unserer Erkenntnisse unerlässlich. Durch selektive Blockade des Faktors oder einzelner zu Grunde liegender Signalschritte kann die CCL22-Hochregulation und die damit einhergehende Immunprivilegierung des Tumors möglicherweise durchbrochen werden. Da die CCL22-Induktion nicht mit der Hochregulation anderer inflammatorischer Zytokine einher ging, ist bei selektiver Blockade dieses Signalwegs mit geringen Nebenwirkungen auf andere inflammatorische Reaktionen zu rechnen. Dies macht ihn zu einem attraktiven Ziel in der immunologischen Tumorthherapie.

4.4 CCL22-produzierende Zellen myeloischen Ursprungs und FoxP3-positive Zellen finden sich in hoher Zahl in der Leber von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom

Das HCC ist die fünfthäufigste Tumorerkrankung weltweit und auf dem dritten Platz der führenden Krebstodesursachen [Parkin et al. 2001]. Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des hepatozellulären Karzinoms spielt das Immunsystem eine zentrale Rolle. So ist die chronische Infektion mit Hepatitis B Virus oder Hepatitis C Virus einer der Hauptrisikofaktoren für das HCC [El-Serag 2011] und die Höhe und Zusammensetzung der intratumoralen lymphozytären Infiltration ist von großer prognostischer Bedeutung [Wada et al. 1998]. Auch Treg finden sich in hoher Anzahl in Tumor, intratumoralen Lymphozyteninfiltraten, Aszites und peripherem Blut von HCC-Patienten [Wada et al. 1998; Ormandy et al. 2005]. Welche Stimuli zur Akkumulation von Treg im HCC führen, ist jedoch noch nicht bekannt. Da CCL22 bereits in anderen Tumoren mit der Rekrutierung von Treg in Verbindung gebracht wurde [Curiel et al. 2004], wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Chemokins beim hepatozellulären Karzinom untersucht.

Bei der Analyse der auf CCL22 und den für Treg spezifischen Transkriptionsfaktor FoxP3 doppelgefärbten Gewebeschnitte eines Kollektivs von 101 HCC-Patienten zeigte sich eine deutliche Infiltration des peritumoralen Stromas und des Leberstromas durch CCL22-positive Immunzellen. Die CCL22-exprimierenden Zellen waren morphologisch myeloischen Ursprungs, also Makrophagen oder dendritischen Zellen ähnlich, und es ließ sich keine CCL22-Expression durch Tumorzellen feststellen. Dies deckt sich mit unseren bereits beschriebenen *in vitro* Ergebnissen, welche dendritische Zellen im Mausmodell als CCL22-Hauptproduzenten identifizierten. Des Weiteren fanden sich zahlreiche FoxP3-positive Lymphozyten. In vielen Gewebeschnitten fanden sich zugleich CCL22- und FoxP3-positive Zellen, welche auch häufig in örtlicher Beziehung zueinander standen. Dennoch ergab sich bei der statistischen Analyse keine Korrelation zwischen der Höhe der Infiltration mit CCL22-exprimierenden Zellen und dem Infiltrationsgrad mit FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen. Daten zur mikroskopischen Infiltration mit CCL22-exprimierenden Zellen lassen sich in der Literatur vor allem für das Mammakarzinom finden. Bei der immunhistologischen

Untersuchung von Mammakarzinomen konnte, wie auch in der vorliegenden Arbeit, CCL22-Expression durch DC-ähnliche Zellen, also Zellen der myeloischen Stammreihe, nachgewiesen werden [Gobert et al. 2009; Anz et al. 2011]. Im Gegensatz zu unserer Arbeit zeigte sich im Mammakarzinom jedoch zugleich CCL22-Expression in den Tumorzellen und es konnte eine statistische Korrelation zwischen der Anzahl an CCL22-positiven und FoxP3-positiven Zellen gesehen werden [Gobert et al. 2009; Anz et al. 2011]. Bisher existieren nach unseren Kenntnissen keine Daten zur Infiltration mit CCL22-positiven Zellen beim hepatozellulären Karzinom. In einer Studie wird hingegen dem Chemokin CCL20 eine Rolle in der Rekrutierung von CCR6-Rezeptor-exprimierenden regulatorischen T-Zellen zum hepatozellulären Karzinom zugeschrieben, wobei die Anzahl an CCL20-positiven Tumorzellen mit der Infiltration durch Treg korreliert [Chen et al. 2011]. Chen et al. konnten hierbei keine erhöhte CCL22-mRNA-Expression im HCC im Vergleich zu tumorfreiem Lebergewebe feststellen. Im Gegensatz dazu fanden wir in der vorliegenden Arbeit in fast allen untersuchten HCC-Gewebeschnitten CCL22-Expression, wobei peritumoral häufig hohe Zahlen CCL22-positiver Zellen festgestellt werden konnten. In der oben genannten Studie wurden lediglich CCL22-mRNA-Level gemessen, es fand jedoch keine immunhistologische Auswertung der Infiltration durch CCL22-exprimierende Zellen statt. Für die Untersuchungen unserer Arbeit lag hingegen kein gesundes Lebergewebe zur Vergleichsanalyse vor. Daher muss in weiteren immunhistologischen Untersuchungen geklärt werden, inwiefern sich HCC und gesundes Lebergewebe hinsichtlich ihrer Infiltration durch CCL22-exprimierende Zellen unterscheiden.

Die Datenlage zum Einfluss von Treg auf Entstehung und Krankheitsfortschritt des HCC ist umfangreicher. Eine erhöhte Anzahl an Treg wurde bei HCC-Patienten in Blut, Aszites, Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und intratumoral beschrieben [Ormandy et al. 2005; Fu et al. 2007; Chen et al. 2011]. Es ließen sich keine eindeutigen Daten zum Verteilungsmuster von Treg in Bezug auf den Tumor finden. Während beim HCC eine vor allem intratumorale Akkumulation der Treg mit engem Kontakt zwischen Treg und Tumorzellen beschrieben ist [Ormandy et al. 2005; Fu et al. 2007; Chen et al. 2011], konnte beim *Lewis* Lungenkarzinom Treg-Infiltration vor allem im peritumoralen Stroma beobachtet werden [Mailloux and Young 2009]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden sowohl eine starke intratumorale Infiltration durch Treg als auch hohe peritumorale Treg-Ansammlungen um das HCC

beobachtet. Da nur die peritumoralen Treg in enger örtlicher Beziehung zu den CCL22-positiven Zellen standen, ist es denkbar, dass die intratumorale Infiltration durch weitere, uns unbekannte Faktoren begünstigt wird.

Wir konnten in der hier vorliegenden Arbeit keine statistisch signifikante Auswirkung von Infiltration mit Treg oder CCL22-positiven Zellen auf das Überleben von HCC-Patienten beobachten. Tendenziell zeigte sich ein verschlechtertes Überleben bei CCL22-Infiltration im nicht Tumor-befallenen Leberepithel und –stroma, während die Höhe der CCL22-Infiltration in Tumor und peritumoralem Bindegewebe sich nicht auf das Überleben auswirkte. Da in der Literatur bisher keine Daten zu CCL22-exprimierenden Zellen im HCC und deren Einfluss auf die Prognose zu finden sind, muss dies durch weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl an Gewebeschnitten näher analysiert werden. Auch zwischen Treg-Infiltration und Überleben zeigte sich nur ein statistisch nicht signifikanter Zusammenhang. Jedoch ging Treg-Infiltration in allen von uns analysierten Bereichen – also intratumoral, peritumoral, in Leberepithel und –stroma – mit einer tendenziell verkürzten Überlebenszeit einher. Diese Beobachtung deckt sich mit Daten der Literatur, welche ein verlängertes rezidivfreies Überleben bei niedrigen intratumoralen Treg-Zahlen nach Leberresektion beschreiben [Gao et al. 2007]. Auch eine hohe Anzahl im Blut zirkulierender regulatorischer T-Zellen bei HCC-Patienten wurde mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [Fu et al. 2007]. Es wurde gezeigt, dass aus HCC-Patienten isolierte regulatorische T-Zellen die Aktivität und Proliferation zytotoxischer CD8-positiver Lymphozyten supprimieren und dass ein hoher Anteil an Treg in intratumoralen Lymphozyteninfiltraten mit hohen Krankheitsstadien einhergeht [Fu et al. 2007].

Um die prognostische Auswirkung intra- und peritumoraler CCL22-Sekretion genauer zu analysieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. Eine größere Anzahl an Gewebeschnitten muss untersucht werden und die Tumor-assoziierte CCL22-Expression auch mit gesundem Lebergewebe verglichen werden. Auch die Bedeutung des Chemokins CCL22 für die Rekrutierung von Treg zum HCC muss durch weiterführende Studien geklärt werden. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit deutliche CCL22-Expression im Tumor-angrenzenden Stroma beobachten, weshalb wir einen Einfluss von CCL22 auf das immunologische Tumormilieu für wahrscheinlich halten. Weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven

sind nötig, um den Einfluss der CCL22-Expression auf Stadium, Metastasierungsgrad, rezidivfreies Überleben und Mortalität des HCC aufzudecken.

5. Zusammenfassung

Die Erkenntnis, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumorzellen anzugreifen und zu vernichten, ist die Basis neuer, hoffnungsvoller Ansätze in der Krebstherapie. Um die körpereigene Abwehr gezielt im Kampf gegen Tumorerkrankungen einzusetzen ist es essentiell, genaue Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem zu erlangen. Dies impliziert das Verständnis der durch Tumoren induzierten Unterdrückung des Immunsystems. Eine Zellpopulation von großer Relevanz im durch Tumoren bedingten immunsuppressiven Milieu sind die regulatorischen T-Zellen (Treg). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Chemokins CCL22 in der Tumorbedingten Immunsuppression zu untersuchen. CCL22 ist in der Lage, Treg an den Ort des Tumors zu locken, wo diese wiederum die antitumorale Immunreaktion unterdrücken. Da erhöhte CCL22-Werte im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen bereits in der Literatur beschrieben waren, sollten hier zum Einen die Auswirkung eines erhöhten CCL22-Spiegels auf das Tumorstadium und zum Anderen die Mechanismen der Tumor-assoziierten CCL22-Hochregulation aufgedeckt werden.

In verschiedenen Mausmodellen wurden die intratumoralen sowie die systemischen CCL22-Spiegel gemessen und mit denen nicht tumortragender Tiere verglichen. Wir zeigten in mehreren unabhängigen murinen Tumormodellen, dass tumortragende Mäuse erhöhte CCL22-Spiegel intratumoral, in Serum, Splenozyten und Lymphknoten aufweisen. Dies wurde sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Um die Bedeutung der systemischen CCL22-Hochregulation zu untersuchen, wurde in einem murinen Kolonkarzinommodell das Tumorstadium mit und ohne subkutane Injektion von rekombinantem CCL22 untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass erhöhte CCL22-Level in einem signifikant schnellerem Tumorstadium resultierten. Zur näheren Untersuchung der Mechanismen der CCL22-Induktion wurden Kokulturen von murinen Splenozyten und humanen PBMC mit murinen und humanen Tumorzellen und deren zellfreien Kulturüberständen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikante CCL22-Hochregulation in den Immunzellen durch Kokultivierung mit Tumorzellen sowie deren zellfreiem Überstand, während keine CCL22-Produktion durch Tumorzellen selbst

nachgewiesen werden konnte. Die CCL22-Induktion in Immunzellen war unabhängig von den Transkriptionsfaktoren Stat3 und NFκB und es wurden abgesehen von CCL22 keine weiteren inflammatorischen Zytokine durch Tumorzellen hochreguliert. Wir zeigten weiterhin, dass die CCL22-Hochregulation in Immunzellen durch einen von murinen und humanen Tumorzellen sezernierten löslichen Faktor bedingt war, welcher in weiteren Analysen als Protein von einer Molekülgröße größer als 100 kD identifiziert wurde.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Ausschüttung eines löslichen Proteins durch Tumorzellen, welches die spezifische Hochregulation von CCL22 in Immunzellen hervorruft. Dies wiederum resultiert in einem signifikanten Wachstumsvorteil für den Tumor. Die Charakterisierung und Identifizierung des CCL22-induzierenden Faktors sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. Eine Durchbrechung der CCL22-Induktion könnte in Zukunft eine neue Strategie in der Immuntherapie von Tumoren darstellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ein erster Schritt auf diesem Weg.

Literaturverzeichnis

- Akira, S. and H. Hemmi. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85(2): 85-95.
- Andrew, D. P., M. S. Chang, J. McNinch, S. T. Wathen, M. Rihaneck, J. Tseng, J. P. Spellberg and C. G. Elias, 3rd. 1998. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 161(9): 5027-5038.
- Anz, D., S. Eiber, C. Scholz, S. Endres, T. Kirchner, C. Bourquin and D. Mayr. 2011. In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8+ to FoxP3+ cells is characteristic for the medullary subtype. *Histopathology* 59(5): 965-974.
- Aruga, A., E. Aruga, K. Tanigawa, D. K. Bishop, V. K. Sondak and A. E. Chang. 1997. Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J Immunol* 159(2): 664-673.
- Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190(7): 995-1004.
- Austyn, J. M. 1992. Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin Immunol* 4(4): 227-236.
- Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.
- Bates, G. J., S. B. Fox, C. Han, R. D. Leek, J. F. Garcia, A. L. Harris and A. H. Banham. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24(34): 5373-5380.
- Berin, M. C., M. B. Dwinell, L. Eckmann and M. F. Kagnoff. 2001. Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(6): G1217-1226.
- Bishop, G. A. and B. S. Hostager. 2001. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 13(3): 278-285.
- Boden, E., Q. Tang, H. Bour-Jordan and J. A. Bluestone. 2003. The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 252: 55-63; discussion 63-56, 106-114.
- Bonecchi, R., S. Sozzani, J. T. Stine, W. Luini, G. D'Amico, P. Allavena, D. Chantry and A. Mantovani. 1998. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 92(8): 2668-2671.

- Boon, T., P. G. Coulie and B. Van den Eynde. 1997. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 18(6): 267-268.
- Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski and R. L. Modlin. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285(5428): 732-736.
- Bromberg, J. F., M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese and J. E. Darnell, Jr. 1999. *Stat3 as an oncogene*. *Cell* 98(3): 295-303.
- Butel, J. S. 2000. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21(3): 405-426.
- Catlett-Falcone, R., T. H. Landowski, M. M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J. L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W. S. Dalton and R. Jove. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10(1): 105-115.
- Chandel, N. S., W. C. Trzyna, D. S. McClintock and P. T. Schumacker. 2000. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 165(2): 1013-1021.
- Chang, D. K., J. Sui, S. Geng, A. Muvaffak, M. Bai, R. C. Fuhlbrigge, A. Lo, A. Yammanuru, L. Hubbard, J. Sheehan, J. J. Campbell, Q. Zhu, T. S. Kupper and W. A. Marasco. 2012. Humanization of an anti-CCR4 antibody that kills cutaneous T-cell lymphoma cells and abrogates suppression by T-regulatory cells. *Mol Cancer Ther* 11(11): 2451-2461.
- Chen, K. J., S. Z. Lin, L. Zhou, H. Y. Xie, W. H. Zhou, A. Taki-Eldin and S. S. Zheng. 2011. Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis. *PLoS One* 6(9): e24671.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198(12): 1875-1886.
- Coussens, L. M. and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-867.
- Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10(9): 942-949.
- Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr and G. R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164): 1415-1421.

- Derre, L., M. Corvaisier, B. Charreau, A. Moreau, E. Godefroy, A. Moreau-Aubry, F. Jotereau and N. Gervois. 2006. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* 177(5): 3100-3107.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8(8): 793-800.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11): 991-998.
- Dunn, G. P., K. C. Sheehan, L. J. Old and R. D. Schreiber. 2005. IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer Res* 65(8): 3447-3453.
- El-Serag, H. B. 2011. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 365(12): 1118-1127.
- Ezekowitz, R. A. B. and J. A. Hoffmann. 1996. Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8(1): 1-2.
- Faget, J., C. Biota, T. Bachelot, M. Gobert, I. Treilleux, N. Goutagny, I. Durand, S. Leon-Goddard, J. Y. Blay, C. Caux and C. Menetrier-Caux. 2011. Early Detection of Tumor Cells by Innate Immune Cells Leads to Treg Recruitment through CCL22 Production by Tumor Cells. *Cancer Res* 71(19): 6143-6152.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201(5): 737-746.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4): 330-336.
- Fu, J., D. Xu, Z. Liu, M. Shi, P. Zhao, B. Fu, Z. Zhang, H. Yang, H. Zhang, C. Zhou, J. Yao, L. Jin, H. Wang, Y. Yang, Y. X. Fu and F. S. Wang. 2007. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 132(7): 2328-2339.
- Fujii, S., K. Shimizu, T. Shimizu and M. T. Lotze. 2001. Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ. *Blood* 98(7): 2143-2151.
- Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze and J. J. Lafaille. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196(6): 851-857.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2(10): 1096-1103.

- Gao, Q., S. J. Qiu, J. Fan, J. Zhou, X. Y. Wang, Y. S. Xiao, Y. Xu, Y. W. Li and Z. Y. Tang. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 25(18): 2586-2593.
- Garcia-Lora, A., M. Martinez, I. Algarra, J. J. Gaforio and F. Garrido. 2003. MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int J Cancer* 106(4): 521-527.
- Gershon, R. K. and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18(5): 723-737.
- Ghia, P., G. Strola, L. Granziero, M. Geuna, G. Guida, F. Sallusto, N. Ruffing, L. Montagna, P. Piccoli, M. Chilosi and F. Caligaris-Cappio. 2002. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 32(5): 1403-1413.
- Ghia, P., P. Transidico, J. P. Veiga, C. Schaniel, F. Sallusto, K. Matsushima, S. E. Sallan, A. G. Rolink, A. Mantovani, L. M. Nadler and A. A. Cardoso. 2001. Chemoattractants MDC and TARC are secreted by malignant B-cell precursors following CD40 ligation and support the migration of leukemia-specific T cells. *Blood* 98(3): 533-540.
- Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A. C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J. Y. Blay and C. Menetrier-Caux. 2009. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69(5): 2000-2009.
- Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani and P. W. Gray. 1997. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 185(9): 1595-1604.
- Grivennikov, S. I. and M. Karin. 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(1): 11-19.
- Groh, V., J. Wu, C. Yee and T. Spies. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419(6908): 734-738.
- Hehner, S. P., M. Heinrich, P. M. Bork, M. Vogt, F. Ratter, V. Lehmann, K. Schulze-Osthoff, W. Droge and M. L. Schmitz. 1998. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J Biol Chem* 273(3): 1288-1297.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-745.
- Herber, D. L., W. Cao, Y. Nefedova, S. V. Novitskiy, S. Nagaraj, V. A. Tyurin, A. Corzo, H. I. Cho, E. Celis, B. Lennox, S. C. Knight, T. Padhya, T. V. McCaffrey, J. C. McCaffrey, S. Antonia, M. Fishman, R. L. Ferris, V. E. Kagan and D. I.

- Gabrilovich. 2010. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med* 16(8): 880-886.
- Hino, R., M. Kobayashi, T. Mori, H. Orimo, T. Shimauchi, K. Kabashima and Y. Tokura. 2007. Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol* 156(5): 830-837.
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge and S. Hirohashi. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12(18): 5423-5434.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos and W. J. Urba. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(8): 711-723.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609): 1057-1061.
- Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino and S. H. Chen. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66(2): 1123-1131.
- Iellem, A., L. Colantonio, S. Bhakta, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Sinigaglia and D. D'Ambrosio. 2000. Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol* 30(4): 1030-1039.
- Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia and D. D'Ambrosio. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194(6): 847-853.
- Imai, T., D. Chantry, C. J. Raport, C. L. Wood, M. Nishimura, R. Godiska, O. Yoshie and P. W. Gray. 1998. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273(3): 1764-1768.
- Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima and O. Yoshie. 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11(1): 81-88.
- Ishida, T., T. Ishii, A. Inagaki, H. Yano, H. Komatsu, S. Iida, H. Inagaki and R. Ueda. 2006. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res* 66(11): 5716-5722.

- Ishida, T., A. Utsunomiya, S. Iida, H. Inagaki, Y. Takatsuka, S. Kusumoto, G. Takeuchi, S. Shimizu, M. Ito, H. Komatsu, A. Wakita, T. Eimoto, K. Matsushima and R. Ueda. 2003. Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clin Cancer Res* 9(10 Pt 1): 3625-3634.
- Jacobs, J. F., A. J. Idema, K. F. Bol, J. A. Grotenhuis, I. J. de Vries, P. Wesseling and G. J. Adema. 2010. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol* 225(1-2): 195-199.
- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath and S. P. Schoenberger. 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421(6925): 852-856.
- Jiang, Q., S. Akashi, K. Miyake and H. R. Petty. 2000. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 165(7): 3541-3544.
- Josefowicz, S. Z. and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30(5): 616-625.
- Klausner, R. D., J. G. Donaldson and J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116(5): 1071-1080.
- Koebel, C. M., W. Vermi, J. B. Swann, N. Zerafa, S. J. Rodig, L. J. Old, M. J. Smyth and R. D. Schreiber. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450(7171): 903-907.
- Kortylewski, M., M. Kujawski, T. Wang, S. Wei, S. Zhang, S. Pilon-Thomas, G. Niu, H. Kay, J. Mule, W. G. Kerr, R. Jove, D. Pardoll and H. Yu. 2005. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 11(12): 1314-1321.
- Lelekakis, M., J. M. Moseley, T. J. Martin, D. Hards, E. Williams, P. Ho, D. Lowen, J. Javni, F. R. Miller, J. Slavin and R. L. Anderson. 1999. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 17(2): 163-170.
- Li, H., Y. Han, Q. Guo, M. Zhang and X. Cao. 2009. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 182(1): 240-249.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure and D. C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169(5): 2756-2761.
- Mailloux, A. W., A. M. Clark and M. R. Young. 2010. NK depletion results in increased CCL22 secretion and Treg levels in Lewis lung carcinoma via the accumulation of CCL22-secreting CD11b+CD11c+ cells. *Int J Cancer* 127(11): 2598-2611.

- Mailloux, A. W. and M. R. Young. 2009. NK-dependent increases in CCL22 secretion selectively recruits regulatory T cells to the tumor microenvironment. *J Immunol* 182(5): 2753-2765.
- Mantovani, A., P. A. Gray, J. Van Damme and S. Sozzani. 2000. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 68(3): 400-404.
- Maruyama, T., K. Kono, S. Izawa, Y. Mizukami, Y. Kawaguchi, K. Mimura, M. Watanabe and H. Fujii. 2010. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 23(5): 422-429.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3): 295-298.
- Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai and H. Fujii. 2008. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 122(10): 2286-2293.
- Mori, N., Y. Yamada, S. Ikeda, Y. Yamasaki, K. Tsukasaki, Y. Tanaka, M. Tomonaga, N. Yamamoto and M. Fujii. 2002. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 100(5): 1828-1834.
- Munro, H. N., B. S. Baliga and A. W. Pronczuk. 1968. In vitro inhibition of peptide synthesis and GTP hydrolysis by cycloheximide and reversal of inhibition by glutathione. *Nature* 219(5157): 944-946.
- Nemazee, D. 2000. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 18: 19-51.
- Old, L. J. and E. A. Boyse. 1964. Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med* 15: 167-186.
- Olkhanud, P. B., D. Baatar, M. Bodogai, F. Hakim, R. Gress, R. L. Anderson, J. Deng, M. Xu, S. Briest and A. Biragyn. 2009. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res* 69(14): 5996-6004.
- Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita and E. Nakayama. 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59(13): 3128-3133.
- Ormandy, L. A., T. Hillemann, H. Wedemeyer, M. P. Manns, T. F. Greten and F. Korangy. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65(6): 2457-2464.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94(2): 153-156.
- Pelham, H. R. 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 67(3): 449-451.

- Pierce, J. W., R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S. A. Moore, T. Collins and M. E. Gerritsen. 1997. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272(34): 21096-21103.
- Pilette, C., J. N. Francis, S. J. Till and S. R. Durham. 2004. CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *Eur Respir J* 23(6): 876-884.
- Radoja, S., T. D. Rao, D. Hillman and A. B. Frey. 2000. Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 164(5): 2619-2628.
- Rawal, S., F. Chu, M. Zhang, H. J. Park, D. Nattamai, S. Kannan, R. Sharma, D. Delgado, T. Chou, H. Y. Lin, V. Baladandayuthapani, A. Luong, F. Vega, N. Fowler, C. Dong, R. E. Davis and S. S. Neelapu. 2013. Cross talk between follicular Th cells and tumor cells in human follicular lymphoma promotes immune evasion in the tumor microenvironment. *J Immunol* 190(12): 6681-6693.
- Restifo, N. P., F. M. Marincola, Y. Kawakami, J. Taubenberger, J. R. Yannelli and S. A. Rosenberg. 1996. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 88(2): 100-108.
- Rodenburg, R. J., R. F. Brinkhuis, R. Peek, J. R. Westphal, F. H. Van Den Hoogen, W. J. van Venrooij and L. B. van de Putte. 1998. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC) mRNA in macrophages is enhanced by interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha, and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 63(5): 606-611.
- Rubinstein, N., M. Alvarez, N. W. Zwirner, M. A. Toscano, J. M. Ibarregui, A. Bravo, J. Mordoh, L. Fainboim, O. L. Podhajcer and G. A. Rabinovich. 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5(3): 241-251.
- Russell, J. H. and T. J. Ley. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20: 323-370.
- Saadane, A., S. Masters, J. DiDonato, J. Li and M. Berger. 2007. Parthenolide inhibits I κ B kinase, NF- κ B activation, and inflammatory response in cystic fibrosis cells and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(6): 728-736.
- Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101(5): 455-458.
- Sakaguchi, S. and F. Powrie. 2007. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317(5838): 627-629.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3): 1151-1164.

- Sasada, T., M. Kimura, Y. Yoshida, M. Kanai and A. Takabayashi. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98(5): 1089-1099.
- Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18538-18543.
- Schall, T. J. and K. B. Bacon. 1994. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 6(6): 865-873.
- Schaniel, C., E. Pardali, F. Sallusto, M. Speletas, C. Ruedl, T. Shimizu, T. Seidl, J. Andersson, F. Melchers, A. G. Rolink and P. Sideras. 1998. Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J Exp Med* 188(3): 451-463.
- Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2(10): 947-950.
- Schreiber, R. D., L. J. Old and M. J. Smyth. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331(6024): 1565-1570.
- Schust, J., B. Sperl, A. Hollis, T. U. Mayer and T. Berg. 2006. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol* 13(11): 1235-1242.
- Schutte, K., J. Bornschein and P. Malfertheiner. 2009. Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 27(2): 80-92.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832): 1107-1111.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2(2): 116-126.
- Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff and K. L. Rock. 1997. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158(6): 2723-2730.
- Shimizu, J., S. Yamazaki and S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163(10): 5211-5218.
- Shortman, K. and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3): 151-161.

- Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, E. Cretney, J. A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S. B. Pelikan, N. Y. Crowe and D. I. Godfrey. 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191(4): 661-668.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, D. MacGregor, D. I. Godfrey and J. A. Trapani. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192(5): 755-760.
- Srivastava, M. K., P. Sinha, V. K. Clements, P. Rodriguez and S. Ostrand-Rosenberg. 2010. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* 70(1): 68-77.
- Stern-Ginossar, N., C. Gur, M. Biton, E. Horwitz, M. Elboim, N. Stanietsky, M. Mandelboim and O. Mandelboim. 2008. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* 9(9): 1065-1073.
- Street, S. E., J. A. Trapani, D. MacGregor and M. J. Smyth. 2002. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196(1): 129-134.
- Sugiyama, D., H. Nishikawa, Y. Maeda, M. Nishioka, A. Tanemura, I. Katayama, S. Ezoe, Y. Kanakura, E. Sato, Y. Fukumori, J. Karbach, E. Jager and S. Sakaguchi. 2013. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(44): 17945-17950.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 160(3): 1212-1218.
- Tsujikawa, T., T. Yaguchi, G. Ohmura, S. Ohta, A. Kobayashi, N. Kawamura, T. Fujita, H. Nakano, T. Shimada, T. Takahashi, R. Nakao, A. Yanagisawa, Y. Hisa and Y. Kawakami. 2013. Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 132(12): 2755-2766.
- Unitt, E., A. Marshall, W. Gelson, S. M. Rushbrook, S. Davies, S. L. Vowler, L. S. Morris, N. Coleman and G. J. Alexander. 2006. Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J Hepatol* 45(2): 246-253.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon and B. J. Van den Eynde. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9(10): 1269-1274.
- Vesely, M. D., M. H. Kershaw, R. D. Schreiber and M. J. Smyth. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29: 235-271.
- Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani and K. Matsushima. 1999.

Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 104(8): 1097-1105.

Villablanca, E. J., L. Raccosta, D. Zhou, R. Fontana, D. Maggioni, A. Negro, F. Sanvito, M. Ponzoni, B. Valentini, M. Bregni, A. Prinetti, K. R. Steffensen, S. Sonnino, J. A. Gustafsson, C. Doglioni, C. Bordignon, C. Traversari and V. Russo. 2010. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16(1): 98-105.

Vulcano, M., C. Albanesi, A. Stoppacciaro, R. Bagnati, G. D'Amico, S. Struyf, P. Transidico, R. Bonecchi, A. Del Prete, P. Allavena, L. P. Ruco, C. Chiabrando, G. Girolimoni, A. Mantovani and S. Sozzani. 2001. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 31(3): 812-822.

Wada, Y., O. Nakashima, R. Kutami, O. Yamamoto and M. Kojiro. 1998. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 27(2): 407-414.

Wagsater, D., O. Dienus, S. Lofgren, A. Hugander and J. Dimberg. 2008. Quantification of the chemokines CCL17 and CCL22 in human colorectal adenocarcinomas. *Mol Med Report* 1(2): 211-217.

Wang, T., G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabrilovich, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll and H. Yu. 2004. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10(1): 48-54.

Wrzesinski, S. H., Y. Y. Wan and R. A. Flavell. 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13(18 Pt 1): 5262-5270.

Yang, P., Q. J. Li, Y. Feng, Y. Zhang, G. J. Markowitz, S. Ning, Y. Deng, J. Zhao, S. Jiang, Y. Yuan, H. Y. Wang, S. Q. Cheng, D. Xie and X. F. Wang. 2012. TGF-beta-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 22(3): 291-303.

Yoong, K. F., G. McNab, S. G. Hubscher and D. H. Adams. 1998. Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 160(8): 3978-3988.

Yu, H., M. Kortylewski and D. Pardoll. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 7(1): 41-51.

Zlotnik, A. and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2): 121-127.

Abkürzungen

C

CCL	Chemokin (<i>c-c motif</i>)-Ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>

D

DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F

FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
FBS	Fetales bovines Serum
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>

H

HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase

I

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin

J

Jak	Januskinase
-----	-------------

K

kD	Kilodalton
----	------------

L

LPS Lipopolysaccharid

M

MACS *Magnetic-activated cell sorting*

MDSC *Myeloid-derived suppressor cell*

MHC *Major histocompatibility complex*

mRNA *Messenger-Ribonukleinsäure*

N

NFκB *Nuclear factor kappa B*

NK Natürliche Killerzelle

NKG2D *Natural killer group 2, member D*

NOD/SCID *Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency*

ns Nicht signifikant

P

PBMC Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR Polymerasekettenreaktion

Q

qRT-PCR Quantitative *real-time*-PCR

R

RNA Ribonukleinsäure

rt-PCR *Real-time*-PCR

S

sc Subkutan

Stat3 *Signal transducer and activator of transcription 3*

T

TAA Tumor-assoziiertes Antigen

TGF-β *Tumor growth factor beta*

TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
V	
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Publikationen

Manuskripte

Wiedemann G, Rapp M, Thaler R, Fessler J, Haubner S, Endres S, Anz D. Tumor cells induce CCL22 secretion by dendritic cells in a paracrine manner. Manuskript in Vorbereitung, 2014.

Vorträge

Wiedemann G. Tumor-derived Induction of CCL22 as a Mechanism of Immune Escape. 6th Annual Retreat Graduiertenkolleg 1202, Schloss Fürstenried, Deutschland, 2011.

Posterpräsentationen

Wiedemann G, Rapp M, Mayr D, Eiber S, Bourquin C, Endres S, Anz D. CCL22 in murine and human tumors is not produced by the tumor cells but by tumor-infiltrating immune cells. *World Immune Regulation Meeting V*, Davos, Schweiz, 2011.

Wiedemann G, Rapp M, Kriegl L, Mayr D, de Toni E, Endres S, Anz D. Regulatory T cell-attracting chemokines in hepatocellular carcinoma. *Falk Workshop Inflammation and Cancer*, Hamburg, Deutschland, 2012.

Rapp M, Haubner S, Nagel S, **Wiedemann G**, Mayr D, Eiber S, Rothenfusser S, Bourquin C, Endres S, Anz D. CCL22 in murine and human tumors is derived from tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells. *China Tregs 2012 Conference*, Shanghai, China, 2012.

Danksagung

Mein Dank geht zunächst an meinen Doktorvater Prof. Stefan Endres für die Möglichkeit, unter der Förderung des Graduiertenkollegs in der Abteilung für Klinische Pharmakologie meine Dissertation abzulegen.

Bei Dr. med. David Anz möchte ich mich für die Überlassung der spannenden Thematik bedanken, außerdem für die engagierte Betreuung während meiner Dissertation und die über die Dissertation hinaus reichende Unterstützung. Seine Begeisterung für die Wissenschaft war immer wieder ansteckend und inspirierend.

Bei dem gesamten Team der Klinischen Pharmakologie möchte ich mich bedanken für ein motiviertes und zugleich lockeres, zwischenmenschlich angenehmes Arbeitsklima und für anregende Diskussionen bei den Lab Meetings. Mein spezieller Dank geht an Moritz Rapp für das Erlernen zahlreicher wissenschaftlicher Methoden und die geduldige Unterstützung und Hilfe während meiner gesamten Laborzeit.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die private Unterstützung während dieser Zeit. Mein Dank geht außerdem an Herrn Cajetan Lang für sein Verständnis sowie für den Rückhalt und Ansporn in privater wie in wissenschaftlicher Hinsicht.