

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrum-München

Regulation Tumor-infiltrierender dendritischer Zellen:  
Reifung, Funktion und zelluläre Interaktion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Jakob Weiß aus Herrenberg

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Mitberichterstatter: PD. Dr. Sebastian Kobold

Prof. Dr. Alexander Dietrich

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Lymphome.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Vorteile von Spontantumormodellen .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Stand der Forschung.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>13</b>
2.1.1 Mäuse .....	13
2.1.2 Zelllinien .....	13
2.1.3 Chemikalien.....	14
2.1.4 Zellkulturmedien.....	15
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	16
2.1.6 Antikörper .....	17
2.1.7 Peptide .....	18
2.1.8 Kommerzielle Analysesysteme.....	18
2.1.9 Geräte und Sonstiges .....	18
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	20
2.2.2 Immunologische Methoden .....	23
2.2.3 Immunisierung mit Hämagglutinin-Ovalalbumin (HA-OVA) .....	24
2.2.4 <i>In-vivo</i> -Versuch – Injektion von rekombinantem IFN- $\gamma$ in c-myc-Mäuse .....	25
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Aktivierung dendritischer Zellen in c-myc-Tumoren.....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Kokultur mit primären c-myc-Tumoren.....	26
3.1.2 Kokultur mit 291-Zellen.....	27
3.1.3 Kokultur in zellfreiem Tumorüberstand.....	27
3.1.4 Die Rolle von HSP70.....	28
3.1.5 DC-NK-Zell-Interaktion.....	30
<b>3.2 Die Rolle des Zytokinmilieus .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Veränderung des Zytokinmilieus.....	33

3.2.2	Intratumorale Injektion von IFN- $\gamma$ .....	33
3.2.3	IL-10-Neutralisation <i>in vitro</i> .....	34
<b>3.3</b>	<b>Dendritische Zellen im NKG2D-defizienten Mausmodell .....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Der NKG2D-Rezeptor.....	36
3.3.2	Phänotypisierung der DCs.....	36
3.3.3	LPS-Stimulation phänotypisch supprimierter DCs .....	37
3.3.4	Zytokinexpression in dendritischen Zellen.....	38
3.3.5	Kokultur mit Tumoren aus NKG2D-defizienten Mäusen.....	40
3.3.6	Die Rolle von IFN- $\gamma$ – Manipulationsversuche <i>in vitro</i> .....	41
3.3.7	DC-NK-Zell-Interaktion im NKG2D-defizienten Modell.....	41
3.3.8	Immunantwort NKG2D-defizienter Mäuse .....	44
3.3.9	Funktionalität dendritischer Zellen im NKG2D-defizienten Modell .....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1	Die Aktivierung dendritischer Zellen .....	49
4.2	Das Zytokinmilieu und die Konsequenzen seiner immunsuppressiven Alteration 51	
4.3	T-Zell-Stimulation im NKG2D-defizienten Tumor-Modell.....	52
4.4	Immunantwort NKG2D-defizienter Mäuse .....	53
4.5	Ausblick .....	55
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>61</b>

## Abkürzungen

AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
arm.	armenischer
Ax	Alexa
BL	Burkitt-Lymphom
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DCs	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay
FACS	fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer (fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum (FCS)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HA	Hämagglutinin
IFA	Incomplete Freud's adjuvant
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid

MACS	magnet-aktivierte Zellseparation (magnetic activated cell sorting)
MEM	modifiziertes Eagle-Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
Min.	Minute
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2, Mitglied D
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
Pac	Pacific
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PMA	1-Methoxypropyl-2-Acetat
regDC	regulatorische dendritische Zellen
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
Sek.	Sekunde
Strep	Streptomycin
Th	T-Helfer-Zelle
Treg	regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle dendritischer Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell untersucht. In diesem Modell führt die Translokation des c-myc-Onkogens zur spontanen Entwicklung von B-Zell-Lymphomen, welche die Situation humaner Burkitt-Lymphome widerspiegeln.

Es konnte gezeigt werden, dass die Tumor-infiltrierenden DCs phänotypisch aktiviert sind und dass die Aktivierung zellkontaktabhängig durch die Tumorzellen vermittelt wird. Außerdem wurde die Bedeutung des IL-10-dominierten immunsuppressiven Zytokinmilieus analysiert, das durch die Tumorzellen generiert wird. Dabei konnte demonstriert werden, dass die hohen IL-10-Spiegel eine Differenzierung zu regulatorischen DCs begünstigen und für deren supprimierte IL-12-Produktion mitverantwortlich sind. Darüber hinaus wurde die DC-NK-Zell-Interaktion in den Tumoren untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die wechselseitige Aktivierung zwischen DCs und NK-Zellen durch die Tumorzellen und deren Milieu eingeschränkt wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung des NKG2D-Rezeptors und sein Einfluss auf die Funktionalität dendritischer Zellen untersucht. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um ein Zell-aktivierendes Oberflächenmolekül, das hauptsächlich auf NK-Zellen, aber auch auf Makrophagen und CD8<sup>+</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>-Zellen gefunden wird. Für die Untersuchungen wurden die oben erwähnten myc-transgenen Mäuse verwendet, die aber zusätzlich eine Defizienz für den NKG2D-Rezeptor aufwiesen.

Das Fehlen des Rezeptors zeigt deutliche Auswirkungen auf die Maturierung der DCs, nicht jedoch auf ihre Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Außerdem scheint die Rezeptordefizienz die IFN- $\gamma$ -Expression der NK-Zellen zu deregulieren, da diese eine höhere IFN- $\gamma$ -Produktion als WT-NK-Zellen zeigen. Dies führt u.a. zu einer weitreichenden Veränderung des Zytokinmilieus im Vergleich zu den myc-transgenen NKG2D-kompetenten Mäusen. So wurde beobachtet, dass die gesteigerten IFN- $\gamma$ -Spiegel einen Einfluss auf die IL-12-Produktion der DCs haben. Auch die wechselseitige Aktivierung zwischen DCs und NK-Zellen kann, im Gegensatz zu den myc-transgenen NKG2D-kompetenten Mäusen wieder effektiv ablaufen. In einem Immunisierungsversuch konnte darüber hinaus die Bedeutung des veränderten Zytokinmilieus auf die humorale Immunantwort demonstriert werden.

Insgesamt konnte so zu einem besseren Verständnis der DCs im c-myc-Modell beigetragen und Aspekte der zellulären Interaktion und Funktion aufgeklärt werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Lymphome

Die zentrale Frage tumorimmunologischer Forschung ist das Verständnis der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem [1]. Entscheidend für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte ist einerseits die Entschlüsselung der verschiedenen Tumorevasionsstrategien, andererseits das Verständnis der Interaktion zwischen den verschiedenen Komponenten des Immunsystems [2]. Ziel dieser Forschung ist es, ein besseres Verständnis über die Mechanismen der organismuseigenen Antitumor-Immunität zu erlangen um diese gezielt für neue Therapieansätze aktivieren und nutzen zu können [3, 4].

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Antworten auf einige dieser Fragen an einem Lymphom-Modell der Maus zu erarbeiten.

Lymphome sind Neoplasien, die von lymphatischen Zellen ausgehen. Sie werden unterteilt in die zwei großen Untergruppen der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome [5, 6]. Je nachdem von welcher Zelllinie die Zellen entarten, unterscheidet man B-Zell- (über 80%) und T-Zell-Lymphome. Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist der klinische Verlauf von schnell proliferierenden, hoch malignen und niedrig malignen, indolenten Lymphomen [7].

Das in dieser Arbeit verwendete Maus-Modell spiegelt die Situation des humanen Burkitt-Lymphoms (BL) wider. Das BL nimmt aus folgenden Gründen eine zentrale Rolle in der gesamten Tumorforschung ein: Es war der erste Tumor, für dessen Onkogenese ein Zusammenhang mit einer Virusinfektion nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus war es einer der ersten Tumoren, bei dem der Mechanismus der Translokation eines Onkogens mit anschließend konstitutiver Expression und daraus resultierender Tumorgenese entdeckt wurde und für den ein gehäuftes Auftreten mit HIV festgestellt wurde [8].

Klinisch teilt die WHO das BL in drei Subgruppen ein: das endemische, das sporadische und das Immundefizit-assoziierte Lymphom [9]. Charakteristisch für alle Formen ist die typische Histologie mit dem „Sternenhimmel“-Phänomen und die Translokation des Transkriptionsfaktors und Onkogens *c-myc* [10-12].

Dank intensiver Forschung in den letzten Jahren steht heute eine ganze Reihe effektiver Therapieverfahren für die unterschiedlichen Lymphome zu Verfügung [13]. Je nach Stadium und

Typ sind mittlerweile Heilungsraten zwischen 50 und 90 Prozent möglich [6]. Trotzdem ist die Situation verfügbarer Therapieoptionen keineswegs befriedigend. Insbesondere neue individualisierte Immuntherapieverfahren finden bisher wenig Anwendung im klinischen Alltag.

Dies macht weitere Forschung unerlässlich, um neue, in der Grundlagenforschung generierte Erkenntnisse in die unmittelbare Patientenversorgung zu überführen [14]. Wichtig sind hierfür insbesondere Spontantumormodelle, da sie die Situation in humanen Tumoren realitätsnah modellieren [15, 16]. Auf die Gründe dafür soll im Folgenden näher eingegangen werden.

## **1.2 Vorteile von Spontantumormodellen**

Lange Zeit fand Tumorforschung lediglich an transplantierbaren Modellen statt [17, 18]. Kultivierte Tumorzelllinien wurden als Bolus appliziert, um anschließend die Immunantwort zu analysieren. Dieser Ansatz weist zwei Nachteile auf. Zum einen entspricht die plötzliche Konfrontation des Immunsystems mit Fremdmaterial pathophysiologisch viel eher der Situation einer Infektion als der eines sich langsam endogen entwickelnden Tumors. Zum anderen handelt es sich bei den injizierten Zellen um eine monoklonale kultivierte Population und nicht um einen heterogenen sich spontan entwickelnden Zellverbund.

Durch Fortschritte in der Molekularbiologie und der Möglichkeit, transgene Organismen herzustellen, konnte diesem Problem begegnet werden [19, 20]. Durch die Überexpression von Onkogenen bzw. Suppression von Tumorsuppressorgenen wurde es möglich, Modelle zu etablieren, die die Situation im Menschen realitätsnah widerspiegeln [21]. Die autochthon spontan entstehenden Tumoren leiten sich von einzelnen maligne transformierten Zellen ab und gewährleisten so, im Gegensatz zu den transplantierbaren Modellen, eine kontinuierliche Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor(milieu) [22, 23].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten c-myc-Mäuse exprimieren das humane c-myc-Onkogen, welches durch den B-Zell-spezifischen Ig $\lambda$ -Enhancer reguliert wird. Dies führt dazu, dass die Mäuse nach 8-12 Wochen spontan ein dem menschlichen Burkitt-Lymphom vergleichbares Symptombild entwickeln, mit generalisierter Lymphadenopathie und Splenomegalie.

### **1.3 Stand der Forschung**

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass sich bei transplantierbaren Tumormodellen in Mäusen eine effektive Tumorabwehr etablieren lässt [24]. Dies beruht u.a. auf der Tatsache, dass Tumorzellen ihre MHC-I-Expression herunterregulieren und so durch „fehlendes Selbst“ von NK-Zellen erkannt und lysiert werden können [25]. Außerdem induzieren NK-Zellen sowie der Tumor eine rasche Aktivierung von DCs, die ihrerseits Tumorantigen der lysierten Zellen phagozytieren, präsentieren und so eine T-Zell-Antwort etablieren können.

Wenig war dagegen über die Situation in den oben erwähnten neuen Spontantumormodellen bekannt. Untersuchungen der NK-Zellen im c-myc-Modell haben ergeben, dass diese zwar einen aktivierten Phänotyp zeigen, aber in der IFN- $\gamma$ -Produktion und ihrer zytotoxischen Aktivität Defizite aufweisen [26, 27]. Auch die dendritischen Zellen zeigen einen deutlich aktivierten Phänotyp. Gleichzeitig verlieren sie jedoch die Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren und die für eine Th1-Antwort wichtigen Interleukine zu sezernieren [28]. Ein Th1-dominiertes Zytokinmilieu ist aber von essenzieller Bedeutung für eine erfolgreiche Tumor-Abstoßung [29, 30]. Diese Alterationen tragen maßgeblich zu einer defizienten Antitumor-Immunität bei und können die Tumorprogression begünstigen.

### **1.4 Ziele der Arbeit**

In dieser Arbeit soll im Besonderen die Bedeutung der dendritischen Zellen näher untersucht werden. Sie stehen schon lange im Zentrum der Infektions- und Tumorforschung, da sie aufgrund ihrer vermittelnden Rolle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem eine wichtige Position einnehmen [31, 32]. Außerdem sind sie dafür verantwortlich, eine spezifische und anhaltende Immunität einzuleiten [33, 34]. Auch in dem c-myc-Modell kommt den DCs diese Bedeutung zu. Der Einfluss der Tumorzellen und deren Milieu auf die verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems führen jedoch dazu, dass die dafür nötigen zellulären Interaktionen nicht mehr effektiv ablaufen können.

In der vorliegenden Arbeit soll u.a geklärt werden, welche Auswirkungen der Tumor und dessen Milieu auf die Aktivierung der DCs hat. Außerdem soll die DC-NK-Zell-Interaktion näher

charakterisiert werden und der Versuch unternommen werden, das Interleukinmilieu *in vitro* und *in vivo* künstlich zu verändern, mit dem Ziel, ein Zytokinmilieu zu generieren, das für eine effektive Th1-Antwort erforderlich ist.

Neben dem oben erwähnten c-myc-Mausmodell wurde in der Arbeitsgruppe Mocikat ein weiteres Mausmodell eingeführt, das eine Defizienz für den NKG2D-Rezeptor zeigt. Schon länger ist die wichtige Rolle des NKG2D-Rezeptors in der Infektions- und Tumorbekämpfung bekannt [35, 36]. So konnte in früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Expression des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen in Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Tumorkontrolle steht. Darüber hinaus konnte eine Beziehung zwischen dem NKG2D-Rezeptor und der IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen gezeigt werden [37]. In dieser Arbeit soll allgemein der Frage nachgegangen werden, welche Effekte das Fehlen des NKG2D-Rezeptors auf den Phänotyp und die Funktion der DCs und die DC-NK-Zell-Interaktion hat. Dabei soll sowohl der NKG2D-defiziente Genotyp (NKG2D<sup>-/-</sup>myc<sup>-/-</sup>) als auch der NKG2D-defiziente und myc-transgene Genotyp (NKG2D<sup>-/-</sup>myc<sup>+/+</sup>) untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mäuse

Alle unten aufgeführten Mäuse wurden im Tierstall des Hämatologikums gezüchtet. Die Genehmigung für deren experimentelle Verwendung wurde von der Landesregierung Oberbayern ausgestellt.

##### 2.1.1.1 *c-myc-Mäuse*

Die *c-myc*-Mäuse (genetischer Hintergrund C57BL/6) exprimieren das humane *c-myc* Onkogen unter der Kontrolle des  $I\gamma$ -Enhancers. Dies führt zum spontanen Auftreten eines endogenen B-Zell-Lymphoms innerhalb eines Zeitraums von 8 - 12 Wochen.

##### 2.1.1.2 *NKG2D-defiziente Mäuse*

Die NKG2D-defizienten Mäuse (ebenfalls C57BL/6-Hintergrund) wurden in den *c-myc*-Stamm eingekreuzt. Es wird vermutet, dass das Fehlen des Rezeptors die NK-Zell-Hilfe in der Tumorabstoßung reduziert, so dass die Lymphomentwicklung schneller vonstatten geht. Beide aus der Zucht hervorgehenden Genotypen ( $NKG2D^{-/-}myc^{-/-}$ ,  $NKG2D^{-/-}myc^{-/+}$ ) wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

##### 2.1.1.3 *BALB/c-Mäuse*

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

#### 2.1.2 Zelllinien

Für verschiedene Versuche wurden Zellkulturlinien verwendet:

A20 - Positivkontrolle bei Versuchen zur Expression von NKG2D-Liganden

RMA - Negativkontrolle bei Versuchen zur Expression von NKG2D-Liganden

CD26 – Positivkontrolle bei Versuchen zu Expression von HSP70

291 - B-Zell-Lymphomlinie, die aus oben genannten c-myc-Mäusen generiert wurde.

### 2.1.3 Chemikalien

CpG 1668	TIB, Molbiol, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
IFA	Sigma, Deisenhofen
LPS	Sigma, Deisenhofen
MEM-Medium	Biochrom AG, Berlin
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natrium-EDTA	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-OFF™	AppliChem GmbH, Darmstadt
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blue Stain	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.4 Zellkulturmedien

Standardmedium (5% Medium)	RPMI 1640 ohne L-Glutamin (500 ml) 25ml FKS inaktiviert 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin (200 mM) 5 ml Natriumpyruvat (100 mM) 5 ml nichtessentielle Aminosäuren (100x) 500 µl 2-Merkaptoethanol (50 mM)
T-Zell-Medium:	Standardmedium mit 10 % FKS.
DC-Medium:	Standardmedium mit 20 % FKS.
PMA/Ionomycin-Stimulationsmedium:	Standardmedium mit 10% FKS PMA 1:1000 Ionomycin 1:1000 Brefeldin A 1:1000
Einfriermedium:	90 % FKS, inaktiviert 10 % DMSO

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

FACS-Puffer:	500 ml PBS
	10 ml FKS
	5 ml Natriumazid (10 %ig)
	5 ml EDTA (0,5 M)
Lysepuffer pH 7,4(10x):	8,25 g Ammoniumchlorid
	1,00 g Kaliumhydrogencarbonat
	37 mg Na-EDTA
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 100 ml
	<i>nach BD Heidelberg</i>
Waschpuffer für MACS-Kits:	500 ml DPBS
	2,5 ml FKS
	2 ml Na-EDTA (0,5M)
ELISA-Puffer:	
ELISA-Blockierungspuffer	10 % FKS in PBS
ELISA-Carbonatpuffer	pH 9,5
	0,2 M Natriumcarbonat

(von AG Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie)

ELISA-Substratpuffer

TMB Substrate Reagent Set

Becton Dickinson, Heidelberg

ELISA-Waschpuffer

0,5 ‰ Tween in PBS

### 2.1.6 Antikörper

Antigen	Markierung	Isotyp	Klon	Spezies	Hersteller
CD11c	Ax700	IgG	N418	Ratte	Bio Legend
CD11b	Pac. Blue	IgG2b, κ	M1/70	Ratte	Bio Legend
CD80	PE	IgG2a	RMMP-1	Ratte	Serotec
CD83	Ax488	IgG1, κ	Michel-19	Ratte	Bio Legend
CD86	APC	IgG2a, κ	GL1	Ratte	BD
CD40	APC	IgG2a, κ	Mrz23	Ratte	Bio Legend
MHCII	FITC	IgG2a, κ	2G9	Ratte	BD
MHCII	FITC	IgM	28-16-8S	Maus	Caltag
HSP70	Ax488	IgG2a, κ	W27	Maus	Bio Legend
NKG2D	PE	IgG1, κ	CX5	Ratte	NautTec
IL-10	APC	IgG2b	JES5-16E3	Ratte	BD
IL-12	PE	IgG1	C15.6	Ratte	BD
IL-10- neutralisierender-	unlabeled	IgG1, κ	JES5-2A5	Ratte	eBioscience

Antikörper					
IFN $\gamma$ -neutralisierender-Antikörper	unlabeled	IgG1, $\kappa$	XMG1.2	Ratte	eBioscience
HSP70-neutralisierender-Antikörper	unlabeled			Hase	CellSignaling

### 2.1.7 Peptide

HA-OVA

AG Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie München

### 2.1.8 Kommerzielle Analysesysteme

Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Set

Becton Dickinson, Heidelberg

Fixation & Permeabilization Kit

eBioscience Inc., San Diego (USA)

CD11c Microbeads, mouse

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

NK1.1 Microbeads mouse

Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach

### 2.1.9 Geräte und Sonstiges

Biofuge pico

Heraeus, München

Brutschrank, Hera Cell 240

Heraeus, München

Einmalpipetten, 5/10/25 ml

Greiner, Frickenhausen

Eismaschine AF 100AS

Scotsman, Mailand (Italien)

ELISA-Lesegerät, Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA-Platten	Maxi-Sorp Nunc, Wiesbaden
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzzytometer, LSRII	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefriertruhe/-schrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kulturplatten, 6-/24-/96-Loch	Greiner, Frickenhausen
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette, Transferpette	Brand, Wertheim
mGM-CSF-haltiger	AG Mocikat, IMI München
Kulturüberstand (1 ng/µl)	
Reinstwasserherstellungssystem	
Neubauer-Zählkammer	neoLab, München
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipetten	Eppendorf/Gilson GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettenspitzen	Gilson/Greiner GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettierhilfe, accu jet pro	Brand, Wertheim
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Spectrophotometer ND-100	peqlab, Erlangen
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, München

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur fanden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Arbeitsmaterialien (Pipetten, -spitzen, Medien, Küvetten) statt. Für die Kultivierung der Zellen wurde ein Brutschrank der Firma Heraeus (Hera Cell 240) verwendet, der ein konstantes Kultivierklima von 37,5 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gewährleistet.

#### 2.2.1.2 Gewinnung von Lymphknoten- und Milzzellen

Zur Gewinnung von Organen wurden die Mäuse in einem mit CO<sub>2</sub> gefülltem Behälter abgetötet. Nach Desinfektion mit 80 %-igem Alkohol wurde sie unter einer Sterilbank mit sterilem Besteck auf einem OP-Tuch präpariert. Die frei präparierten Organe wurden anschließend mit dem Stempel einer sterilen Spritze in Medium oder PBS durch einen Cell-Streaner gedrückt, um so eine Zellsuspension zu erhalten.

#### 2.2.1.3 Gewinnung von Knochenmark

Zur Gewinnung von Knochenmark wurden Femura und Tibiae der Mäuse präpariert. Anschließend wurden die Knochen mit Medium durchgespült und so das Knochenmark ausgewaschen.

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Differenzierung Dendritischer Zellen aus Knochenmark

Das Knochenmark der Mäuse wurde über acht Tage in 6-Loch-Platten ( $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter; 3 ml pro Kavität) mit 20 % Medium im Brutschrank kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Zur Differenzierung der dendritischen Zellen wurden nach jedem Mediumwechsel 300 µl GM-CSF dazugegeben.

Um die DC zu reifen, wurde am Abend von Tag 7 1 µl/ml LPS dazugegeben und die Zellen am nächsten Morgen geerntet.

### *2.2.1.2 Erythrozytenlyse*

Nach der Gewinnung von Milz, Lymphknoten oder Knochenmark wurde die Zellsuspension für 5 min bei 4 °C und 1300 UpM abzentrifugiert, in 2-3 ml eines 1x-Lysepuffers resuspendiert und für 1-2 min. inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrirte mit PBS.

### *2.2.1.3 Zellzahlbestimmung*

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Je nach zu erwartender Zellzahl wurde eine 1:1- oder 1:10-Verdünnung der Zellsuspension und Trypanblau hergestellt. Nach dem Auszählen der vier Quadrate und Bildung des Mittelwerts wurde nach folgender Formel die Zellzahl berechnet:

Mittelwert X Kammerfaktor X Verdünnungsfaktor X Suspensionsvolumen = Zellzahl

### *2.2.1.4 Zellen auftauen*

Eingefrorene Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aus dem Stickstofftank zur Werkbank transportiert. Aufgetaut wurden sie mit 10 ml 37 °C warmem 20 % Medium. Nach einem Waschschrirte wurden sie für eine Nacht im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag in 5 % Standardmedium überführt.

### *2.2.1.5 Zellen einfrieren*

Zellen wurden gezählt und abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, wurden  $1-3 \times 10^7$  Zellen in 1,8 ml Einfrierlösung (1:10 DMSO und FCS) resuspendiert und in Kryporöhrchen überführt. Diese wurden einige Tage in einem Behältnis mit Isopropanol bei -80 °C gelagert und dann in den Stickstofftank überführt.

### *2.2.1.6 PMA/Ionomycin-Stimulation*

Vor intrazellulären FACS-Färbungen von Interleukinen wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und  $10^6$  Zellen in 200 µl Stimulationsmedium resuspendiert. Für die Stimulationszeit von 4 bis 6

Stunden wurden die Zellen in eine 96-Loch-Platte ( $10^6$  Zellen pro Kavität) überführt und im Brutschrank inkubiert.

#### *2.2.1.7 LPS-Stimulation*

Stimulation von dendritischen Zellen in einer Milzzellsuspension mit LPS für 4 Stunden. Dafür wurden die dendritischen Zellen ( $10^6$  Zellen pro ml) in 10 % Medium aufgenommen und in einer 24-Loch-Platte (1 ml pro Kavität) ausplattiert. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen geerntet, einmal gewaschen und weiter verarbeitet.

#### *2.2.1.8 Kokulturen mit dendritischen Zellen*

Um den Einfluss des Tumormilieus auf die dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden Kokulturen mit dendritischen Zellen und primärem Tumor (Milz und Lymphknoten) sowie 291-Zellen durchgeführt.

Die dendritischen Zellen wurden aus CBL-Milzen mittels MACS isoliert oder aus Knochenmark gereift.

Die Kokultur wurde in einer 24-Loch-Platte angesetzt. Pro Kavität wurden  $10^6$  dendritische Zellen mit  $10^6$  Tumorzellen in jeweils 1 ml 10 % Medium kokultiviert. Nach 44 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen geerntet und je nach Fragestellung weiter verarbeitet.

Mit dem gleichen Ansatz wurden auch Kokulturen mit zellfreiem Tumorüberstand und dendritischen Zellen durchgeführt, um zu differenzieren, ob die beobachteten Einflüsse des Tumormilieus auf die dendritischen Zellen über Zell-Zellkontakte oder lösliche Faktoren vermittelt werden.

Außerdem wurde der Ansatz erweitert, um die DC-NK-Zell-Interaktion näher zu untersuchen. Hierfür wurden im Verhältnis (1:1:1) mittels MACS angereicherte NK-Zellen dazupipettiert.

#### *2.2.1.9 Allostimulation*

Unter Allostimulation versteht man die Aktivierung von spezifischen T-Effektorzellen (alloreaktive T-Zellen) des Empfängers durch Alloantigene (HLA-Moleküle) des Spenders. Man unterscheidet eine direkte (induziert über die APCs des Spenders) und eine indirekte (induziert über die APCs des Empfängers) Alloreaktion.

Um die allostimulatorischen Fähigkeiten der dendritischen Zellen aus  $\text{NKG}^{-/-}\text{myc}^{-/-}$  und  $\text{NKG}^{-/-}\text{myc}^{-/+}$  Mäusen zu untersuchen, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

In einer 96-Loch-Platte wurden pro Loch  $10^4$  dendritische Zellen, die mittels magnetischer Separation aus  $\text{NKG}^{-/-}\text{myc}^{-/-}$  und  $\text{NKG}^{-/-}\text{myc}^{-/+}$  Mausmilzen angereichert wurden, mit  $2 \times 10^5$  Milzzellen aus BALB/c-Mäusen in 200  $\mu\text{l}$  10 % Medium für 3 und 5 Tage im Brutschrank kokultiviert. Quantifiziert wurde die T-Zell-Stimulation im ELISA durch die Bestimmung der  $\text{INF-}\gamma$ -Konzentration im Überstand (160  $\mu\text{l}$  pro Kavität).

## 2.2.2 Immunologische Methoden

### 2.2.2.1 Durchflusszytometrie - FACS

Die Durchflusszytometrie stellt eine schnelle und unkomplizierte Methode dar, Aussagen über die Größe und den Granulagehalt einzelner Zellen zu treffen sowie deren intrazelluläre und Oberflächenmoleküle mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu quantifizieren.

Eine Einzelzellseparation ist mit dem verwendeten FACS-Gerät von BD (Modell LSR II) nicht möglich.

### 2.2.2.2 Färben von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Die zu analysierenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen pipettiert ( $10^6$  Zellen pro Röhrchen), einmal mit FACS-Puffer gewaschen und dann bei 1300 UpM abzentrifugiert und vom Überstand getrennt. Anschließend wurden die Zellen für 20-30 Minuten bei 4 °C im Dunklen mit Färbelösung (50  $\mu\text{l}$  pro  $10^6$  Zellen) inkubiert. Für die Herstellung der Färbelösungen wurden die Antikörper entsprechend den Herstellerangaben oder entsprechend angefertigten Titrationsreihen in FACS-Puffer verdünnt eingesetzt. Nach der Inkubationszeit folgte ein weiterer Waschschritt und dann die Resuspension in 150-300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer bzw. eine Fixierung in 2 %-iger PFA-Lösung.

Für die Färbung intrazellulärer Moleküle, wurde zuerst eine Oberflächenfärbung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, bevor sie mit 100  $\mu\text{l}$  Färbelösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die verwendeten Reagenzien stammten aus dem „Fixation & Permeabilization Kit“ von eBioscience.

### 2.2.2.3 MACS – Magnet-aktivierte Zellseparation

Die Magnet-aktivierte Zellseparation stellt eine elegante Methode dar, bestimmte Zellpopulationen aus einer Zellsuspension zu isolieren.

Die Gewinnung von dendritischen Zellen gelang durch die Isolierung von CD11c<sup>+</sup> Zellen. Dafür wurden Milzzellen mit einem anti-Maus-CD11c-magnetmarkierten Antikörper für 15 min bei 4 °C inkubiert und nach einem Waschschrift in MACS-Puffer (10<sup>8</sup> Zellen pro 500 µl) resuspendiert. Anschließend erfolgte die magnetische Separation. Dafür wurden 500 µl der Zellsuspension auf eine MS-MACS-Säule gegeben, die einem Magnetfeld (Miltenyi MACS-Magnet) ausgesetzt war. Nach dreimaligem Waschen der Säule wurde sie aus dem Magnetfeld entfernt und die positiv seligierten dendritischen Zellen mit 1 ml MACS-Puffer pro Säule ausgewaschen.

Die so gewonnenen dendritischen Zellen konnten dann je nach Fragestellung weiter verarbeitet werden.

Zur Gewinnung aufgereinigter NK-Zellen wurde nach oben beschriebenem Prinzip verfahren unter Verwendung des Miltenyi „NK Cell Isolation Kit II“.

### 2.2.2.4 ELISA

Mit dem **Enzyme-linked Immunosorbent Assay** wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion im Kulturüberstand der T-Zellen nach der Allostimulation quantifiziert. Verwendet wurde das Protokoll des ELISA-Kits der Firma BD (Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Set).

### 2.2.3 Immunisierung mit Hämagglutinin-Ovalalbumin (HA-OVA)

Um die Immunantwort von Mäusen näher zu charakterisieren, wurden sie mit HA-OVA immunisiert und anschließend das Verhältnis der Th1- und Th2-Antwort durch Bestimmung entsprechender Immunglobulinsubklassen im ELISA analysiert.

Der Versuch war gegliedert in drei Versuchsgruppen à vier Tiere im Alter von ca. acht Wochen. Das Immunisierungsschema war wie folgt:

Tag 0: Immunisierungsmix I

Tag 10: Immunisierungsmix II

Tag 20: Immunisierungsmix II

Immunisierungsmix I:

60 µg HA-OVA (1,5 mg/ml)

10 µl CpG 1668 (500 µg/ml)

200 µl IFA (Incomplete Freud's adjuvant)

253,8 µl PBS

Immunisierungsmix II:

60 µg HA-OVA (1,5 mg/ml)

10 µl CpG 1668 (500 µg/ml)

400 µl PBS

Appliziert wurden je 200 µl subkutan und intraperitoneal.

Für die spätere Analyse im ELISA wurde an den Tagen 0, 10, 20, 30, 40 und 60 je 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen, anschließend abzentrifugiert und bei -20 °C eingefroren.

#### 2.2.4 *In-vivo*-Versuch – Injektion von rekombinantem IFN- $\gamma$ in c-myc-Mäuse

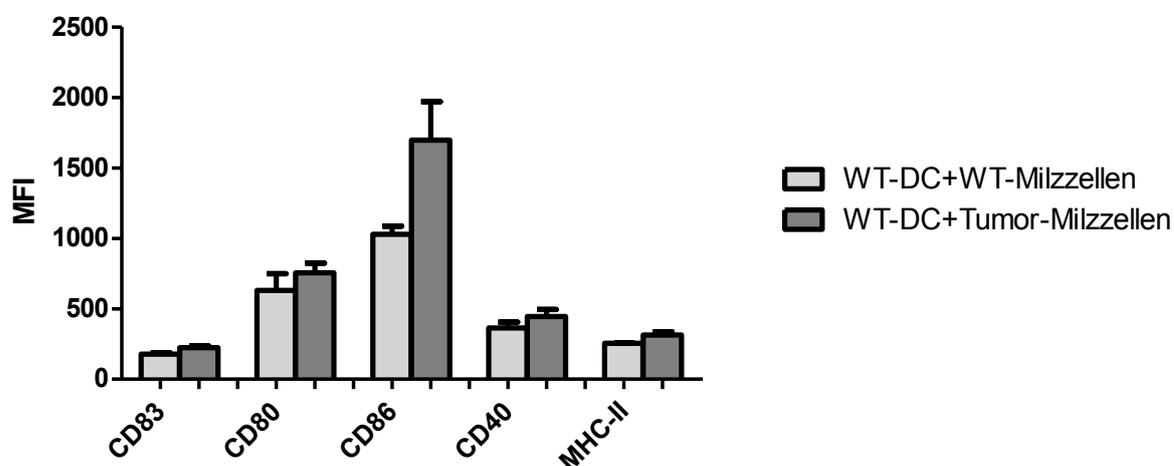
Um den Effekt von IFN- $\gamma$  auf die im Tumor ansässigen dendritischen Zellen zu untersuchen, wurde c-myc-Mäusen in sehr frühen Tumorstadien rekombinantes IFN- $\gamma$  ( $10^4$  Einheiten in 30 µl) intratumoral (in den Lymphknoten) injiziert. Nach 3 Tagen wurde der entsprechende Lymphknoten präpariert und die dendritischen Zellen im FACS analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aktivierung dendritischer Zellen in c-myc-Tumoren

##### 3.1.1 Kokultur mit primären c-myc-Tumoren

Aus früheren Untersuchungen der DCs im c-myc-Modell ist bereits bekannt, dass diese einen aktivierten Phänotyp zeigen [28]. Unbeantwortet war jedoch die Frage, wodurch diese Aktivierung vermittelt wird. Es wurde vermutet, dass die DC-Aktivierung im Tumor durch Zellkontakte und/oder lösliche Faktoren herbeigeführt wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden Versuche durchgeführt, in denen aus Wildtyp-Mäusen angereicherte DCs mit primären c-myc-Tumoren kokultiviert wurden. In der anschließenden FACS-Analyse wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD83, der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie der Moleküle CD40 und MHC-II auf den DCs quantifiziert.



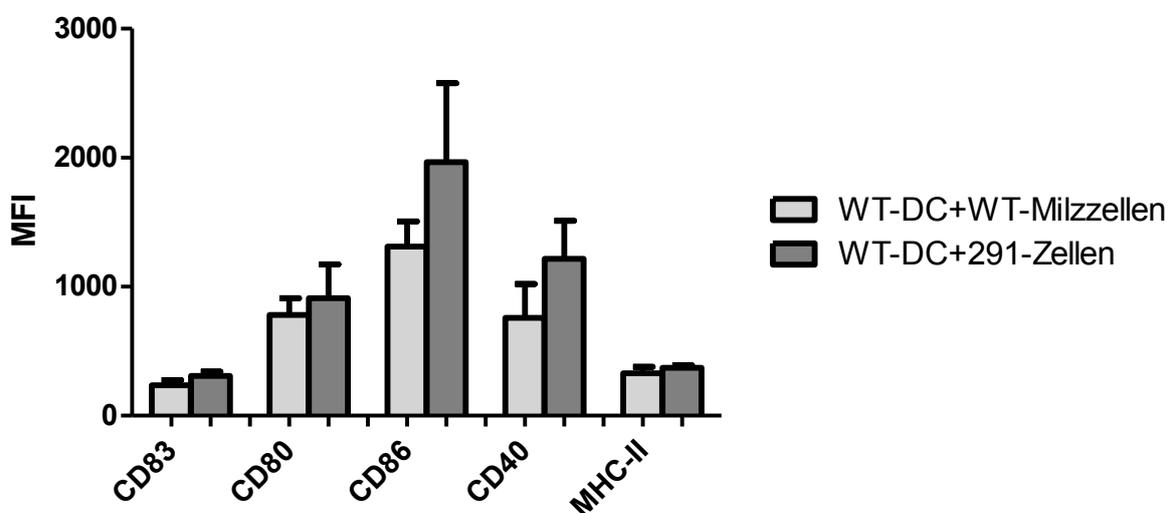
**Abbildung 3.1: Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen nach Kokultur mit c-myc-Tumoren.**

WT-DCs wurden für 46 Stunden mit primären c-myc-Tumoren bzw. WT-Milzzellen kokultiviert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker mittels FACS analysiert.

Für alle Parameter zeigen die mit c-myc-Tumoren kokultivierten DCs einen stärker aktivierten Phänotyp als die Wildtyp-Kontrolle. Dies lässt vermuten, dass die Tumorzellen und/oder ihr Milieu tatsächlich eine vermittelnde Rolle in der DC-Aktivierung spielen (s. Abb. 3.1).

### 3.1.2 Kokultur mit 291-Zellen

Um zu differenzieren, ob auch Milz-Pulpa- und Stromazellen einen Einfluss auf die DC-Aktivierung haben, wurden, parallel zu den Kokulturen mit primären c-myc-Tumoren, analoge Versuche mit 291-Zellen durchgeführt. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine aus einem c-myc-Tumor etablierte Zelllinie. Auch bei diesem Ansatz war eine stärkere Maturierung der DCs im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (s. Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2: Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen nach Kokultur mit 291-Zellen.**

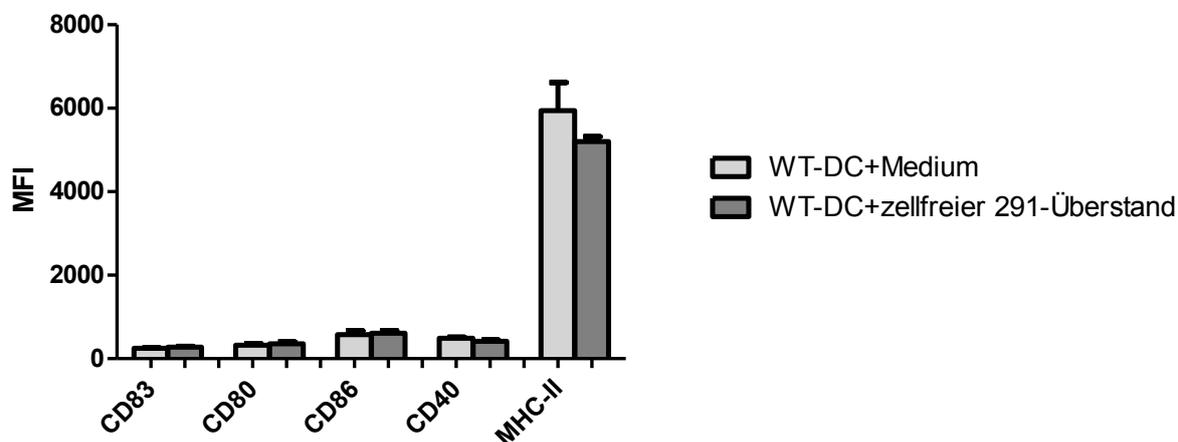
WT-DCs wurden für 46 Stunden mit 291-Zellen bzw. WT-Milzzellen kokultiviert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarken mittels FACS analysiert.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass tatsächlich der Tumor und/oder dessen Milieu für die Aktivierung verantwortlich sind. Die Milz-Pulpa- oder Stromazellen, die in primären c-myc-Tumoren Teil der Zellsuspension sind, scheinen, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Außerdem stand mit den 291-Zellen nun eine Zelllinie zu Verfügung, die beliebig vermehrt werden und alternativ zu primären Tumoren eingesetzt werden konnte.

### 3.1.3 Kokultur in zellfreiem Tumorüberstand

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, ob für die DC-Maturierung zelluläre Kontakte notwendig sind oder sie durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Dafür wurde erneut

auf den Kokulturansatz zurückgegriffen. Anstatt der primären Tumor- bzw. 291-Zellen wurde in diesem Fall aber zellfreier Tumorüberstand eingesetzt (s. Abb. 3.3).



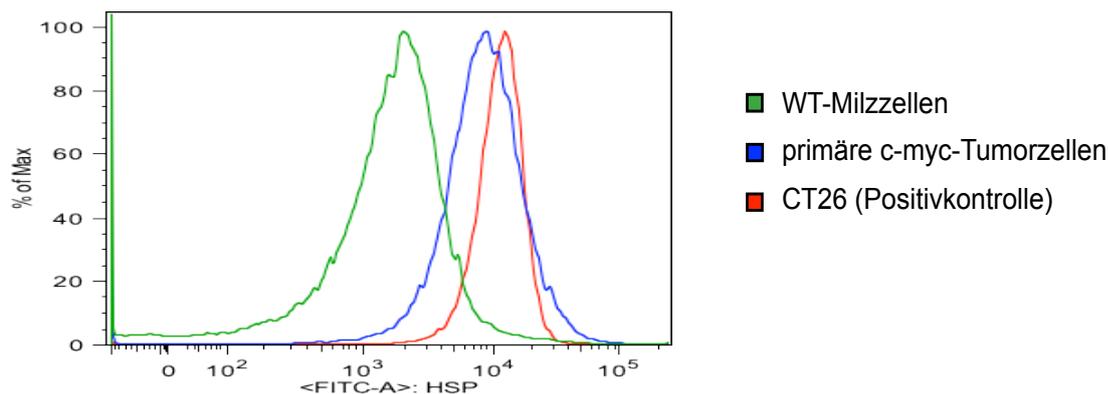
**Abbildung 3.3: Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen nach Kokultur im zellfreien 291-Tumorüberstand.**

WT-DCs wurden für 46 Stunden in zellfreiem 291-Überstand bzw. Medium kultiviert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker mittels FACS analysiert.

Nach Analyse der bekannten Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie wird deutlich, dass die zuvor beobachtete Aktivierung der DCs ausbleibt (Abb. 3.3). Dies legt nahe, dass die Maturierung zellkontaktabhängig vermittelt wird.

#### 3.1.4 Die Rolle von HSP70

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob ein spezifisches Molekül ermittelt werden kann, das für die DC-Aktivierung kausal verantwortlich ist. Aus der Literatur ist schon seit längerem die wichtige Rolle von HSP70 für die Induktion der DC-Maturierung bekannt [38]. In einem ersten Schritt wurde deshalb untersucht, ob der c-myc-Tumor HSP70 exprimiert (s. Abb. 3.4).

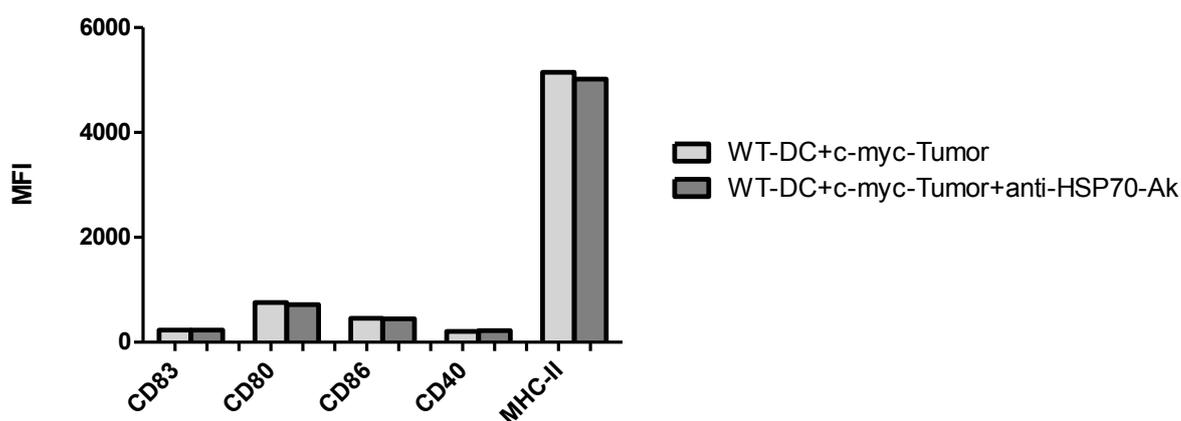


**Abbildung 3.4: Analyse der HSP70-Expression auf primären c-myc-Tumoren.**

*Ex vivo* gewonnene primäre c-myc-Tumoren wurden mittels FACS auf die Expression von HSP70 untersucht.

In Abb. 3.4 ist zu erkennen, dass die c-myc-Tumoren HSP70-positiv sind und somit HSP70 ein vielversprechender Kandidat für die Induktion der beobachteten DC-Aktivierung sein könnte.

Diese Vermutung sollte in einem zweiten Schritt überprüft werden. Dafür wurden Kokultivierungsversuche angesetzt, in denen HSP70 durch die Zugabe eines anti-HSP70-Ak neutralisiert wurde (s. Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5: Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen nach Kokultur mit und ohne HSP70-neutralisierendem Antikörper.**

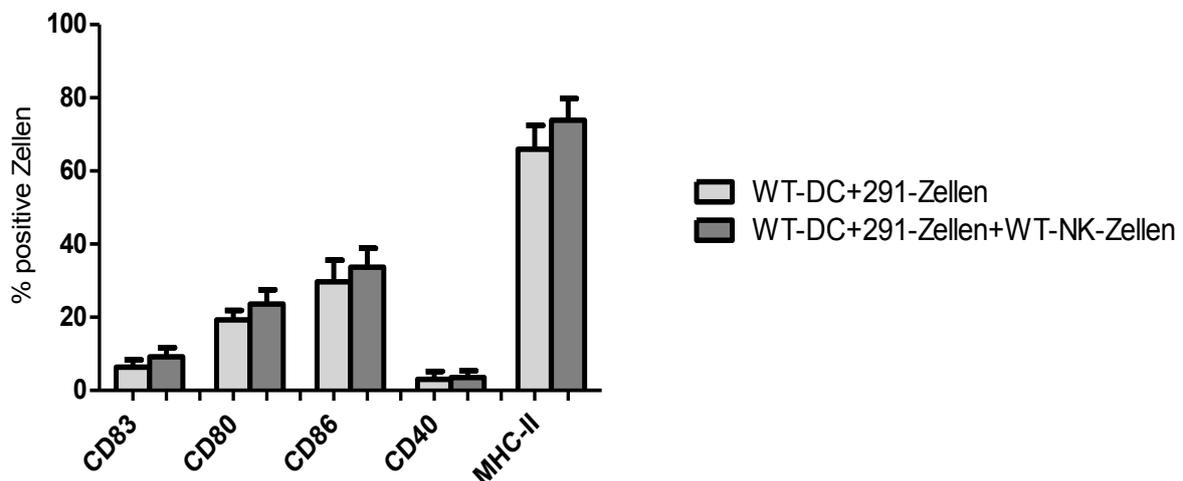
WT-DCs wurden mit primären c-myc-Tumoren für 46 Stunden kokultiviert. Der Einfluss von HSP70 auf die DC-Maturierung wurde durch die Zugabe eines neutralisierenden anti-HSP70-Aks analysiert.

Abb. 3.5 zeigt, dass HSP70 im verwendeten c-myc-Modell wohl keine relevanten DC-maturierenden Effekte vermittelt, da eine Aktivierung ausbleibt. Aufgrund der Vielfalt anderer möglicher Kandidaten und der großen Wahrscheinlichkeit, dass weit mehr als nur ein Molekül in den Maturierungsprozess involviert ist, wurde die Suche nach Alternativen nicht weiter fortgesetzt.

### 3.1.5 DC-NK-Zell-Interaktion

Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass auch NK-Zellen durch zelluläre Interaktion mit DCs zu deren Maturierung beitragen können. Die wechselseitige Aktivierung und die Sekretion verschiedener Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der schnellen unspezifischen Immunantwort [39]. Um die Frage der DC-Maturierung weiterzuverfolgen, wurde deshalb im Folgenden die DC-NK-Zell-Interaktion näher analysiert.

Dazu wurde der oben beschriebene Kokulturansatz erweitert. Zu der Kokultur aus aufgereinigten DCs und 291-Zellen wurden in gleichem Verhältnis aus Wildtyp-Mäusen isolierte NK-Zellen zugegeben (s. Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6: Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen nach Kokultur mit 291-Zellen und WT-NK-Zellen.**

WT-DCs wurden für 46 Stunden mit WT-NK-Zellen und 291-Zellen im Verhältnis 1:1:1 kokultiviert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmoleküle auf den DCs mittels FACS analysiert.

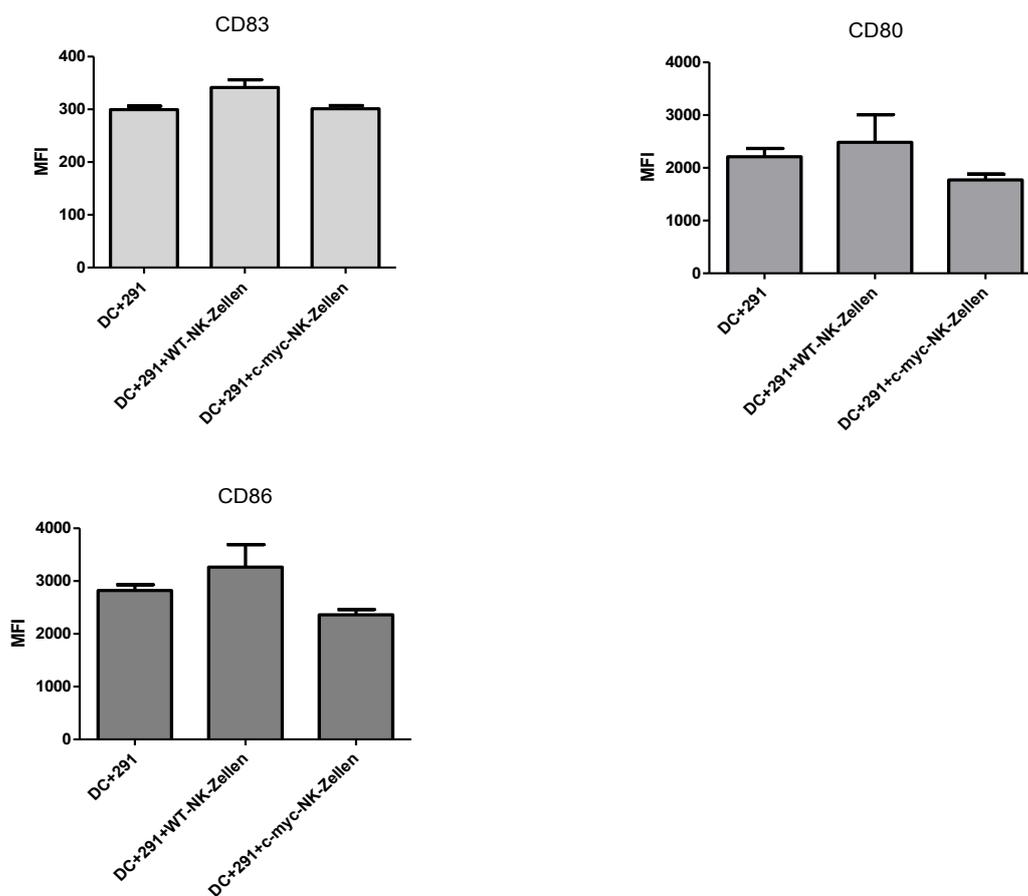
Als Negativkontrolle vergleiche Abb. 3.2: In dieser wurde gezeigt, dass WT-DCs nach Kokultur mit 291-Zellen einen stärker aktivierten Phänotyp zeigen als in der WT-Kontrolle.

Aus Abb. 3.6 wird ersichtlich, dass NK-Zellen neben dem Tumor einen zusätzlichen Beitrag zur DC-Aktivierung leisten.

Neben diesem Ansatz mit Wildtyp-NK-Zellen sollte als nächstes die Situation in primären Tumoren modelliert werden. Als Versuchsansatz diente wieder die erweiterte Kokultur, in der diesmal aus c-myc-Tumoren isolierte NK-Zellen mit 291-Zellen und WT-DCs kokultiviert wurden.

Aus früheren Projekten in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die NK-Zellen im c-myc-Modell zwar einen aktivierten Phänotyp zeigen aber in ihrer Effektorfunktion und auch in der für die DC-Aktivierung wichtigen IFN- $\gamma$ -Produktion Defizite aufweisen [27]. Deshalb wurde erwartet, dass die in Abb. 3.6 beobachtete NK-Zellen-vermittelte DC-Aktivierung ausbleibt.

Abb. 3.7 zeigt den unterschiedlichen Einfluss von Wildtyp-NK-Zellen und NK-Zellen aus c-myc-Tumoren auf die Maturierung der DCs. Wie erwartet ist zu erkennen, dass die anergen, aus Tumoren isolierten NK-Zellen nicht mehr in der Lage sind, ihren für die DC-Maturierung wichtigen Beitrag zu leisten.



**Abbildung 3.7: Unterschiedlicher Einfluss von WT-NK-Zellen und NK-Zellen aus c-myc-Mäusen auf die Maturierung von WT-DCs.**

WT-DCs wurden mit 291-Zellen und WT-NK- bzw. c-myc-NK-Zellen für 46 Stunden kokultiviert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmoleküle auf den DCs mittels FACS analysiert.

## 3.2 Die Rolle des Zytokinmilieus

### 3.2.1 Veränderung des Zytokinmilieus

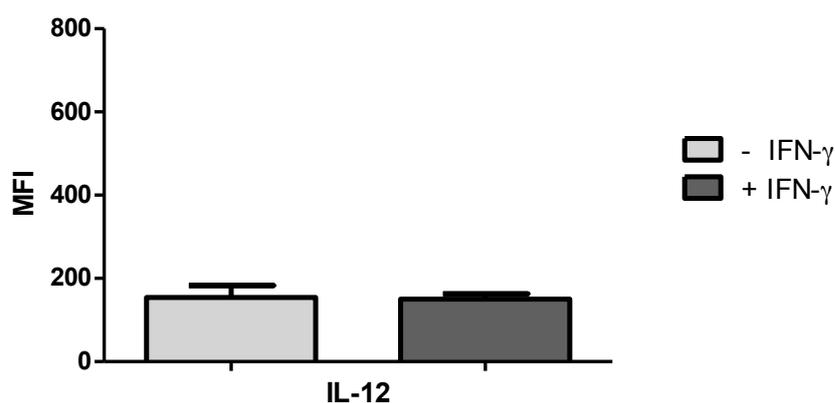
Eine zentrale Rolle im Ablauf einer Immunantwort spielt das vorherrschende Zytokinmilieu durch seinen immunmodulierenden Einfluss.

Aus früheren Untersuchungen des Zytokinmilieus von c-myc-Tumoren war bereits bekannt, dass dieses sich durch hohe IL-10-Spiegel mit immunsuppressiver Wirkung auf DCs auszeichnet. Außerdem war bekannt, dass die Verschiebung des Zytokinexpressionsmusters in intratumoralen DCs humoral vermittelt wird. Diese Beobachtung, sowie der NK-Zell-bedingte IFN- $\gamma$ -Mangel begünstigen eine Differenzierung dendritischer Zellen zu regulatorischen DCs. Dies wiederum könnte zur Folge haben, dass die DCs ihrerseits zu einer vermehrten IL-10-Produktion angeregt werden. Gleichzeitig zeigen sie eine verminderte IL-12-Produktion, die u.a. durch die reduzierten IFN- $\gamma$ -Spiegel vermittelt sein könnte. Die Konsequenzen dieses veränderten Zytokinexpressionsmusters zeigen sich u.a. in der T-Zell-Prägung und der nachfolgenden Immunantwort [28].

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob sich durch eine Manipulation des Zytokinmilieus *in vivo* bzw. *in vitro* die Zytokinexpression in DCs beeinflussen lässt.

### 3.2.2 Intratumorale Injektion von IFN- $\gamma$

Durch die intratumorale Injektion von rekombinantem IFN- $\gamma$  sollte der durch die anergen NK-Zellen bedingte IFN- $\gamma$ -Mangel kompensiert und so die IL-12-Produktion in DCs wieder hergestellt werden. Dafür wurden Mäuse in einem frühestmöglichen Tumorstadium ausgewählt und das IFN- $\gamma$  in einen axillären vergrößerten Lymphknoten injiziert.



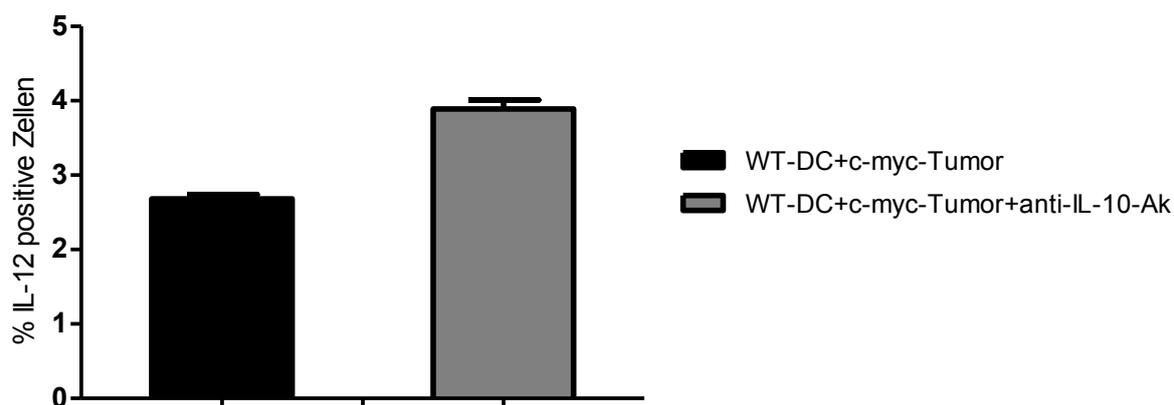
**Abbildung 3.8: Einfluss von intratumoral injiziertem IFN- $\gamma$  auf die IL-12-Expression in Tumor-infiltrierenden dendritischen Zellen.**

C-myc-Mäusen wurde *in vivo* in einem frühen Tumorstadium rekombinantes IFN- $\gamma$  in einen vergrößerten axillären Lymphknoten injiziert. Nach 3 Tagen wurde in dem *ex vivo* gewonnenen Lymphknoten die IL-12-Expression in den Tumor-infiltrierenden DCs analysiert. Vor der FACS-Analyse wurden die DCs mit PMA/Ionomycin stimuliert.

Aus Abb. 3.8 wird deutlich, dass sich die postulierte gesteigerte IL-12-Produktion nicht nachweisen lässt. Unterschiedlichste Gründe können hierfür verantwortlich sein. Am wahrscheinlichsten ist, dass die verwendeten Tumoren in einem zu fortgeschrittenen Stadium waren und deren Einfluss auf die DCs und deren Zytokinexpression stärker ist als der des injizierten IFN- $\gamma$ .

### 3.2.3 IL-10-Neutralisation *in vitro*

Da die künstliche Erhöhung des IFN- $\gamma$ -Spiegels *in vivo* nicht zu der erwarteten Veränderung der IL-12-Produktion führte, sollte als nächstes der Einfluss der hohen IL-10-Spiegel auf die Zytokinexpression der (reg)DCs *in vitro* untersucht werden. Besonderes Interesse galt auch hier wieder der IL-12-Produktion. Dafür wurden Kokulturen wie bei den Versuchen zur DC-Aktivierung angesetzt, unter Zugabe eines IL-10-neutralisierenden Antikörpers.



**Abbildung 3.9: Veränderung der IL-12-Expression in WT-DCs nach Kokultur mit primären c-myc-Tumoren und einem IL-10-neutralisierenden Antikörper.**

WT-DCs wurden mit primären c-myc-Tumoren und einem IL-10-neutralisierenden Antikörper kokulti-  
viert. Vor der anschließenden FACS-Analyse wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert.

Als Negativkontrolle vergleiche Abb. 3.13 (WT-DC+WT-Milzzellen).

Aus Abb. 3.9 wird ersichtlich, dass die durch den Tumor vermittelten hohen IL-10-Spiegel zur immunsuppressiven Differenzierung der DCs und ihrer verminderten IL-12-Produktion beitragen. Die dadurch bedingte Prägung regulatorischer T-Zellen und die durch sie kontrollierte und supprimierte Immunantwort scheinen eine Strategie des Tumors zu sein, einer immunologischen Kontrolle zu entgehen.

### 3.3 Dendritische Zellen im NKG2D-defizienten Mausmodell

#### 3.3.1 Der NKG2D-Rezeptor

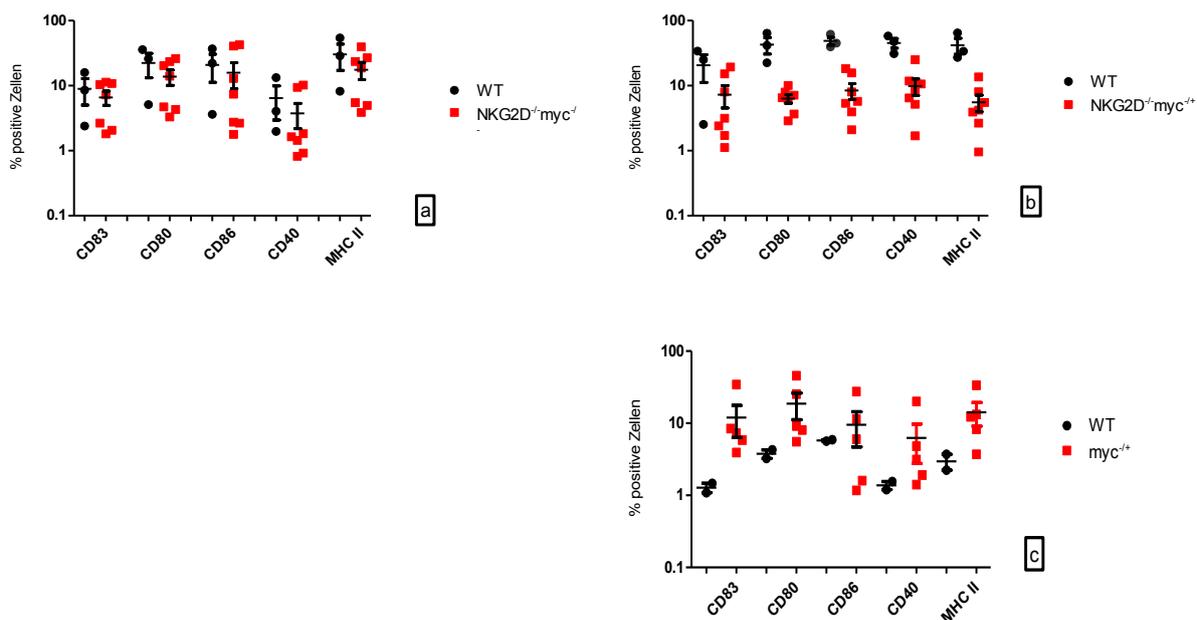
In den letzten Jahren hat sich zunehmend die wichtige Rolle des NKG2D-Rezeptors in der Antitumorimmunität gezeigt. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um ein aktivierendes, hauptsächlich auf NK-Zellen, aber auch CD8<sup>+</sup>-Zellen und Makrophagen (und CD4<sup>+</sup>-Zellen) exprimiertes Oberflächenmolekül. Die entsprechenden Liganden werden vor allem auf infizierten und maligne transformierten Zellen gefunden, so dass dem NKG2D-Rezeptor eine zentrale Rolle in der Immunüberwachung und Tumorkontrolle zukommt. Um den Einfluss des Rezeptors zu untersuchen, wurde in der Arbeitsgruppe Mocikat ein NKG2D-defizientes Mausmodell eingeführt und in das c-myc-Modell eingekreuzt.

Aus Untersuchungen der NK-Zellen NKG2D-defizienter Mäuse war bereits bekannt, dass diese eine wesentlich höhere IFN- $\gamma$ -Produktion als WT-NK-Zellen zeigen [37]. In vorliegender Arbeit sollten deshalb die Auswirkungen der NK-Zell-bedingten gesteigerten IFN- $\gamma$ -Spiegel auf die intratumoralen DCs untersucht werden.

Versuche wurden sowohl mit dem NKG2D-defizienten (NKG2D<sup>-/-</sup> myc<sup>-/-</sup>) als auch mit dem NKG2D-defizienten und myc-transgenen Genotyp (NKG2D<sup>-/-</sup> myc<sup>+/+</sup>) durchgeführt.

#### 3.3.2 Phänotypisierung der DCs

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Rezeptordefizienz einen Einfluss auf die DC-Maturierung hat. Dafür wurden die DCs anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD83, der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie CD40 und MHC-II analysiert. Abb. 3.10a-c zeigt, dass das Fehlen des Rezeptors zum Teil erheblichen Einfluss auf deren Expression hat.



**Abbildung 3.10a-c: Unterschiedliche Expression verschiedener Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen abhängig vom Genotyp.**

Die *ex vivo* gewonnenen DCs aus Lymphknoten wurden ohne Stimulation bzw. Kokultur mittels FACS analysiert.

Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Absolutwerte aus unterschiedlichen Messungen.

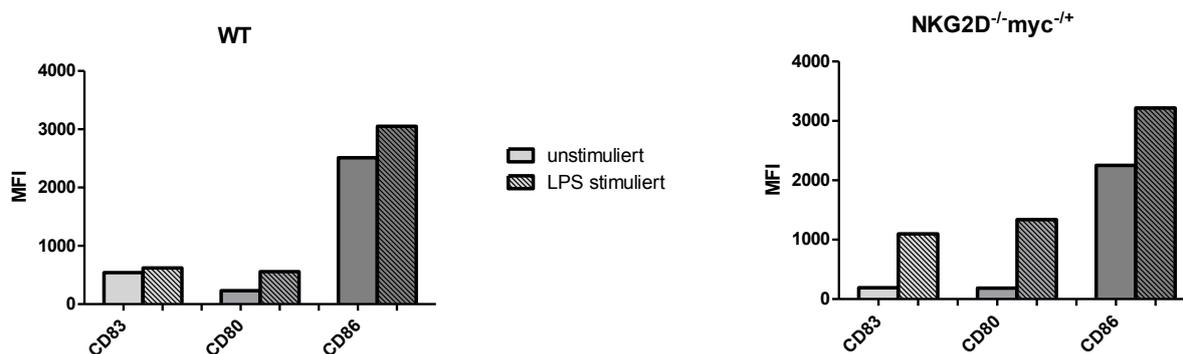
Deshalb ist keine Übereinstimmung der WT-Werte zu erwarten.

Für DCs aus Milzen wurden identische Ergebnisse erhalten (Daten nicht gezeigt).

Bei den nicht *myc*-transgenen NKG2D-defizienten Mäusen ist kein wesentlicher Unterschied gegenüber der Wildtyp-Kontrolle zu erkennen (Abb. 3.10a). Der tumortragende NKG2D-defiziente Genotyp dagegen zeigt eine signifikant ( $p=0,0167$ ) reduzierte Expression der gemessenen Oberflächenmarker (Abb. 3.10b). Dies ist erstaunlich, wenn man bedenkt, dass die tumortragenden NKG2D-kompetenten Mäuse einen gegenüber dem Wildtyp aktivierten Phänotyp zeigen (Abb. 3.10c.). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass der NKG2D-Rezeptor eine direkt oder indirekt vermittelnde Rolle in der DC-Maturierung spielt.

### 3.3.3 LPS-Stimulation phänotypisch supprimierter DCs

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der supprimierte Phänotyp genetisch durch den knock-out bedingt ist oder durch ein im Vergleich zum *c-myc*-Modell verändertes Tumormilieu. Hierfür wurden die DCs in frisches Medium überführt und mit LPS stimuliert.



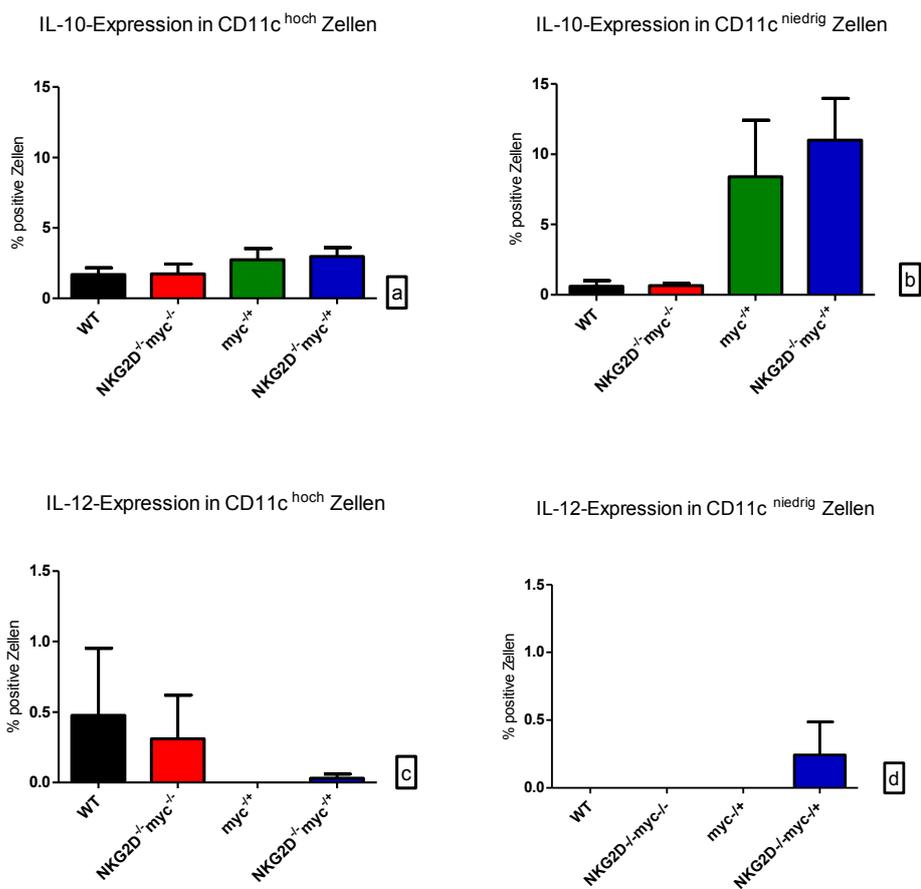
**Abbildung 3.11: Aktivierungsmarker auf dendritischen Zellen aus WT- und tumortragenden NKG2D-defizienten Mäusen nach LPS-Stimulation.**

DCs auf WT-Mäusen und tumortragenden NKG2D-defizienten Mäusen wurden für 4 Stunden mit LPS stimuliert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker mittels FACS analysiert.

Abb. 3.11 zeigt die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle der DCs tumortragender NKG2D-defizienter Mäuse im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle vor und nach Stimulation. In beiden Fällen ist eine gesteigerte Expression aller analysierten Marker nach LPS-Kontakt zu erkennen. Somit lässt sich vermuten, dass nicht primär das Fehlen des NKG2D-Rezeptors für die mangelnde Aktivierung der DCs verantwortlich ist sondern der Grund dafür wo anders zu suchen ist.

### 3.3.4 Zytokinexpression in dendritischen Zellen

Aufgrund der überraschenden Ergebnisse der Phänotypisierung in Abschnitt 3.4.2, sollte als nächstes auch das Zytokinexpressionsmuster der DCs untersucht werden. Hierzu wurden Milzzellen beider oben beschriebener NKG2D-defizienter Genotypen gewonnen und für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. Anschließend wurde mittels intrazellulärer FACS-Analyse die Expression von IL-10 und IL-12 gemessen. Abb. 3.12a-d zeigt die Ergebnisse sowie den Vergleich zur Wildtyp-Situation und zum NKG2D-kompetenten c-myc-Modell.



**Abbildung 3.12a-d: Unterschiedliche Zytokinexpression in DCs abhängig vom Genotyp.**

Die DCs wurden *ex vivo* gewonnen und vor der FACS-Analyse mit PMA/Ionomycin stimuliert. Zudem wurden CD11c<sup>+</sup>-Subpopulationen unterschieden, die viel (=CD11c<sup>hoch</sup>, a und c) und wenig (=CD11c<sup>niedrig</sup>, b und d) CD11c exprimieren. Diese Differenzierung wurde vorgenommen, da aus früheren Versuchen bekannt war, dass sich die Hauptunterschiede im Zytokinexpressionsmuster in der CD11c<sup>niedrig</sup>-Population zeigen. Darüberhinaus sind sie prozentual die weitaus größere Subpopulation der CD11c<sup>+</sup>-Zellen.

Sowohl für IL-10 als auch für IL-12 zeigen jeweils die tumortragenden und nicht tumortragenden Mäuse annähernd übereinstimmende Expressionsspiegel. Darüber hinaus findet man in den myc-transgenen Mäusen eine gegenüber den nicht myc-transgenen Mäusen nahezu doppelt so hohe IL-10-Produktion (Abb. 3.12a und b) bei gleichzeitig (zum Teil unter die Nachweisgrenze) supprimierter IL-12-Spiegel (Abb. 3.12c und d).

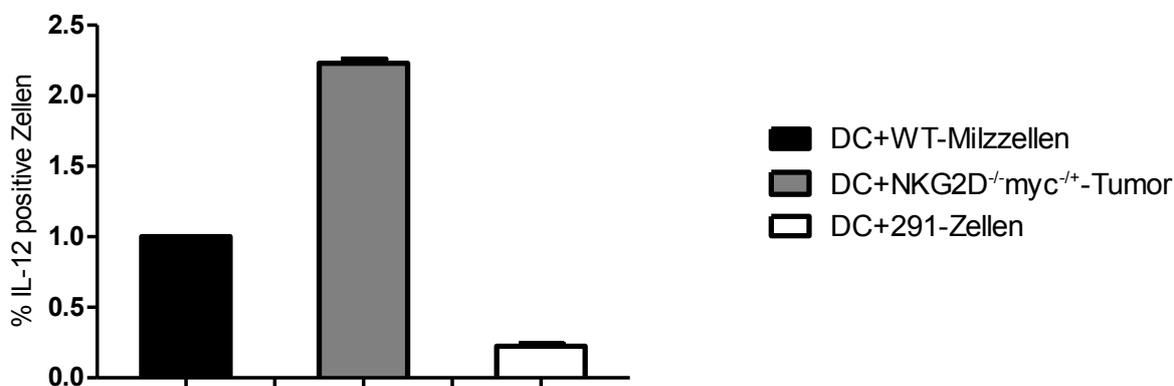
Auffällig ist zudem, dass die myc-transgenen NKG2D-defizienten Mäuse eine stärkere IL-12-Expression zeigen als die myc-transgenen NKG2D-kompetenten Mäuse (Abb. 3.12c und d). Diese Beobachtung ist wahrscheinlich u.a. auf die höheren IFN- $\gamma$ -Spiegel in den Tumoren aus

NKG2D-defizienten Mäusen zurückzuführen (Vergleiche Abschnitt 3.4.1). Die Veränderung des Zytokinexpressionsmusters in DCs aus NKG2D-defizienten Mäusen, könnte ein Ansatz zu einer besseren Tumorkontrolle sein.

### 3.3.5 Kokultur mit Tumoren aus NKG2D-defizienten Mäusen

Die in Abschnitt 3.4.2 und 3.4.4 *in vivo* gewonnenen Erkenntnisse, zeigen den Einfluss der NKG2D-Rezeptordefizienz auf die Expression verschiedener Zytokine und Oberflächenmoleküle in bzw. auf dendritischen Zellen. Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich die erhobenen Befunde auch *in vitro* modellieren ließen. Besonderes Interesse galt der IL-12-Produktion (vergleiche Abb. 3.12c und d). Da wie oben erwähnt, aufgrund der Rezeptordefizienz erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel in den Tumoren zu erwarten waren, wurde mit einem Anstieg der IL-12-Spiegel in DCs gerechnet (vergleiche Versuch in Abschnitt 3.2.2).

Als Versuchsaufbau diente analog zu den DC-Aktivierungsversuchen im c-myc-Modell, der Kokulturansatz. Abb. 3.13 zeigt das Ergebnis der Kokulturen für IL-12 und den Vergleich zum c-myc-Modell bzw. 291-Zellen.



**Abbildung 3.13: Expression von IL-12 in WT-DCs nach Kokultur mit 291-Zellen bzw. primären NKG<sup>-/-</sup>myc<sup>-/-</sup>-Tumoren.**

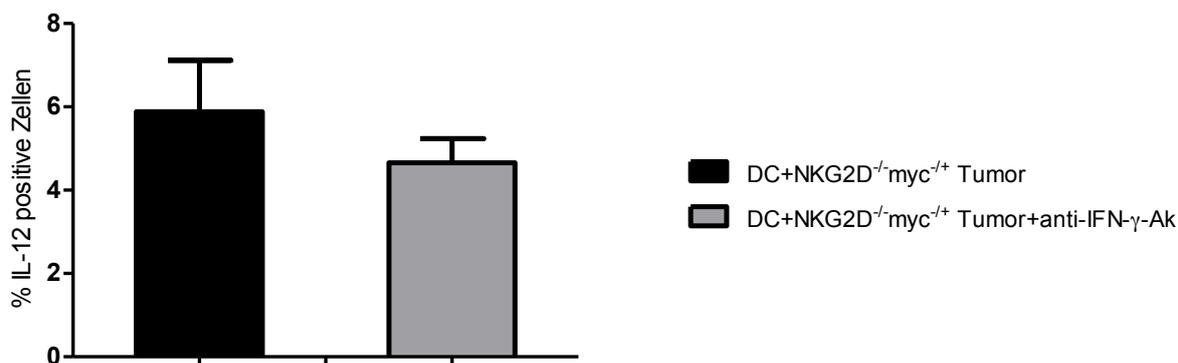
WT-DCs wurden mit 291-Zellen bzw. primären NKG<sup>-/-</sup>myc<sup>-/-</sup>-Tumoren für 46 Stunden kokultiviert. Die WT-Kontrolle wurde zu besseren Vergleichbarkeit auf 1 normiert.

Es ist zu erkennen, dass die DCs nach Kokultur mit NKG2D-defizienten Tumoren mehr IL-12 produzierten als in der Wildtyp-Kontrolle (Abb. 3.13). Dies stellt einen konträren Zustand gegenüber dem c-myc-Modell (bzw. den 291-Zellen) dar, in dem die IL-12-Produktion nach

Kokultur supprimiert ist (Abb. 3.13). In wieweit diese Beobachtungen den erhöhten IFN- $\gamma$ -Spiegeln geschuldet sind, sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden.

### 3.3.6 Die Rolle von IFN- $\gamma$ – Manipulationsversuche *in vitro*

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.5 wurde folgender Versuch durchgeführt: Erneut wurden Kokulturen angesetzt, in diesem Fall unter Zugabe eines IFN- $\gamma$ -neutralisierenden Antikörpers. So sollte die aus dem c-myc-Modell bekannte NK-Zell-Anergie simuliert, und entsprechend eine Suppression der IL-12-Produktion in DCs vermittelt werden.



**Abbildung 3.14: Veränderung der IL-12-Expression in WT-DCs nach Kokultur mit NKG2D<sup>-/-</sup>myc<sup>+/+</sup>-Tumoren und einem IFN- $\gamma$ -neutralisierenden Antikörper.**

WT-DCs wurden mit primären NKG2D<sup>-/-</sup>myc<sup>+/+</sup>-Tumoren für 46 Stunden kokultiviert. Vor der anschließenden FACS-Analyse wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert.

Die Ergebnisse in Abb. 3.14 bestätigen den erwarteten Effekt, wenn auch nicht signifikant. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind die regulierenden Mechanismen wesentlich komplexer, und andere Faktoren (z.B. TNF) sind in diesem Fall nicht berücksichtigt worden.

### 3.3.7 DC-NK-Zell-Interaktion im NKG2D-defizienten Modell

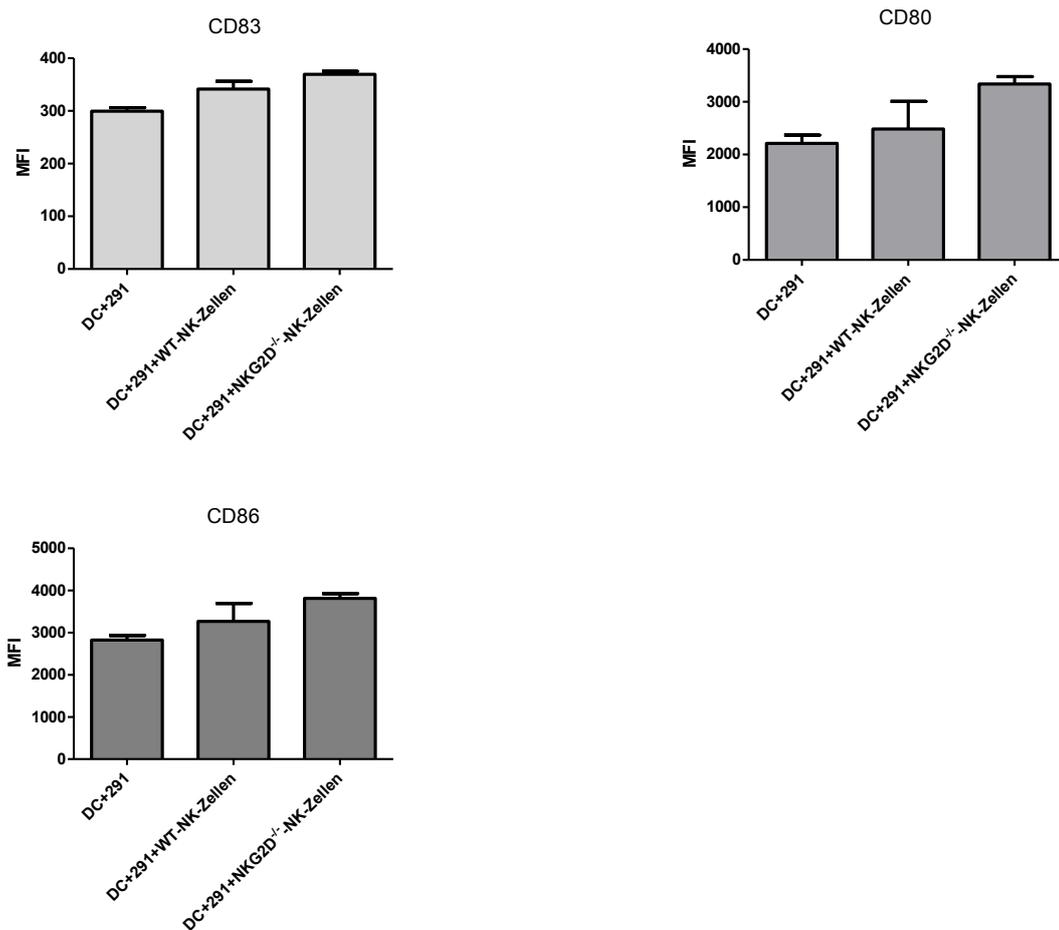
In den im Abschnitt 3.1.5 durchgeführten Versuchen wurde die wichtige Rolle der NK-Zellen für die DC-Aktivierung und die Situation im c-myc-Modell gezeigt. Ein wichtiger Punkt für

die Interpretation der dortigen Ergebnisse ist die in früheren Versuchen beobachtete NK-Zell-Anergie und der daraus resultierende IFN- $\gamma$ -Mangel.

Das Fehlen des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen aus NKG2D-defizienten Mäusen scheint deren IFN- $\gamma$ -Produktion jedoch dahingehend zu deregulieren, dass diese zu einer gesteigerten IFN- $\gamma$ -Produktion befähigt werden.

IFN- $\gamma$  ist nicht nur ein wichtiger Faktor für die IL-12-Produktion in DCs, sondern spielt auch eine wichtige stimulierende Rolle in der NK-Zell-vermittelten DC-Aktivierung. Deshalb sollte in einem neuen Versuch eruiert werden, ob die gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen aus NKG2D-defizienten Mäusen einen unmittelbaren Effekt in der DC-NK-Zell-Interaktion nach sich zieht.

Um dies zu überprüfen, wurden, analog zu den Versuchen im c-myc-Modell, erweiterte Kulturen mit WT-DCs, 291-Zellen und NKG2D-defizienten NK-Zellen angesetzt (vergleiche Abschnitt 3.1.5) .



**Abbildung 3.15: Unterschiedlicher Einfluss von WT-NK-Zellen und NK-Zellen aus NKG2D-defizienten Mäusen auf die Maturierung von WT-DCs.**

WT-DCs wurden mit 291-Zellen und WT-NK- bzw. NK-Zellen aus NKG2D-defizienten Mäusen für 46 Stunden kokultiviert. Anschließend wurden die Expression der Oberflächenmoleküle auf den DCs mittels FACS analysiert.

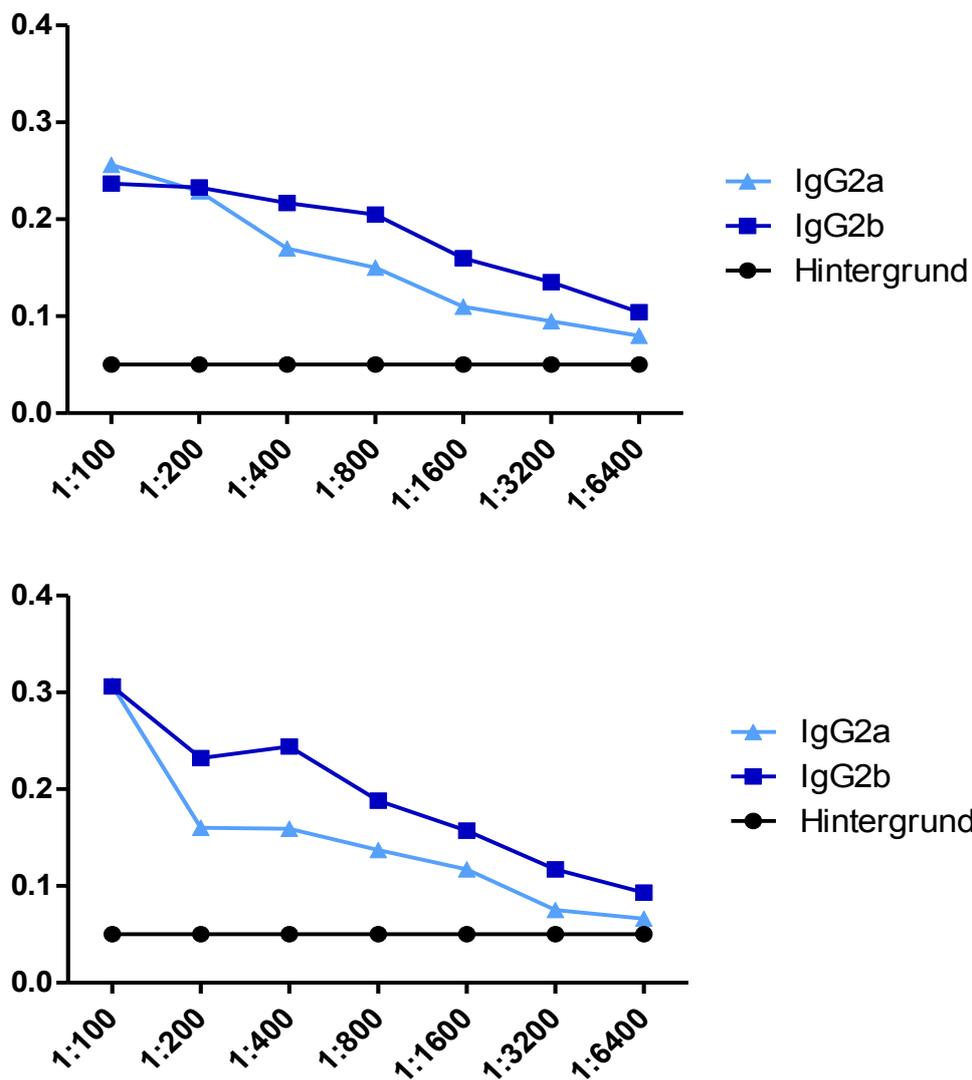
In Abb. 3.15 sind die Ergebnisse der Kokultur zu sehen. Es zeigt sich die aus Abschnitt 3.1.5 bekannte Steigerung der DC-Maturierung unter Zugabe von WT-NK-Zellen gegenüber der DC-291-Kontrolle (vergleiche Abb. 3.7). Darüber hinaus ist eine weitere Aktivierung durch die NK-Zellen aus NKG2D-defizienten Mäusen zu beobachten. Die gesteigerte INF- $\gamma$ -Produktion der NK-Zellen scheint also tatsächlich einen zusätzlich aktivierenden Einfluss auf die DC-Maturierung auszuüben.

### 3.3.8 Immunantwort NKG2D-defizienter Mäuse

Aus Immunisierungsversuchen mit c-myc-Mäusen war bekannt, dass sie zu einer Th2-dominierten T-Zell-Antwort neigen, weil die Tumorzellen ein immunsuppressives Th2-lastiges Zytokinmilieu generieren [28].

Die veränderten Zytokinverhältnisse in NKG2D-defizienten Mäusen (vergleiche Abb. 3.12a-d) und die neuen Erkenntnisse bezüglich der IL-12-Produktion in DCs (vergleiche Abschnitt 3.3.5 und 3.3.6) führten jedoch zu der Frage, ob die gesteigerten Spiegel dieses wichtigen Th1-Zytokins auch eine stärker Th1-geprägte Immunantwort nach sich ziehen würden. Diese Vermutung sollte durch einen Immunisierungsversuch geklärt werden.

Hierfür wurden drei Gruppen ( $\text{NKG2D}^{-/-}\text{myc}^{-/-}$ ,  $\text{NKG2D}^{-/-}\text{myc}^{-/+}$ , WT-Kontrolle) à vier Tiere im Alter von ca. acht Wochen gebildet und mit HA-OVA immunisiert.

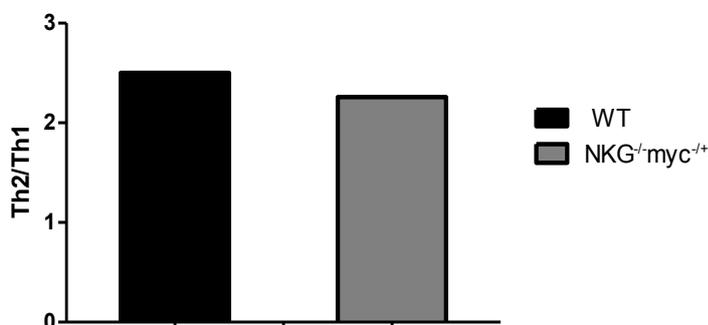


**Abbildung 3.16: Verdünnungsreihen der Immunglobulin-Subklassen IgG2a und IgG2b aus WT- (oben) und NKG2D<sup>-/-</sup>myc<sup>+/+</sup>-Mäuse (unten).**

Aus den Seren der immunisierten Mäuse wurden Verdünnungsreihen für verschiedene Immunglobulin-Subklassen mittels ELISA bestimmt. Man sieht die geringeren Titer des Th1-assoziierten IgG2a gegenüber dem Th2-assoziierten IgG2b.

Abb. 3.16 zeigt die anschließend aus Serum ermittelten Verdünnungsreihen der OVA-spezifischen Immunglobuline IgG2a (Th1-assoziiert) und IgG2b (Th2-assoziiert). Durch Berechnung der reziproken Immunglobulin-Subklassen-Titer, lässt sich das Verhältnis von Th2- zu Th1-Antwort quantifizieren. Als Grundlage für die Berechnung dienen die Extinktionen bei 2-fachem Hintergrund (Hintergrund OD=0,05) an Tag 40 der Immunisierung. Während im c-myc-Modell die Th2-Antwort näherungsweise um den Faktor 15 überwiegt [28], lässt sich

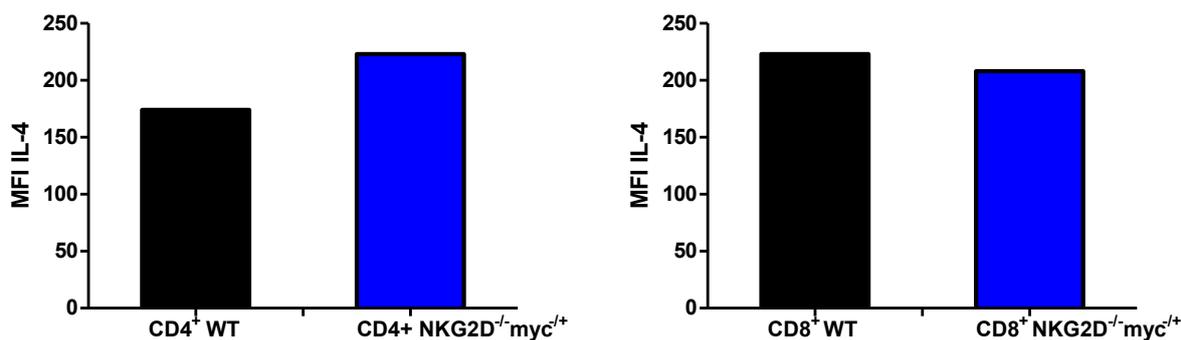
aus den Ergebnissen in Abb. 3.17 nur noch eine knapp 2,3-fach gesteigerte Th2-Gewichtung entnehmen, was mit den Verhältnissen in der WT-Situation übereinstimmt.



**Abbildung 3.17: Verhältnis der Th2/Th1-Antwort in WT- und NKG2D<sup>-/-</sup>myc<sup>+/-</sup>-Mäusen.**

Aus den ELISA-Ergebnissen an Tag 40 der Immunisierung wurden für IgG2a und IgG2b die reziproken Immunglobulin-Subklassen-Titer berechnet. Über diese lässt sich das Verhältnis der Th2/Th1-Antwort ermitteln.

Diese Übereinstimmung der Immunantwort in WT- und NKG2D-defizienten Mäusen konnte auch auf der Ebene der IL-4-Sekretion durch T-Zellen bestätigt werden. IL-4 ist das zentrale Th2-Zytokin, welches die Prägung einer Th2-dominierten T-Zell-Antwort einleitet [40]. Im c-myc-Modell wurde gezeigt, dass die T-Zellen eine annähernd 10<sup>2</sup>-fach höhere IL-4-Produktion zeigen als in der WT-Situation, was die Th2-dominierte Immunantwort erklärt [28]. In den T-Zellen NKG2D-defizienter Mäuse dagegen stimmen die IL-4-Spiegel näherungsweise mit denen in WT-Mäusen überein (Abb. 3.18), was zu den Beobachtungen in Abb. 3.17 passt.



**Abbildung 3.18: Expression von IL-4 in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen nach HA-OVA-Immunisierung.**

Am Tag 60 der Immunisierung wurde die IL-4-Expression in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Zellen in den Lymphknoten der immunisierten Mäuse analysiert. Die *ex vivo* gewonnenen Zellen wurden vor der FACS-Analyse mit PMA/Ionomycin stimuliert.

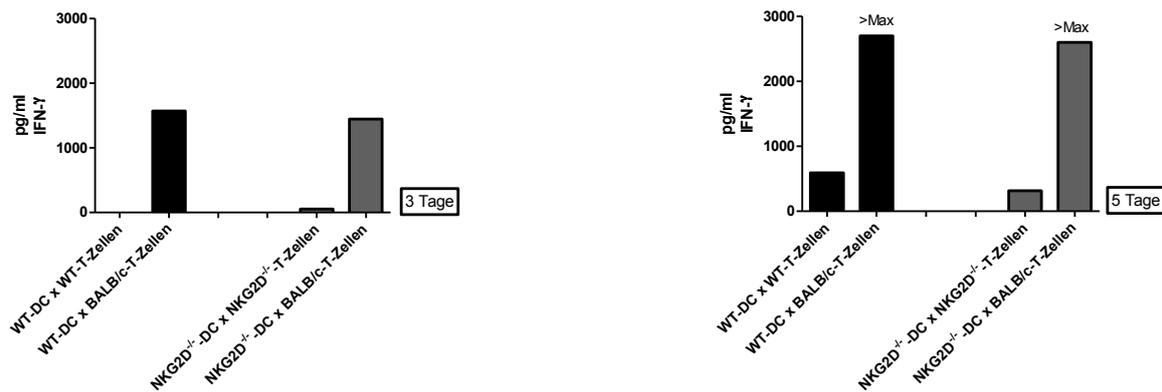
Die Veränderung im NKG2D-defizienten Modell hin zu einer weniger Th2-dominierten Immunantwort lässt sich u.a. durch die dort vorherrschenden, durch NK-Zellen vermittelten höheren IFN- $\gamma$ -Spiegel und die verminderte IL-4-Expression in T-Zellen erklären.

### 3.3.9 Funktionalität dendritischer Zellen im NKG2D-defizienten Modell

Ihre entscheidende Mittlerposition zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität nehmen DC u.a. aufgrund ihrer Fähigkeit ein, T-Zellen zu stimulieren. Aus Untersuchungen bei *c-myc*-Mäusen war bekannt, dass die Tumor-infiltrierenden DCs trotz ihres aktivierten Phänotyps Einschränkungen in der Fähigkeit zeigten, T-Zellen zu stimulieren.

Hier soll der Frage nachgegangen werden, ob die phänotypisch supprimierten DCs aus NKG2D-defizienten Mäusen ebenfalls in ihrer stimulatorischen Kapazität eingeschränkt sind oder nicht.

Dafür wurden Allostimulationen mit T-Zellen aus BALB/c-Mäusen und DC aus NKG2D<sup>-/-</sup>myc<sup>-/-</sup> bzw. WT-Mäusen (jeweils C57BL/6-Hintergrund) durchgeführt. Diese wurden für 3 und 5 Tage kokultiviert und anschließend die IFN- $\gamma$ -Produktion der T-Zellen im ELISA quantifiziert.



**Abbildung 3.19: Allostimulation mit BALB/c-T-Zellen und WT-DCs bzw. DCs aus NKG2D-defizienten Mäusen.**

Angereicherte BALB/c-T-Zellen wurden mit angereicherten WT- DCs bzw. DCs aus NKG2D-defizienten Mäusen für 3 und 5 Tage kokultiviert. Anschließend wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion der stimulierten T-Zellen im ELISA quantifiziert.

Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, zeigen die aus NKG2D-defizienten Mäusen isolierten DCs eine dem Wildtyp vergleichbare Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Dies legt nahe, dass die DCs trotz ihres supprimierten Phänotyps in der Lage sind, eine adäquate T-Zell-Antwort einzuleiten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Aktivierung dendritischer Zellen

Die Maturierung dendritischer Zellen ist ein essenzieller Prozess, um eine effektive T-Zell-Antwort einleiten zu können [41]. Neben der Phagozytose und anschließenden Prozessierung der Antigene ist dafür die Aktivierung der Zellen über PRR durch PAMPs notwendig [42, 43]. Bleibt diese aus, reifen die DCs nicht, sondern differenzieren sich zu tolerogenen regulatorischen DCs [44, 45]. Diese sind zwar in der Lage, Antigen zu präsentieren, besitzen aber nicht die Fähigkeit, eine adäquate T-Zell-Antwort einzuleiten, da sie weder die entsprechenden Zytokine sezernieren noch die dafür notwendigen Oberflächenmoleküle exprimieren können [46].

Die DCs in c-myc-Mäusen zeigen einen aktivierten Phänotyp (Abb. 3.10c). In Abschnitt 3.1 konnte gezeigt werden, dass die Maturierung durch Tumorzellen vermittelt wird (Abb. 3.1). Dafür scheinen Zellkontakte notwendig zu sein, weil die Maturierung der DCs nach Kultur in zellfreiem Tumorüberstand ausbleibt (Abb. 3.3). Diese Beobachtungen sind eher ungewöhnlich, da mehrere Tumorentitäten beschrieben sind, in denen die Tumor-infiltrierenden DCs einen unreifen Phänotyp zeigen [47-50]. Auch im untersuchten NKG2D-defizienten Modell sind die DCs, im Gegensatz zum c-myc-Modell, nicht aktiviert (Abb. 3.10b). In diesen Fällen ist aufgrund der mangelnden Expression kostimulatorischer Moleküle auf DCs, keine T-Zell-Aktivierung zu erwarten [51, 52]. Im c-myc-Modell dagegen wäre dies aufgrund des aktivierten Phänotyps jedoch prinzipiell möglich. Allerdings konnte in früheren Untersuchungen bereits demonstriert werden, dass auch die DCs aus c-myc-Mäusen Defizite in der T-Zell-Stimulation aufweisen [28]. Grund dafür scheint u.a. das immunsuppressive, durch die Tumorzellen generierte Zytokinmilieu zu sein (siehe Abb. 3.12a-b und Abschnitt 4.2).

Neben dem oben beschriebenen Ablauf der DC-Aktivierung über PRRs wurde in den letzten Jahren die Existenz eines alternativen Wegs entdeckt: die NK-Zell-vermittelte DC-Aktivierung [53-55]. Dafür sind zelluläre Kontakte (NKp30, NKp46) sowie verschiedene lösliche Faktoren (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12, IL-15, IL-18) nötig [56-58]. Diese Form der DC-Aktivierung stellt u.a. bei blanden Entzündungsverläufen und bestimmten Tumorentitäten eine effektive Maturierung der DCs sicher. Die Bedeutung der NK-Zell-vermittelten DC-Aktivierung für die Tumorbekämpfung konnten Adam et al. demonstrieren. Ihnen gelang es

auf diesem Weg, unabhängig von T-Helfer-Zellen eine effiziente CTL-vermittelte Tumor-Abstoßung zu generieren [24].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen DCs und NK-Zellen näher analysiert (Abschnitt 3.1.5 und 3.4.7). Wie oben erwähnt, scheint IFN- $\gamma$  ein wichtiger Faktor für die DC-Aktivierung zu sein. Dies konnte sowohl in c-myc-Mäusen als auch in NKG2D-defizienten Mäusen bestätigt werden, wie im Folgenden aufgeführt.

In Abschnitt 3.1.5 wurde der unterschiedliche Einfluss von WT-NK-Zellen und NK-Zellen aus c-myc-Mäusen auf die Reifung der DCs untersucht (Abb. 3.6 und 3.7). Es konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellen aus WT-Mäusen zusätzlichen zur Stimulation durch die Tumorzellen einen Beitrag zur DC-Aktivierung leisten. Dies lässt sich durch die Produktion ausreichender Mengen von IFN- $\gamma$  und TNF erklären [59]. Anders zeigte sich die Situation bei dem Einsatz von c-myc-NK-Zellen. Hier bleibt die NK-Zell-vermittelte DC-Aktivierung aus (Abb. 3.7). Aller Wahrscheinlichkeit nach ist das auf die fehlende IFN- $\gamma$ -Produktion der NK-Zellen zurückzuführen, da diese durch die Tumorzellen in einen anergen Zustand versetzt werden [26, 27]. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die Immunantwort. Einerseits führt die mangelhafte Maturierung der DCs zu einer Differenzierung regulatorischer DCs. Eine immunsuppressive T-Zell-Antwort durch Prägung regulatorischer T-Zellen ist die Folge [60]. Andererseits fehlt durch die reduzierte IFN- $\gamma$ -Sekretion ein wichtiger Faktor für die Prägung einer Th1-Antwort [61, 62]. Für eine effektive Tumor-Abstoßung ist diese aber essenziell [29].

Die Bedeutung von IFN- $\gamma$  für die DC-Aktivierung wurde in Abschnitt 3.4.7 durch den Einsatz von NK-Zellen aus NKG2D-defizienten Mäusen weiter untersucht. Wie schon in Abschnitt 3.4.1 erwähnt, zeichnen sich die NKG2D-defizienten NK-Zellen durch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion gegenüber dem WT aus. Es war also zu erwarten, dass die stärkere IFN- $\gamma$ -Sekretion der NKG2D-defizienten NK-Zellen auch eine stärkere Maturierung der DCs vermitteln würde. Die Ergebnisse in Abb. 3.15 bestätigen diese Vermutung.

Das bedeutet, dass die NK-Zell-vermittelte Aktivierung dendritischer Zellen in NKG2D-defizienten Mäusen, im Gegensatz zu c-myc-Mäusen, möglich ist. *In vivo* scheinen die Tumorzellen die dafür nötigen Abläufe jedoch zu hemmen (vergleiche Abb. 3.10b) und so einer effektiven Immunantwort zu entgehen.

## 4.2 Das Zytokinmilieu und die Konsequenzen seiner immunsuppressiven Alteration

Zytokine spielen eine entscheidende modulierende Rolle im Ablauf einer Immunantwort. Das jeweilige Zytokinmilieu wird durch alle anwesenden Komponenten (Immunzellen, Stromazellen, Tumor, Erreger) generiert und ist in seiner Zusammensetzung wichtig für Art und Ablauf der Immunantwort [63, 64].

Das Milieu des c-myc-Tumors zeichnet sich durch eine immunsuppressive Wirkung mit weitreichenden Folgen aus [28]. Von entscheidender Bedeutung sind die hohen IL-10-Spiegel, die eine Differenzierung dendritischer Zellen zu regulatorischen DCs induzieren [49, 65]. Dies wiederum hat unmittelbare Konsequenzen auf die T-Zell-Antwort. Zum einen bewirkt die in DCreg erhöhte IL-10-Expression eine Induktion von regulatorischen T-Zellen [40, 66]. Anstatt einer Tumorbekämpfung resultiert Immunsuppression. Zum anderen prägen sie eine Th2-dominierte Immunantwort, was sich u.a. ungünstig auf die Tumor-Abstoßung auswirkt [28-30].

Das entscheidende Zytokin für die Induktion einer Th1-Antwort ist IL-12 [40, 67]. In den Versuchen in Abschnitt 3.4.4 konnte jedoch gezeigt werden, dass die Tumorzellen und deren Milieu eine Suppression der IL-12-Expression in DCs vermitteln (Abb. 3.12c-d). Dass dafür die oben beschriebenen, durch Tumorzellen generierten hohen IL-10-Spiegel entscheidend mitverantwortlich sind, zeigen die Ergebnisse in Abschnitt 3.2.3. Hier konnte durch die Neutralisation von IL-10 die IL-12-Produktion in DCs wieder hergestellt werden (Abb. 3.9). Das bedeutet, die hohen IL-10-Spiegel im Tumorgewebe supprimieren die IL-12-Produktion in DCs und verhindern so die Induktion einer Th1-dominierten Immunantwort. Dies scheint ein Mechanismus der Tumorzellen zu sein, sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen.

Die niedrige IL-12-Expression in DCs hat aber nicht nur Auswirkungen auf die T-Zell-Antwort. Auch die wechselseitige DC-NK-Zell-Aktivierung benötigt, neben zellulären Kontakten, IL-12 [56, 57]. Insbesondere für die IFN- $\gamma$ -Produktion scheinen NK-Zellen auf ausreichend hohe IL-12-Spiegel angewiesen zu sein [61, 68, 69]. Durch die fehlende IL-12-Sekretion bleibt dieser Stimulus aber aus. Die Möglichkeit einer DC-vermittelten NK-Zell-Aktivierung ist somit gehemmt, was den Tumorzellen einen weiteren Wachstumsvorteil verschafft.

Auch eine NK-Zell-vermittelte DC-Aktivierung ist, wie in Abschnitt 4.1 diskutiert wurde, nur eingeschränkt möglich. Das IFN- $\gamma$  aus NK-Zellen ist aber nicht nur für die Maturierung der DCs wichtig, sondern auch für deren IL-12-Produktion [56]. Durch die Injektion von rekombinantem IFN- $\gamma$  in den Tumor sollte versucht werden, wieder eine IL-12-Produktion in DCs zu generieren (vergleiche Abschnitt 3.2.2). Aus Abbildung 3.8 wird jedoch ersichtlich, dass das nicht möglich war. Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist, dass die verwendeten Tumoren bereits in einem zu fortgeschrittenen Stadium waren und deren Einfluss auf die DCs stärker war, als der des injizierten IFN- $\gamma$ . Lediglich die Expression von CD86 war nach der IFN- $\gamma$ -Injektion gesteigert (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung für diese Beobachtungen bieten die Ergebnisse von Flohé et al.. Sie untersuchten die Rolle dendritischer Zellen in inflammatorischem Gewebe. In frühen Stadien der Entzündung konnte durch die Behandlung immunsuppressiver DCs mit IFN- $\gamma$  eine Differenzierung zu IL-12-sezernierenden DCs bewirkt werden. In fortgeschrittenen Stadien dagegen, scheint das immunsuppressive Zytokinmilieu der Sepsis die Effekte von IFN- $\gamma$  auf die IL-12-Expression zu überlagern, nicht jedoch auf die Expression von CD86 [70].

In NKG2D-defizienten Mäusen dagegen zeigt sich eine andere Situation. Wie oben erwähnt, scheint die Rezeptordefizienz auf bisher unbekannt Weise zu einer gesteigerten IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen zu führen [37, 71]. Dies hat u.a. höhere IFN- $\gamma$ -Spiegel im Tumorgewebe zur Folge. Mit den in Abschnitt 3.4.5 durchgeführten Kokultur-Versuchen, wurde der Einfluss der Tumorzellen auf die DCs untersucht. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist die beobachtete Steigerung der IL-12-Expression in DCs nach Kokultur, u.a. auf die hohen IFN- $\gamma$ -Spiegel zurückzuführen (Abb. 3.13), auch deshalb, weil die IL-12-Produktion nach IFN- $\gamma$ -Neutralisation wieder abnimmt (Abb. 3.14). Allerdings ist davon auszugehen, dass neben IFN- $\gamma$  noch weitere, hier nicht berücksichtigte Faktoren eine Rolle spielen.

### **4.3 T-Zell-Stimulation im NKG2D-defizienten Tumor-Modell**

Aufgrund der Ergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen der NKG2D-Rezeptor-Defizienz und der DC-Maturierung zeigen (Abb. 3.10b), war es naheliegend, der Frage nachzugehen, ob diese noch die Fähigkeit besitzen, T-Zellen zu stimulieren. Aus der Literatur ist von verschiedenen Tumorentitäten bekannt, dass die Tumor-infiltrierenden DCs in dieser Funktion Defizite aufweisen [72, 73]. Auch im c-myc-Modell konnte dies in Voruntersuchun-

gen bereits bestätigt werden [28]. Für die *myc*-transgenen NKG2D-defizienten Mäuse wurde dies aus folgenden Gründen ebenso angenommen: Einerseits zeigen die Untersuchungen zum Zytokinmilieu in Abschnitt 3.4.4 eine Übereinstimmung zum *c-myc*-Modell, was einen ähnlichen Einfluss der Tumorzellen auf die DCs vermuten lässt. Andererseits sind die DCs in tumortragenden NKG2D-defizienten Mäusen phänotypisch supprimiert (Abb. 3.10b). Die entsprechenden, für eine adäquate Stimulation nötigen Rezeptoren werden also nur ungenügend exprimiert. Auch diese Beobachtung ist in der Literatur für verschiedene Tumorentitäten beschrieben worden [50, 73-75].

Die Frage, die hier beantwortet werden sollte, war deshalb nicht, ob die Stimulationsfähigkeit der DCs von Tumorzellen oder deren Milieu beeinflusst wird, sondern ob die NKG2D-Rezeptordefizienz Auswirkungen auf den Stimulationsprozess hat. Darum wurde nur der *NKG2D*<sup>-/-</sup>*myc*<sup>-/-</sup> Genotyp und nicht der *NKG2D*<sup>-/-</sup>*myc*<sup>+/-</sup> Genotyp untersucht.

In den durchgeführten Allostimulationsversuchen ließ sich eindeutig nachweisen, dass die DCs aus NKG2D-defizienten Mäusen über die gleiche Stimulationsfähigkeit verfügen wie diejenigen aus WT-Mäusen (Abb. 3.19). Dies legt die Vermutung nahe, dass der NKG2D-Rezeptor nicht in den Prozess der T-Zell-Stimulation involviert ist.

Die DCs aus NKG2D-defizienten Mäusen sind also potenziell in der Lage, T-Zellen für die Immunantwort zu stimulieren. Eine insuffiziente Maturierung der DCs und das immunsuppressive Zytokinmilieu des Tumors stehen dem aber im Wege.

#### **4.4 Immunantwort NKG2D-defizienter Mäuse**

Wie oben bereits ausgeführt, ist für eine Tumorbekämpfung durch das Immunsystem eine Th1-gewichtete Immunantwort von essenzieller Bedeutung [29, 30].

Die Zytokinverhältnisse in NKG2D-defizienten Mäusen und ihre Veränderung gegenüber dem *c-myc*-Modell waren Ausgangspunkte für den Immunisierungsversuch in vorliegender Arbeit (Abschnitt 3.4.8). Er fokussiert in seiner Fragestellung eine in Abschnitt 3.4.1 erwähnte und unter Abschnitt 4.1 und 4.2 diskutierte Beobachtung: die gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen [37]. Aus der Literatur ist bekannt, dass neben DCs v.a. NK-Zellen mit den von ihnen sezernierten Zytokinen einen wesentlichen Beitrag zur T-Zell-Prägung leisten können [76-78]. Mit dem Immunisierungsversuch konnte gezeigt werden, dass dies auch für die Immunantwort in NKG2D-defizienten Mäusen zutrifft. Wie die Berechnung der reziproken Titer aus

Abbildung 3.16 ergibt, ist das Th2/Th1-Verhältnis zwar immer noch Th2-dominiert. Allerdings nur noch um das 2,3-fache, was den Verhältnissen im WT entspricht (Abb. 3.17). Im c-myc-Modell dagegen, war die Th2-Antwort um das 15-fache überlegen [28]. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass u.a. die gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion der NK-Zellen einen Beitrag zu einer weniger Th2-dominierten Immunantwort leisten kann. Die Veränderung des Zytokinmilieus könnte somit ein Ansatzpunkt auf dem Weg zur einer besseren Tumorkontrolle sein.

Ein weiteres Ergebnis der Immunantwort in NKG2D-defizienten Mäusen zeigt, dass die Immunglobulin-Titerbildung gegenüber der WT-Kontrolle reduziert ist (Daten nicht gezeigt). Dies stimmt mit Untersuchungen von Khuda et al. überein. Sie konnten zeigen, dass eine De-regulierung von c-myc sich unmittelbar auf die Immunantwort von B-Zellen und Plasmazellen auswirkt. Es kommt zu einer Störung der primären und sekundären Antikörperbildung, wobei die Reifung und der Klassenwechsel noch ungestört stattfinden können, die Differenzierung zu Plasmazellen jedoch durch vorzeitige Apoptose verhindert wird [79]. In früheren Immunisierungsversuche an c-myc-Mäusen konnte dies ebenfalls bestätigt werden [28].

Das bedeutet, dass nicht nur das Verhältnis zwischen Th2- und Th1-Antwort in NKG2D-defizienten Mäusen eine Tumor-Abstoßung schwierig macht, sondern auch eine generell supprimierte humorale Immunität der Tumorprogression Vorschub leisten könnte.

## 4.5 Ausblick

Sowohl diese Arbeit als auch frühere Untersuchungen am c-myc-Modell haben dazu beigetragen, Funktion und zelluläre Interaktion der DCs im Tumorgewebe aufzuklären. Auch die Rolle der NK-Zellen wurde in verschiedenen Projekten bereits näher beschrieben. Neben diesen Beobachtungen der angeborenen Immunität myc-transgener Mäuse ist als nächstes die Charakterisierung der adaptiven Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Zudem wäre die Analyse intrazellulärer Signalkaskaden ein weiterer Ansatz um ein differenzierteres Verständnis der bisherigen Beobachtungen zu gewinnen.

Daneben stellen die NKG2D-defizienten Mäuse eine interessante Möglichkeit dar, weitere Erkenntnisse über die Rolle des Rezeptors in der Immunüberwachung und Tumorabwehr zu erlangen. Hier gilt es insbesondere die Rolle der NK-Zellen näher zu untersuchen und den beobachteten Zusammenhang der DC-Maturierung mit der Rezeptor-Defizienz aufzuklären.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Topalian, S.L., G.J. Weiner, and D.M. Pardoll, *Cancer immunotherapy comes of age*. J Clin Oncol, 2011. **29**(36): p. 4828-36.
2. Kruger, C., T.F. Greten, and F. Korangy, *Immune based therapies in cancer*. Histol Histopathol, 2007. **22**(6): p. 687-96.
3. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 480-9.
4. Vanneman, M. and G. Dranoff, *Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 237-51.
5. Herold, G., *Innere Medizin*. 2010: Herold, G.
6. Renz-Polster, H., Krauzig, S., *Basislehrbuch Innere Medizin*, ed. Auflage. 2008: Elsevier GmbH, München.
7. Jaffe, E.S. and S. Pittaluga, *Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 506-14.
8. Molyneux, E.M., et al., *Burkitt's lymphoma*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1234-44.
9. Jaffe, E.S., *The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 523-31.
10. Fujita, S., et al., *Early stage of Epstein-Barr virus lytic infection leading to the "starry sky" pattern formation in endemic Burkitt lymphoma*. Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(5): p. 549-52.
11. Kovalchuk, A.L., et al., *Burkitt lymphoma in the mouse*. J Exp Med, 2000. **192**(8): p. 1183-90.
12. Hori, M., et al., *Non-Hodgkin lymphomas of mice*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(1): p. 217-22.
13. Diefenbach, C.S. and C. Steidl, *New Strategies in Hodgkin Lymphoma: Better Risk Profiling and Novel Treatments*. Clin Cancer Res, 2013.
14. Franks, H.A., Q. Wang, and P.M. Patel, *New anticancer immunotherapies*. Anticancer Res, 2012. **32**(7): p. 2439-53.
15. Chung, D.S., C.H. Kim, and Y.K. Hong, *Animal models for vaccine therapy*. Adv Exp Med Biol, 2012. **746**: p. 143-50.
16. Jonkers, J. and A. Berns, *Conditional mouse models of sporadic cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 251-65.
17. Becker, J.C., et al., *Mouse models for melanoma: a personal perspective*. Exp Dermatol, 2010. **19**(2): p. 157-64.
18. Ding, Y., et al., *Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice*. Pancreas, 2010. **39**(3): p. 283-92.
19. Finn, O.J., et al., *Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor models for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas*. Immunol Res, 2011. **50**(2-3): p. 261-8.
20. Nomura, T., *Practical development of genetically engineered animals as human disease models*. Lab Anim Sci, 1997. **47**(2): p. 113-7.

21. Van Dyke, T. and T. Jacks, *Cancer modeling in the modern era: progress and challenges*. Cell, 2002. **108**(2): p. 135-44.
22. Gendler, S.J. and P. Mukherjee, *Spontaneous adenocarcinoma mouse models for immunotherapy*. Trends Mol Med, 2001. **7**(10): p. 471-5.
23. Singh, M. and L. Johnson, *Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: an industry perspective*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5312-28.
24. Adam, C., et al., *DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction*. Blood, 2005. **106**(1): p. 338-44.
25. Mocikat, R., et al., *Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 561-9.
26. Brenner, C.D., *Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München*. 2010.
27. Brenner, C.D., et al., *Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**(2): p. 494-504.
28. Naujoks, M., *Untersuchungen zur Funktion von dendritischen Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell*, in *Medizinische Fakultät der LMU München*. 2011.
29. Przewoznik, M., et al., *Recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma: implications for therapeutic cell transfer*. J Immunother, 2012. **35**(3): p. 217-22.
30. Shurin, M.R., et al., *Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy*. Springer Semin Immunopathol, 1999. **21**(3): p. 339-59.
31. Steinman, R.M., *Decisions about dendritic cells: past, present, and future*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 1-22.
32. Belz, G.T. and S.L. Nutt, *Transcriptional programming of the dendritic cell network*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 101-13.
33. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. Nat Immunol, 2000. **1**(3): p. 199-205.
34. Kalinski, P., et al., *Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 535-9.
35. Guerra, N., et al., *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 571-80.
36. Zafirova, B., et al., *Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(21): p. 3519-29.
37. Arbeitsgruppe Mocikat, Lena Belting, persönliche Mitteilung.
38. Millar, D.G., et al., *Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1469-76.
39. Walzer, T., et al., *Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses*. Expert Opin Biol Ther, 2005. **5 Suppl 1**: p. S49-59.
40. Volz, T., S. Kaesler, and T. Biedermann, *Innate immune sensing 2.0 - from linear activation pathways to fine tuned and regulated innate immune networks*. Exp Dermatol, 2012. **21**(1): p. 61-9.
41. Blanco, P., et al., *Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 41-52.

42. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(1): p. 10-6.
43. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(3).
44. Davison, G.M., *Dendritic cells, T-cells and their possible role in the treatment of leukaemia and lymphoma*. *Transfus Apher Sci*, 2010. **42**(2): p. 189-92.
45. Mahnke, K., et al., *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. *Immunol Cell Biol*, 2002. **80**(5): p. 477-83.
46. Wakkach, A., et al., *Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo*. *Immunity*, 2003. **18**(5): p. 605-17.
47. Troy, A.J., et al., *Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(3): p. 585-93.
48. Troy, A., et al., *Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer*. *J Urol*, 1998. **160**(1): p. 214-9.
49. Enk, A.H., et al., *Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma*. *Int J Cancer*, 1997. **73**(3): p. 309-16.
50. Chaux, P., et al., *Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats*. *Int J Cancer*, 1997. **72**(4): p. 619-24.
51. Tas, M.P., et al., *Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones*. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. **36**(2): p. 108-14.
52. Gabrilovich, D.I., I.F. Ciernik, and D.P. Carbone, *Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts*. *Cell Immunol*, 1996. **170**(1): p. 101-10.
53. Kalinski, P., et al., *Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy*. *Expert Opin Biol Ther*, 2005. **5**(10): p. 1303-15.
54. Moretta, A., *Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(12): p. 957-64.
55. Cooper, M.A., et al., *NK cell and DC interactions*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(1): p. 47-52.
56. Vitale, M., et al., *NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the Nkp30 triggering receptor*. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 566-71.
57. Wehner, R., et al., *The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells*. *J Innate Immun*, 2011. **3**(3): p. 258-63.
58. Wai, L.E., et al., *Distinct roles for the NK cell-activating receptors in mediating interactions with dendritic cells and tumor cells*. *J Immunol*, 2011. **186**(1): p. 222-9.
59. Piccioli, D., et al., *Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 335-41.
60. Belkaid, Y. and G. Oldenhove, *Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells*. *Immunity*, 2008. **29**(3): p. 362-71.
61. Moretta, A., *The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(3): p. 306-11.
62. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(12): p. 1260-5.

63. Gottfried, E., M. Kreutz, and A. Mackensen, *Tumor metabolism as modulator of immune response and tumor progression*. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(4): p. 335-41.
64. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 445-89.
65. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. *J Immunol*, 1997. **159**(10): p. 4772-80.
66. Groux, H., et al., *A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells*. *J Immunol*, 1999. **162**(3): p. 1723-9.
67. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **311**: p. 17-58.
68. Walzer, T., et al., *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2252-8.
69. Koka, R., et al., *Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3594-8.
70. Flohe, S.B., et al., *Diversity of interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in restoring immune dysfunction of dendritic cells and macrophages during polymicrobial sepsis*. *Mol Med*, 2008. **14**(5-6): p. 247-56.
71. Zafirova, B., et al., *Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to mouse cytomegalovirus in NKG2D-deficient mice*. *Immunity*, 2009. **31**(2): p. 270-82.
72. Motta, J.M., C.R. Nascimento, and V.M. Rumjanek, *Leukemic cell products down-regulate human dendritic cell differentiation*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(11): p. 1645-53.
73. Sato, K., et al., *Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells*. *Blood*, 2003. **101**(9): p. 3581-9.
74. Chauv, P., et al., *Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation*. *Lab Invest*, 1996. **74**(5): p. 975-83.
75. Nestle, F.O., et al., *Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(2): p. 641-51.
76. Gerosa, F., et al., *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 327-33.
77. Mailliard, R.B., et al., *Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function*. *J Immunol*, 2003. **171**(5): p. 2366-73.
78. Agaoglu, S., et al., *Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1776-83.
79. Khuda, S.E., et al., *Deregulation of c-Myc Confers distinct survival requirements for memory B cells, plasma cells, and their progenitors*. *J Immunol*, 2008. **181**(11): p. 7537-49.

## 6 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. R. Mockiat, der mir als erfahrener Doktorvater die Grundlagen für fundiertes wissenschaftliches Arbeiten vermittelt hat.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Prof. D. J. Schendel, PhD, die es mir ermöglichte, diese Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrum München zu verfassen.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe Mocikat bedanken, die mir jeder Zeit mit Rat und Tat und guter Laue zur Seite stand.

Außerdem gilt mein Dank dem gesamten Team der Tierhaltung für die Hilfe und Arbeit im Tierstall und Andrew Flatley, für die Unterstützung bei der Auswertung des Immunisierungsversuchs.

## **7 Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die hier vorliegende Arbeit von mir allein und ausschließlich unter Verwendung der erlaubten Quellen und Hilfsmittel verfasst wurde.

München, den 21.07.2014

---

Jakob Weiß