

Das immunsuppressive B7-H1 Molekül bei regulatorischen
T-Zellen, suppressiven Zellen myeloider Abstammung und
dendritischen Zellen in antitumoraler Immunantwort beim
Pankreasadenokarzinom

Von Caroline Maier

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Das immunsuppressive B7-H1 Molekül bei regulatorischen
T-Zellen, suppressiven Zellen myeloider Abstammung und
dendritischen Zellen in antitumoraler Immunantwort beim
Pankreasadenokarzinom

Von Caroline Maier
Aus Starnberg

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt in der Chirurgischen Klinik der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

(Betreuer: Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin, Dr. Svetlana Karakhanova)

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Marlon R. Schneider
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Das humane duktales Pankreasadenokarzinom	1
1.1.1	Anatomie des Pankreas	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Ätiologie.....	3
1.1.4	Symptome.....	4
1.1.5	Diagnose	4
1.1.6	Therapie und Prognose.....	6
1.1.6.1	Chirurgische Resektion	6
1.1.6.2	Neoadjuvante Therapie	7
1.1.6.3	Adjuvante Therapie.....	7
1.1.6.4	Palliative Therapie.....	8
1.1.7	Pathologie.....	9
1.2	Das duktales Pankreasadenokarzinom beim Tier	9
1.3	Immunologie	11
1.3.1	Das Immunsystem	11
1.3.1.1	Das angeborene Immunsystem	11
1.3.1.2	Das adaptive Immunsystem.....	12
1.3.2	Die Zellen des Immunsystems	12
1.3.2.1	Zellen der lymphatischen Reihe.....	13
1.3.2.2	Zellen der myeloiden Reihe	15
1.3.2.3	Dendritische Zellen als Brückenglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität	16
1.3.3	Tumorimmunologie	18
1.3.3.1	Anti-Tumor-Immunantwort	18
1.3.3.2	Immunsuppressive Umgebung	18
1.4	Ziel dieser Arbeit	24
2	Material- und Methodenteil.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Laborgeräte	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3	OP-Materialien	28
2.1.4	Pharmaka.....	29
2.1.5	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	30
2.1.6	Beads für die Kompensation.....	32
2.1.7	Beads für die magnetische Zellseparation (MACS).....	33
2.1.8	Lösungen, Medien und Puffer	34
2.1.8.1	Zellkultur	35
2.1.8.2	Puffer für das Durchflusszytometer (FACS)	35
2.1.8.3	MACS-Puffer	36

2.1.9	Luminex	36
2.1.10	Software	36
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Das orthotope Mausmodell.....	37
2.2.1.1	Mäuse	37
2.2.1.2	Tierstall	37
2.2.1.3	Panc02 Zelllinie	37
2.2.1.4	Vorbereitung der Panc02 Zellen für die OP	38
2.2.1.5	Orthotopes Mausmodell.....	38
2.2.2	Präparation von Milzen und Tumoren.....	39
2.2.3	Herstellung einer Einzelzellsuspension.....	40
2.2.3.1	Milzen	40
2.2.3.2	Tumoren.....	40
2.2.4	Durchflusszytometrie	40
2.2.4.1	Durchflusszytometer (FACS)	40
2.2.4.2	Cytometer Setup & Tracking (CS&-T) Beads	41
2.2.4.3	Kompensation	41
2.2.4.4	Phänotypisierung	41
2.2.4.5	Extrazelluläres Anfärben.....	42
2.2.4.6	Intrazelluläres Anfärben	43
2.2.5	Magnetische Zellseparation – Das MACS-Verfahren.....	43
2.2.5.1	MACS-Isolation von T _{reg}	43
2.2.5.2	MACS-Isolation von MDSC.....	44
2.2.5.3	MACS-Isolation von DC	46
2.2.5.4	Reinheitsmessung.....	46
2.2.6	Untersuchung der Aktivität der einzelnen Zellpopulationen	47
2.2.6.1	Proliferations-/Suppressionsmarker	47
2.2.6.2	Verwendung des B7-H1 Antikörpers.....	47
2.2.6.3	Ko-Kultivierung	47
2.2.7	Luminex	48
2.2.8	Statistik	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Charakterisierung der Expression von PD-1 auf Immunzellen	50
3.1.1	Splenozyten aus gesunden Mäusen	50
3.1.1.1	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	50
3.1.1.2	Regulatorische und konventionelle T-Zellen, CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ Zellen..	55
3.1.1.2.1	Regulatorische T-Zellen (T _{reg}).....	57
3.1.1.2.2	Konventionelle T-Zellen (T _{con}).....	59
3.1.1.2.3	CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁺ T-Zellen	60
3.1.1.2.4	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen (T _{con} aktiviert)	61
3.1.1.3	Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen)	63
3.1.1.3.1	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).....	64
3.1.1.3.2	Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen)	65
3.2	Untersuchung der Effekte einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche von T_{reg} auf ihr Suppressionspotential	67
3.2.1	T _{reg} aus Splenozyten gesunder C57BL/6 WT-Mäuse.....	67
3.2.1.1	Suppressionsanalyse - Auswertungsstrategie der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg}	68
3.2.1.2	Weitere Auswertungen der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg}	73

3.3	Untersuchung der Effekte einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche von MDSC auf ihr Suppressionspotential	75
3.3.1	Vergleich zwischen MDSC aus Tumoren und Knochenmark	75
3.3.1.1	Auswertungsstrategie	75
3.3.2	MDSC aus Tumoren von C57BL/6 WT-Mäusen	78
3.3.2.1	Auswertungsstrategie der CD3 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen	78
3.3.2.2	Untersuchung der Effekte von MDSC auf T _{reg} , T _{con} , T _{con} aktiviert und CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen	83
3.3.2.2.1	T _{reg} , CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen	85
3.3.2.2.2	T _{con} , CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen	86
3.3.2.2.3	T _{con} aktiviert, CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen	87
3.3.2.2.4	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen	88
3.3.2.3	Das suppressive Verhalten der MDSC	90
3.4	Untersuchung der Effekte einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche von DC auf ihr Proliferationsverhalten	92
3.4.1	DC aus Tumoren von C57BL/6 WT-Mäusen	92
3.4.1.1	Proliferationsanalyse - Auswertungsstrategie der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC	92
3.4.1.2	Weitere Auswertungen der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC	96
3.5	Luminex-Analyse	98
3.5.1	Bestimmung der Zytokine aus den Mediumüberständen der Proliferations-/Suppressionsanalyse aus Ko-Kulturen mit T _{reg}	99
3.5.1.1	IFN γ	99
3.5.1.2	IL-1 β	99
3.5.1.3	IL-2	100
3.5.1.4	IL-6	101
3.5.1.5	IL-10	101
3.5.1.6	TGF β	102
3.5.1.7	IL-17	103
3.5.1.8	VEGF	103
3.5.2	Bestimmung der Zytokine aus den Mediumüberständen der Proliferations-/Suppressionsanalyse aus Ko-Kulturen mit MDSC	104
3.5.2.1	IFN γ	104
3.5.2.2	IL-1 β	105
3.5.2.3	IL-2	106
3.5.2.4	IL-6	106
3.5.2.5	IL-10	107
3.5.2.6	IL-17	108
3.5.2.7	VEGF	108
3.5.2.8	TGF β	109
3.5.2.9	KC (CXCL1)	110
3.5.2.10	TNF α	110
3.5.3	Bestimmung der Zytokine aus den Mediumüberständen der Proliferations-/Suppressionsanalyse aus Ko-Kulturen mit DC	111
3.5.3.1	IFN γ	111
3.5.3.2	IL-2	112
3.5.3.3	IL-10	113
3.5.3.4	IL-17	114
3.5.3.5	IL-1 β	114
3.5.3.6	IL-6	115
3.5.3.7	TGF β	116

3.5.3.8	VEGF.....	117
4	Diskussion.....	118
5	Zusammenfassung	133
6	Summary	135
III.	Literaturverzeichnis	136
IV.	Abbildungsverzeichnis.....	144
V.	Tabellenverzeichnis.....	147
VI.	Danksagung	148

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APC	antigen-presenting cells (Antigenpräsentierende Zellen)
APC-Cy 7	Allophycocyanine-cyanine-7
B7.1	CD80
B7.2	CD86
B7-DC	programmed death-ligand 2, PD-L2, CD273
B7-H1	programmed death-ligand 1, PD-L1, CD274
B7-H1 KO-Mäuse	B7-H1 ^{-/-} knock-out Mäuse
BMI	Body mass index
BRCA1 und 2	BReast CAncer 1 und 2
BSA	Bovines Serum Albumin
BSF-2	B cell Stimulatory Factor 2
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator, CD272
CD	Cluster of differentiation
cDC	conventional DC (konventionelle DC)
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
cm	Zentimeter

cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS&-T Beads	Cytometer setup and tracking beads
CT	Computertomographie
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ESPAC	European Study Group for Pancreatic Cancer
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAMMM-Syndrom	Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom
FCS	Fetal-Calve-Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
g	Gravität (Zentrifuge)
g	Gramm
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution

HCL	Salzsäure
HNPPC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
<i>HPGF</i>	Hybridoma/plasmacytoma growth factor
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
ICOS	Inducible T-cell CoStimulator
IFN γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
iNOS	nitric oxide synthase
iT _{reg}	induzierte oder adaptive T _{reg}
KEB	Klinisch experimenteller Bereich
kg	Kilogramm
MACS	Magnetic activated cell sorting
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC-I/-II	Major Histocompatibility Complex -I/-II
min	Minuten
ml	milliliter
mm	millimeter
mM	Millimol
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zellen
nT _{reg}	natürliche T _{reg}
OP	Operation

p	Signifikanzniveau
PaCa	Pankreasadenokarzinom
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death protein1
PD-L1	programmed death-ligand 1, B7-H1, CD274
PD-L2	programmed death-ligand 2, B7-DC, CD273
pDC	plasmacytoid DC (plasmazytäre DC)
PE	phycoerythrin
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PE-Cy7	phycoerythrin-cyanine
PerCP-Cy5.5	peridinin chlorophyll protein complex- cyanin 5.5
rev/min	revolutions per minute
RKI	Robert-Koch-Institut
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Zellkulturmedium nach dem <i>Roswell Park Memorial Institute</i> benannt
s.c.	subkutan
SCF	stem-cell factor
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SSC	Side Scatter
T _{con}	konventionelle T-Zellen
TCGF	T-cell growth factor
TCR	T-cell antigen receptor
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll like receptor

T _{reg}	regulatorische T-Zellen
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol%	Volumenprozent
WT-Mäuse	Wildtyp-Mäuse, C57BL/6
α	alpha
β	beta
γ	gamma
ζ	zeta

1 Einleitung

1.1 Das humane duktale Pankreasadenokarzinom

Das humane duktale Pankreasadenokarzinom (PaCa) ist einer der tödlichsten soliden Tumoren weltweit. Trotz der bedeutenden Fortschritte in der Diagnostik und Erkennung des PaCa, die in den letzten Jahren gemacht wurden, und der Entwicklung des Verständnisses über die molekularen und zellulären Mechanismen, die bei dem Zustandekommen des PaCa eine bedeutende Rolle spielen, besteht immer noch ein Mangel an erfolgreichen therapeutischen Ansätzen. Das schlechte Ansprechen auf Medikamente und vorherrschende Therapieresistenzen im PaCa stellen auch die moderne Medizin immer wieder vor neue Herausforderungen.

Um die Situation von betroffenen Patienten zu verbessern, wird auch weiterhin an neuen, erfolgsversprechenden Behandlungsmethoden, wie beispielsweise Immuntherapien, geforscht. Das Ziel ist es, einen längerfristigen Erfolg in der Bekämpfung des PaCa zu erwirken, weshalb unser Verständnis über die Immunologie und die Pathophysiologie dieses Karzinoms im Speziellen verbessert werden soll und muss.

1.1.1 Anatomie des Pankreas

Das Pankreas ist ein 13-15cm langes, keilförmiges Gebilde, welches sich anatomisch in folgende drei Abschnitte gliedert: Caput pancreatis, Corpus pancreatis und Cauda pancreatis, wobei der Pankreaskopf den breitesten Teil ausmacht. Das Pankreas ist retroperitoneal auf Höhe des 2. Lendenwirbels zwischen Magen und der Aorta und Vena cava inferior gelegen. Seine zwei Ausführungsgänge, der Ductus pancreaticus und der Ductus choledochus münden auf der Papilla duodeni major und stehen somit mit dem Duodenum in Verbindung [1].

Das Pankreas besitzt sowohl exokrine, als auch endokrine Funktionen. Bei dem exokrinen Anteil handelt es sich um eine rein seröse Drüse, welche viele verschiedene Verdauungsenzyme sezerniert und über den Ductus pancreaticus in das Duodenum abgibt. Den endokrinen Anteil machen die sog. Langerhans-Inseln aus, welche sich aus endokrinen Epithelzellen zusammensetzen. Sie produzieren Hormone, wie Insulin und Glucagon und regulieren damit den Blutzuckerspiegel [1].

Das Pankreas übernimmt somit eine wichtige Rolle im gesunden Organismus, ist jedoch oft auch Ziel von verschiedenen Erkrankungen.

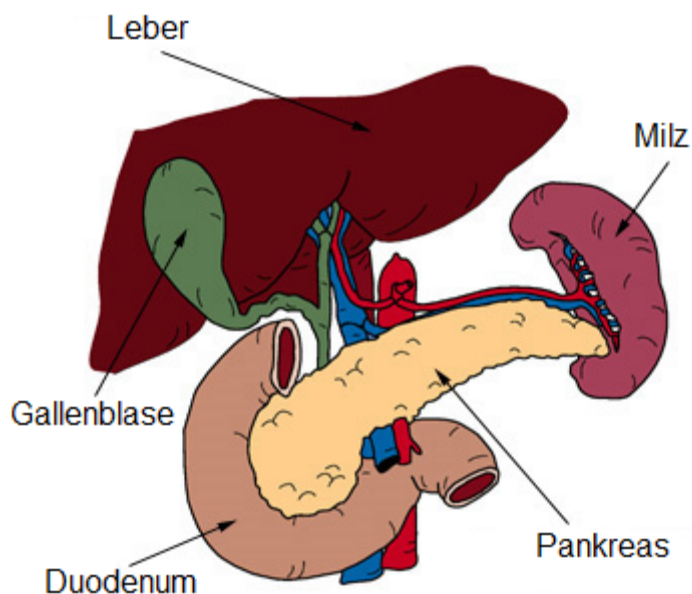


Abbildung 1.1.1-1 Anatomische Lage des Pankreas; modifizierte Abbildung aus: [2]

1.1.2 Epidemiologie

Das PaCa ist eines der aggressivsten humanen Neoplasien und laut einer aktuellen Studie der American Cancer Society aus dem Jahre 2012 die viert häufigste Krebstodesursache bei Erwachsenen. Häufiger anzutreffen sind nur noch Lungen- und Bronchialkrebs, gefolgt von Prostatakrebs beim Mann bzw. Brustkrebs bei der Frau und dem an dritter Stelle stehenden Darmkrebs. Aufgrund der sehr schlechten Prognose beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate der PaCa-Patienten geschätzte 6%. Die Inzidenz beim Erwachsenen beläuft sich in den USA im Jahre 2012 schätzungsweise auf ca. 12 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner (mit 43.920 Neuerkrankungen und 37.390 Todesfällen) [3].

Laut einer aktuellen Publikation des Robert-Koch-Instituts (RKI) erkrankten im Jahr 2010 rund 477.300 Menschen in Deutschland neu an Krebs, davon über 16.000 am PaCa [4, 5].

Die Ursachen der Entstehung dieser Erkrankung sind noch nicht vollständig erforscht, jedoch können durch statistische Auswertungen epidemiologischer Daten Vermutungen geäußert werden.

1.1.3 Ätiologie

Epidemiologische Daten deuten unter anderem darauf hin, dass Umweltfaktoren eine große Rolle spielen. Der stärkste Risikofaktor, der von der Umwelt ausgeht, ist der Konsum von Zigaretten. In einer Metaanalyse von 82 Studien wurde gezeigt, dass das Risiko ein PaCa zu entwickeln bei Rauchern um 75% erhöht ist. Auch schwerer Alkoholabusus wird mit einem erhöhten Risiko in Verbindung gebracht [6].

Das Alter spielt mit einem medianen Alter von 72 Jahren zum Diagnosezeitpunkt ebenfalls eine bedeutende Rolle als Risikofaktor. Patienten unter 50 Jahren unterliegen einem geringen Risiko ein PaCa zu entwickeln (10,4 von 100.000), jedoch kommt es dann zu einem starken Anstieg bei einem Alter von 75-79 Jahren (73,5 von 100.000) und nimmt mit steigendem Alter weiterhin zu [6]. Als weiterer bedeutender demografischer Faktor gilt das Geschlecht. In den USA konnte gezeigt werden, dass Männer (13,5 von 100,000) einem höheren Risiko unterliegen an einem PaCa zu erkranken als Frauen (10,8 von 100,000) [6].

Übergewicht (erhöhter BMI = body mass index) bzw. Fettleibigkeit -bei Männern mit einem BMI >35 und bei Frauen mit einem BMI >40- wird ebenfalls als ein Risikofaktor für das Erkranken an einem PaCa gesehen, was unter anderem in mehreren großen Studien bewiesen werden konnte [7-9]. Übergewicht wird zudem als erhöhter Risikofaktor für Diabetes mellitus gezählt. Obwohl aufgrund epidemiologischer Studien die Theorie eines Zusammenhangs von Diabetes mellitus mit der Entwicklung eines PaCa existiert, variieren die Ergebnisse deutlich nach Länge der Zeit zwischen der Diagnose eines PaCa und der des Diabetes [6]. Als weitere Vorläufererkrankung wird eine chronische Pankreatitis mit dem erhöhten Risiko, ein PaCa zu entwickeln, in Verbindung gebracht [10]. Es konnten viele Wachstumsfaktoren sowie pro- und antiinflammatorische Zytokine bei einer chronischen Pankreatitis nachgewiesen werden, welche ebenso im Mikromilieu des PaCa vorkommen und das Tumorstadium unterstützen. Dies lässt die Vermutung zu, dass bei einer chronischen Pankreatitis und bei der Tumorentwicklung ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen und damit das Tumorrisiko durch eine chronische Pankreatitis erhöht wird [11].

Des Weiteren wird bei 5-10% der PaCa-Patienten eine vererbte genetische Prädisposition für ein erhöhtes Risiko, einen Pankreastumor zu entwickeln, erwogen. Hier werden eine erbliche Pankreatitis, das Peutz-Jeghers Syndrom, das FAMMM-

Syndrom (Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom) und das HNPCC (Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom) oder auch Lynch-Syndrom genannt [12]. Besonders häufig wurden bei PaCa-Patienten Mutationen des *KRAS*-Onkogens und der Tumorsuppressorgene p53 und p16 beobachtet [13, 14]. Außerdem werden als wichtige Faktoren Mutationen in der Keimbahn diskutiert. Hierbei spielen die Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* (BReast CAncer 1 und 2), welche für ein erhöhtes Risiko an Brust- und Ovarialkrebs zu erkranken, verantwortlich sind, eine wichtige Rolle. Diese Mutationen können auch zu der Entstehung eines PaCa führen [6].

Ungeachtet der Ätiologie ist das PaCa durch seine kaum wahrzunehmenden Symptome erst sehr spät erkennbar. Einige Anzeichen sind aber bei genauerer Betrachtung dem PaCa zuzuordnen und sollen im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden.

1.1.4 Symptome

Die hohe Mortalitätsrate beim PaCa ist darauf zurückzuführen, dass die Diagnose bei der überwiegenden Mehrheit an Patienten aufgrund der unspezifischen Symptomatik erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt wird. Oft ist es dann bereits zur Ausbildung von Metastasen gekommen und die Patienten befinden sich in einem inoperablen Zustand [14].

Typische Symptome sind dann Oberbauch- und mittlere Rückenschmerzen, Gewichtsverlust und Ikterus. Der Gewichtsverlust kann auf Anorexie, eine Maldigestion aufgrund einer Obstruktion des Pankreasganges und auf Kachexie zurückgeführt werden. Der Ikterus wird ebenfalls mit der Verengung bzw. Obstruktion des Gallenganges in Verbindung gebracht. Zudem kann es zu einer tiefen oder oberflächlichen Venenthrombose kommen, was charakteristisch für das Vorhandensein einer bösartigen Krankheit sein kann. Gelegentlich tritt im fortgeschrittenen Stadium Übelkeit und Erbrechen auf [15].

Diese unspezifische Symptomatik erschwert eine frühzeitige Diagnosestellung erheblich.

1.1.5 Diagnose

Für die Erstellung einer Diagnose können mehrere Möglichkeiten herangezogen werden. Zu den diagnostischen Standards gehört neben der Erhebung der

Anamnese und der Untersuchung des Patienten auch der abdominale Ultraschall. Dieser bietet sich zur primären Orientierung zwar an, erlaubt jedoch aufgrund seiner geringen diagnostischen Sensitivität im Falle des PaCa keine sichere Diagnose [15].

Als Mittel der Wahl gilt die dreidimensionale Darstellung durch die Computertomographie (CT), womit mit einer Wahrscheinlichkeit von 80% die mögliche Resezierbarkeit des Tumors festgestellt werden kann. Sollten Patienten die intravenöse Initiierung des Kontrastmittels für die CT nicht vertragen, kann eine Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) herangezogen werden [16].

Eine weitere Möglichkeit ein PaCa zu diagnostizieren, ist die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP). Hierbei besteht auch die Möglichkeit einer Probenentnahme z.B. durch eine Feinnadelaspiration für eine Zytologie [16].

Die Positron-Emissions-Tomographie (PET) wird nicht zur Routinediagnostik herangezogen, kann aber zum Nachweis von Metastasen dienen. Des Weiteren können mittels Röntgenaufnahmen des Thorax bzw. einer CT des Thorax ebenfalls Metastasen in der Lunge nachgewiesen werden [16].

Der Serum-Tumormarker CA 19-9 stellt eine weitere Option dar, um den Verlauf bzw. das Fortschreiten des PaCa zu dokumentieren, weist jedoch für eine erste Diagnose keine überzeugende Sensitivität und Spezifität auf [16].

Beim sog. *Staging* können die Patienten bzw. deren Tumoren in verschiedene Entwicklungsstadien eingeteilt werden. Von primär resezierbar spricht man, wenn der behandelnde Arzt eine R0-Resektion vornehmen kann, das heißt der Tumor kann im Gesunden entfernt werden und histopathologisch ist kein Tumorgewebe im Resektionsrand mehr nachweisbar. Dies trifft bei etwa 10% der Patienten zu und es ist mit einer medianen Überlebenszeit von 17-23 Monaten zu rechnen. Als nächstes Stadium wird *borderline* resezierbar bzw. potentiell sekundär resezierbar beschrieben, d.h. bei diesen Patienten besteht ein deutlich erhöhtes Risiko einer R1- bzw. R2-Resektion. Von R1-Resektion spricht man, wenn der Tumor zwar entfernt werden kann, jedoch mikroskopisch noch Tumoranteile im Resektionsrand zu finden sind. Bei der R2-Resektion bleiben makroskopisch Tumoranteile zurück. Dieses Stadium tritt ebenfalls bei ca. 10% der Patienten mit einer medianen Überlebenszeit von 20 Monaten auf. Bei 30% der Patienten ist der Tumor zum Diagnosezeitpunkt bereits lokal fortgeschritten bzw. nicht resezierbar und die mediane Überlebenszeit

liegt zwischen 8-14 Monaten. Im letzten Stadium ist es bereits zur Ausbildung von Metastasen gekommen, sodass nur noch mit einer medianen Überlebenszeit von 4-6 Monaten zu rechnen ist [16].

Abhängig von der Diagnose und diesem *Staging* kann folglich über mögliche Therapien nachgedacht werden. Im nächsten Abschnitt soll genauer auf die aktuell bestehenden Therapiemöglichkeiten eingegangen werden.

1.1.6 Therapie und Prognose

Gegenwärtig gilt als einzig vernünftige Chance für ein längerfristiges Überleben die radikale chirurgische Resektion als kurative Therapiemöglichkeit. Diese Behandlungsmethode kommt jedoch nur bei annähernd 20% der Patienten in Frage, bei denen sich das vorhandene Tumorgewebe auf das Pankreas begrenzt [17]. Um das Risiko eines Rezidivs zu verhindern, besteht danach die Möglichkeit einer adjuvanten Chemotherapie. In den meisten Fällen jedoch werden die Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium vorgestellt, entweder lokal fortgeschritten (keine R0 Resektion mehr möglich) oder bereits mit Metastasenbildung (60%) [18]. Für diese Patienten besteht die Möglichkeit einer neoadjuvanten Therapie oder palliativer Maßnahmen.

1.1.6.1 Chirurgische Resektion

Über viele Jahre lang galt die klassische, in einem Schritt durchgeführte, Pankreatikoduodenektomie, welche erstmalig durch Kausch und Whipple beschrieben wurde, als Goldstandard [19, 20]. Sie beinhaltet sowohl die Entfernung des Pankreaskopfes und einen Teil des Pankreaskörpers als auch des Duodenums, eine partielle Entfernung des Magens, die Entnahme des distalen Gallenganges einschließlich der Gallenblase und des proximalen Jejunums. Zusätzlich kommt es zu einer *enbloc*-Resektion der regionären Lymphknoten.

Wie jedoch in einigen Studien gezeigt werden konnte, erwies sich die pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie -bezüglich der perioperativen Sterblichkeit und des langfristigen Erfolgs- als geeigneter [21-23]. Der Vorteil hierbei liegt darin, dass durch den Erhalt des Magens auch die physiologische gastrointestinale Motorik bestehen bleibt.

In der Literatur werden weitere Operationsmöglichkeiten und Modifikationen zuvor beschriebener Methoden diskutiert, wie zum Beispiel die distale Pankreatektomie,

welche bei Tumoren im Pankreaskörper oder –schwanz herangezogen wird, sowie in seltenen Fällen eine segmentale Resektion, worauf jedoch hier im Speziellen nicht genauer eingegangen wird [24, 25].

1.1.6.2 Neoadjuvante Therapie

Wie bereits erwähnt, wird bei der Mehrzahl an Patienten die Diagnose des PaCa erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt und damit der Tumor als inoperabel erachtet. Das Ziel der neoadjuvanten Therapie basiert darauf, durch eine entsprechende Behandlung -mittels Chemoradiotherapie oder Chemotherapie allein- vor dem operativen Eingriff die Größe des Tumors so zu minimieren, dass eine R0-/R1-Resektion ermöglicht wird.

Es wurde gezeigt, dass bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder *borderline* resezierbarem PaCa nach dem Erhalten einer neoadjuvanten Therapie in 40% der Fälle eine R0/R1-Resektion herangezogen werden konnte [26].

1.1.6.3 Adjuvante Therapie

Bei der adjuvanten Therapie handelt es sich -wie der Name bereits sagt- um eine *unterstützende* Therapiemaßnahme. Sie erfolgt nach vollständiger chirurgischer Resektion, um einem Rezidiv vorzubeugen bzw. eventuell bereits vorhandenen Mikrometastasen entgegen zu wirken.

ESPAC-1 ist die erste international veröffentlichte Studie der *European study group for pancreatic cancer*, welche gezeigt hat, dass die Anwendung von adjuvanter Chemotherapie das Überleben der Patienten nach einer chirurgischen Resektion eines PaCa deutlich verbessert. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass eine postoperative Chemoradiotherapie im Vergleich mit einer Chemotherapie zu keiner Besserung verhalf, sondern sogar eine höhere toxische Wirkung hatte [27].

In den 50er Jahren galt das Pyrimidinanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) als das Mittel der Wahl zur Therapie eines PaCa. Wie durch Pliarchopoulou beschrieben [28], erzielten Kombinationstherapien mit 5-FU verglichen mit unbehandelten Patienten zu einem besseren Überlebenserfolg (33 zu 15 Wochen). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass Kombinationen mit 5-FU gegenüber der alleinigen Gabe von 5-FU keine Vorteile erbrachten.

Seit 1996 findet das Chemotherapeutikum Gemcitabine -durch die Food and Drug Administration (FDA) genehmigt- als Monotherapeutikum Verwendung. In einer

Phase-III-Studie namens CONKO-001 wurde gezeigt, dass die postoperative Gabe von Gemcitabin die 5-Jahres-Überlebensrate von 9% auf 21% verbessert, verglichen mit Patienten, die keiner Behandlung unterzogen wurden [29].

ESPAC-3 ist eine Studie, die verdeutlichte, dass die Gabe von Gemcitabine im Vergleich mit 5-FU-Bolus nach kompletter Resektion zwar keinen deutlichen Unterschied in der medianen Überlebenszeit (23,6 zu 23 Monaten) erbrachte, jedoch wies Gemcitabine die geringere Toxizität als 5-FU auf [29].

Heinemann et al. zeigte in einer Meta-Analyse von über 15 Studien, dass ein signifikanter Überlebenserfolg bei der Anwendung von Kombinationstherapien verglichen mit Gemcitabine als Monotherapeutikum erzielt werden konnte. Hierbei wurden Gemcitabine entweder mit einem Platinumderivat oder einem Fluoropyrimidin kombiniert. Dieser Überlebensvorteil konnte jedoch nur bei Patienten mit einem guten Allgemeinbefinden festgestellt werden [30].

1.1.6.4 Palliative Therapie

Patienten mit lokal fortgeschrittenen oder schon metastasierten PaCa bedürfen, vorausgesetzt ihr Allgemeinzustand lässt es zu, einer palliativen Behandlungsmethode, um die Krankheitssymptome der Patienten zu lindern. Sofern der Tumor als primär inoperabel gilt, es sich um ein Rezidiv handelt oder Metastasen vorhanden sind, besteht die Möglichkeit der Verabreichung einer systemischen Chemotherapie. Dies soll zu einer Verlängerung der Überlebenszeit und zu einer Verbesserung der Symptomatik und damit der Lebensqualität führen.

Studien aus den 1990er Jahren haben ergeben, dass das Nukleosidanalogen Gemcitabine im Vergleich zu 5-FU eine bessere Wirksamkeit aufweist. In einer Phase-III-Studie wurde unter anderem gezeigt, dass die mediane Überlebensdauer durch Gemcitabine (5,65 Monate) im Vergleich zu 5-FU (4,41 Monate) und die 1-Jahres-Überlebensrate durch Gemcitabine mit 18% zu 5-FU mit 2% deutlich gesteigert werden konnte [31].

Als relativ neu und erfolgreich gilt die Kombinations-Chemotherapie FOLFIRINOX, bestehend aus den folgenden vier Komponenten: Leukovorin, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin. In der sog. ACCORD-Studie aus dem Jahre 2010, einer Phase-III-Studie, wurde ein erstaunlicher Erfolg in der medianen Gesamtüberlebenszeit von 11,1 Monaten bei der Verabreichung von FOLFIRINOX verglichen mit 6,8 Monaten in der

Gruppe der Gemcitabine Patienten nachgewiesen. Des Weiteren bestand auch ein deutlich höheres Ansprechen der Patienten auf die FOLFIRINOX-Therapie, als die auf Gemcitabine (31,6% zu 9,4%). Zusammenfassend konnte somit ein besserer Überlebenserfolg mit dieser Therapie erzielt werden. Jedoch wurde auch eine höhere Hämatoxizität festgestellt, sodass FOLFIRINOX nur bei Patienten mit gutem Allgemeinbefinden eingesetzt werden kann [29].

Für eine erfolgreiche Therapie spielt die richtige und frühzeitige Diagnose eine sehr wichtige Rolle. Hierfür sind pathologische Untersuchungen und Kenntnisse über den jeweiligen Tumor von großer Bedeutung und oft ausschlaggebend für die weitere Behandlung.

1.1.7 Pathologie

Mit über 80% ist das PaCa die am häufigsten diagnostizierte Neoplasie gemessen an allen neoplastischen Erkrankungen des Pankreas [12]. Zusätzlich treten mit einer prozentualen Minderheit unter anderem Azinuszell- und Zystadenokarzinome des exokrinen Pankreas auf.

Über die Lokalisation der duktaalen Pankreasadenokarzinome ist bekannt, dass sie bei rund 75% im Pankreaskopf vorzufinden sind. Bei 15-20% befinden sie sich im Körper des Pankreas und bei 5-10% im Schwanz des Pankreas [12].

Rezidive betreffend, treten schätzungsweise 75% lokal im Tumorbett wieder auf oder lokoregional im Abdomen mit gleichzeitigen Fernmetastasen bei 50-80%. Diese Fernmetastasen sind in 38-73% in der Leber, in 34-87% im Retroperitoneum, in 19-53% im Peritoneum und in 8-29% in der Lunge zu beobachten [32].

1.2 Das duktaale Pankreasadenokarzinom beim Tier

Bislang ist das PaCa beim Tier leider nur sehr dürftig erforscht worden. Ein Grund hierfür ist sicherlich die Seltenheit des Auftretens und vor allem des Erkennens der Krankheit, da die unspezifische Symptomatik auch beim Tier auftritt und hier insofern ein größeres Problem als beim Menschen darstellt, als dass Tiere ihre Schmerzen und Symptome für gewöhnlich verbergen bzw. sie uns Menschen nicht direkt mitteilen können. Übliche Symptome sind Lethargie, Anorexie, Erbrechen, abdominale Schmerzen und Gewichtsverlust. Auch zu einem Ikterus kann es in Folge von Cholestase oder Lebermetastasen kommen [33].

Das Auftreten eines Tumors im Pankreas gilt bei Tieren als äußerst ungewöhnlich. Dennoch tritt das PaCa am häufigsten von allen Tumorerkrankungen im Pankreas auf und konnte in einer Studie bei allen sechs Hauptspezies der Haussäugetiere diagnostiziert werden [34]. Am häufigsten wurde von Hunden mit ca. 140 Fällen und Katzen mit ca. 50 Fällen berichtet, seltener waren Rinder oder Pferde betroffen. Einzelfälle gab es beim Schwein und Schaf [34].

Die Inzidenz des PaCa beläuft sich beim Hund auf schätzungsweise 1%, bezogen auf alle Tumorarten und analog zum Menschen nimmt sie auch beim Tier mit dem steigenden Alter zu. Das Durchschnittsalter beim Auftreten bzw. bei der Diagnosestellung liegt beim Hund bei etwa 10 Jahren und bei der Katze bei 12 Jahren [34]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass weibliche Hunde häufiger betroffen sind. Es scheint, dass Katzen hingegen keine Geschlechterspezifität aufweisen [33, 34]. In der *Cancer Research* aus dem Jahre 1974 wurde zusätzlich eine Rassedisposition für den Airdale Terrier und den Boxer beschrieben. Beim Boxer sollte jedoch hinzugefügt werden, dass er allgemein deutlich überrepräsentativ in Sachen Tumorerkrankungen ist [35].

Am häufigsten sind bei Hunden die Tumoren am duodenalen Schenkel des Pankreas vorzufinden, was eine Parallele zum Menschen aufzeigt, da er mit dem Pankreaskopf vergleichbar ist [34].

Im Vergleich zu den Menschen, werden bei den Tieren weniger Mittel zur Diagnosestellung herangezogen. Eine Umfangsvermehrung im Bereich des Pankreas kann eventuell durch abdominale Palpation, Sonographie oder Röntgen festgestellt werden. Zusätzlich sollte nach Möglichkeit mittels Laparoskopie und Biopsie eine histopathologische und zytologische Untersuchung davon durchgeführt und eine Untersuchung auf das Bestehen von Metastasen eingeleitet werden [33, 36].

Auch die Therapiemöglichkeiten sind in der Veterinärmedizin begrenzt. Als erfolgreiche chirurgische Operationsmethode wird in einem Fall eine partielle Pankreatektomie mittels eines bipolaren Gefäßversiegelungsgerätes beschrieben [37]. Als palliative Maßnahmen werden eine Schmerztherapie und die Gabe eines Antiemetikums empfohlen. Zusätzlich sollte eine entsprechende Diät verabreicht werden. Die Überlebenszeit kann durch die Entfernung des Primärtumors verlängert werden, sofern es noch zu keiner Metastasenbildung gekommen ist. Jedoch sollte

hinzugefügt werden, dass das PaCa auch beim Tier mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht und die meisten Hunde und Katzen innerhalb von 3-90 Tagen nach Diagnosestellung versterben [33].

1.3 Immunologie

1.3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem höherer Organismen und ein komplexes Netzwerk aus spezialisierten Antikörpern, Immunzellen und -organen, das uns tagtäglich vor dem Eindringen von Krankheitserregern schützt [38].

Auch bei Krebserkrankungen, wie beispielsweise dem PaCa, spielt das Immunsystem eine äußerst wichtige Rolle. Um dies besser nachvollziehen zu können, ist es wichtig zu verstehen, wie das Immunsystem im gesunden Zustand, in seiner Anti-Tumor-Immunantwort allgemein und im speziellen Fall des PaCa agiert [38].

Prinzipiell wird zwischen zwei grundlegenden Mechanismen der Immunabwehr unterschieden: der angeborenen bzw. unspezifischen Immunantwort und der adaptiven bzw. spezifischen Immunantwort.

1.3.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem dient der ersten Abwehr und ist kontinuierlich in Bereitschaft. Es wird auch als die unspezifische Immunantwort bezeichnet, da es Antigen-unspezifisch agiert. Es kann jedoch zwischen den verschiedenen Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und bestimmte Helminthen) unterscheiden und dient als primäre Verteidigung des Organismus in den ersten Tagen nach einer Infektion oder aber auch bei Tumoren oder Verletzungen des Gewebes. Als Komponenten dieser Immunantwort dienen das Komplementsystem und verschiedene immune Zelltypen, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen (dendritic cells = DC). DC werden jedoch nicht vollständig zu dem angeborenen Immunsystem gezählt, sondern bilden vielmehr eine Art Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Weitere Komponenten stellen Mediatoren wie Zytokine (u.a. Interferone oder Interleukine) und Chemokine dar. Diese können durch aktivierte Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzt werden und zu lokalen und systemischen Entzündungen führen. Mit Erreichen eines bestimmten

Schwellenwertes wird dann das erworbene bzw. adaptive Immunsystem aktiviert und es kommt zu einer Ausbildung des sog. immunologischen Gedächtnisses, das heißt der Organismus zeigt bei einer erneuten Infektion mit demselben Krankheitserreger eine schnellere und stärkere Reaktion [38, 39].

1.3.1.2 Das adaptive Immunsystem

Durch die Ausbildung von ausdifferenzierten Gedächtniszellen mittels klonaler Selektion, kann das adaptive Immunsystem ganz bestimmte Krankheitserreger schneller erkennen und darauf reagieren [38, 39].

Des Weiteren kann das adaptive Immunsystem verschiedenste Antigene identifizieren, weshalb man auch von einer antigenspezifischen Immunantwort spricht. Diese Antigenerkennung erfolgt ebenfalls über eine klonale Selektion von Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), welche viele verschiedene, spezifische Rezeptoren besitzen. Es kommt zu einer Vermehrung dieser Lymphozyten und zur Differenzierung in Effektorzellen, was dem Immunsystem ermöglicht, den Krankheitserreger zu eliminieren [38].

1.3.2 Die Zellen des Immunsystems

Allgemein entwickeln sich alle Zellen des Immunsystems aus gemeinsamen Vorläuferzellen myeloiden Ursprungs, den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diese entwickeln sich dann zu Zellen einer myeloiden und einer lymphatischen Reihe, wobei die meisten Zellen der myeloiden Reihe dem angeborenen Immunsystem zuzusprechen sind, während aus den Zellen der lymphatischen Reihe die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems und die NK-Zellen des angeborenen Immunsystems hervorgehen [38].

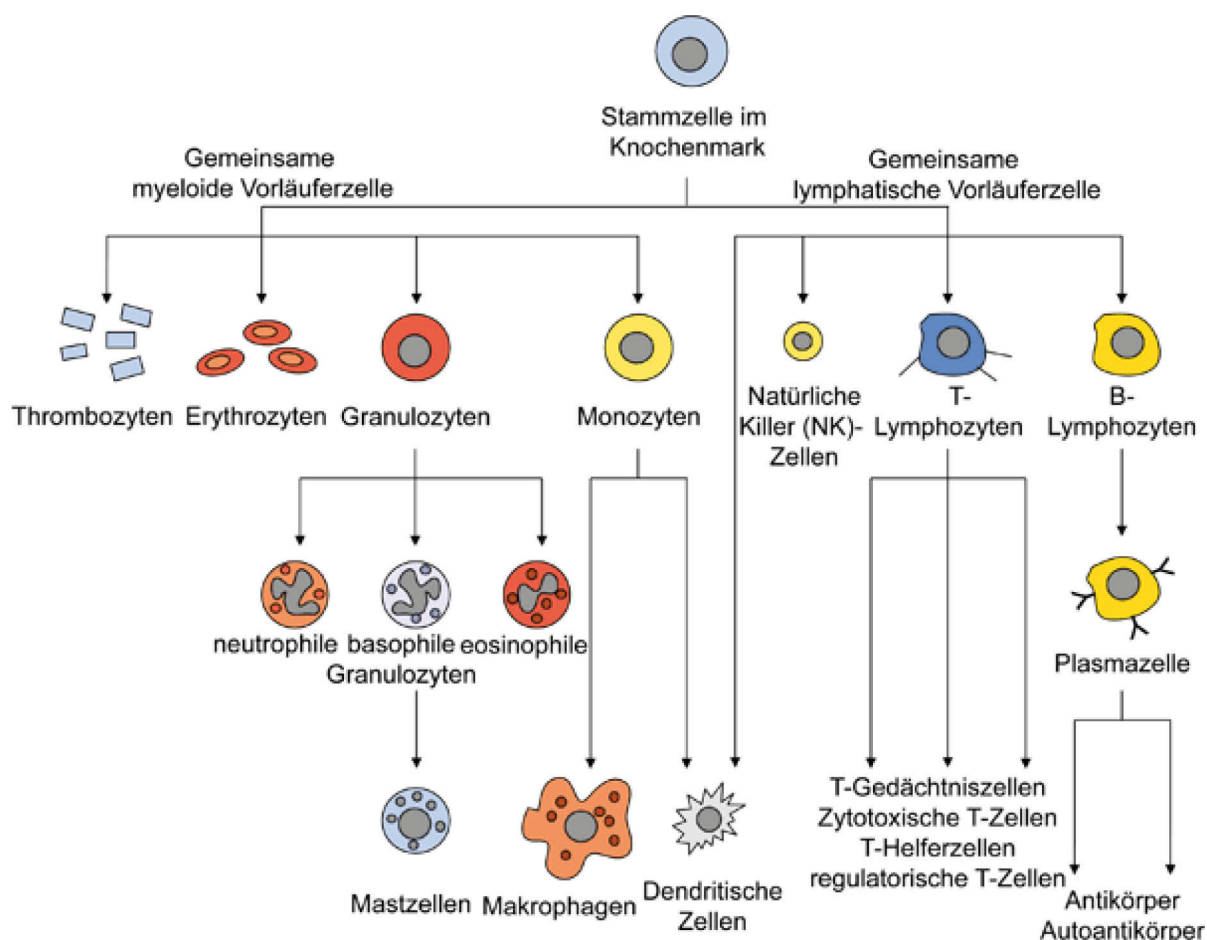


Abbildung 1.3.2-1 Entwicklung von Blut- und Immunzellen [40]

1.3.2.1 Zellen der lymphatischen Reihe

Zu den Zellen der lymphatischen Reihe zählen auf der einen Seite diejenigen Lymphozyten, welche eine antigenspezifische Immunantwort auslösen, also die des adaptiven Immunsystems, und auf der anderen Seite Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, die zwar auf eine Infektion reagieren, jedoch keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen. Bei zuletzt genannten handelt es sich um die NK-Zellen [38, 41].

Man unterscheidet zwei Typen von Lymphozyten: Die B-Lymphozyten (B-Zellen), welche im Knochenmark reifen und den sog. B-Zell-Rezeptor exprimieren und die T-Lymphozyten (T-Zellen), welche im Thymus reifen und den sog. T-Zell-Rezeptor exprimieren. Die Mehrheit dieser Lymphozyten sammelt sich nach ihrer Reifung in den lymphatischen Geweben bzw. Organen an [38].

Über Major Histocompatibility Complex -I/-II- (MHC -I/-II-) Moleküle werden intra- bzw. extrazellulär körperfremde Antigene präsentiert und somit für die T-Zellen sichtbar gemacht. Es werden hauptsächlich drei verschiedene Typen von T-Zellen nach ihrer Funktion unterschieden. Die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen töten infizierte Zellen ab, die $CD4^+$ T-Helferzellen tragen wiederum zu einer Aktivierung anderer Immunzellen, wie unter anderem der B-Zellen bei und als drittes die $CD4^+FoxP3^+CD25^{+/hoch}$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), welche die Aktivität von anderen Zellen unterdrücken und somit die Immunantworten kontrollieren. Zuletzt beschriebene Funktion ist sehr wichtig, um zum Beispiel das Entstehen von Autoimmunerkrankungen, Allergien und überdimensionale Immunantworten im Organismus zu verhindern [38, 42]. Wenn es zu einer Immunantwort gekommen ist, differenzieren sich einige der B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen und es bildet sich das immunologische Gedächtnis aus [38].

NK-Zellen besitzen unveränderliche, unspezifische Rezeptoren, womit sie bestimmte Zellen erkennen können, wie Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen. Ohne vorherige Aktivierung oder Immunisierung können sie diese dann gezielt abtöten [38, 41]. Der Immunologe Klas Kärre beschreibt dies in seiner „missing-self“ Hypothese folgendermaßen: Die NK-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen, wird durch das Fehlen der MHC-Moleküle auf der Oberfläche dieser Zielzellen ausgelöst. Dies deutet darauf hin, dass MHC-Moleküle gewissermaßen eine schützende Wirkung auf normale Zellen, bezogen auf die Lyse der NK-Zellen, ausüben [41].

Abschließend sollten noch die NKT-Zellen erwähnt werden, welche die Eigenschaften von NK-Zellen und T-Zellen vereinen. Sie machen eine kleine heterogene Untergruppe der T-Zellen aus. Der Name dieser Zellen ist darauf zurückzuführen, dass einige von ihnen auf ihrer Zelloberfläche den Marker NK1.1 (in Mäusen) bzw. CD56 (in Menschen) exprimieren, der normalerweise auf NK-Zellen zu finden ist. Trotzdem zählen sie nicht zu den NK-Zellen, sondern werden wie die T-Zellen im Thymus gebildet und tragen einen T-Zell-Rezeptor. Sie unterscheiden sich hauptsächlich darin, dass sie mit ihrem T-Zell-Rezeptor keine MHC-Klasse-I- oder -II-Moleküle binden, verglichen mit den T-Zellen, sondern MHC-Klasse-Ib-Moleküle, auch CD1-Proteine genannt. Diese wiederum binden und präsentieren Lipide, im Gegensatz zu den Peptiden, welche von MHC-Molekülen gebunden und präsentiert

werden [43, 44]. Des Weiteren können NKT-Zellen nach einer Antigenerkennung sehr schnell ein breites Spektrum an Zytokinen produzieren, wie Interferon γ (IFN γ), verschiedene Interleukine (IL), unter anderem IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 und IL-21 und GM-CSF oder auch den *transforming growth factor*- β (TGF β) [43].

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass auch bei den NK- und NKT-Zellen regulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. In einer Studie von Herrn Lu und seinen Kollegen wurden die inhibitorischen Wechselwirkungen zwischen dem MHC-Ib-Molekül Qa-1 auf aktivierten T-Zellen und dem CD94-NKG2A-Rezeptor auf NK-Zellen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass dadurch die aktivierten T-Zellen vor ihrer Eliminierung durch die NK-Zellen geschützt werden. Durch die Verwendung bestimmter Antikörper konnte experimentell eine Unterbrechung dieser Interaktion hervorgerufen werden, wodurch eine NK-Zell-vermittelte Zerstörung der aktivierten autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen bei der sog. experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) beobachtet wurde [45].

1.3.2.2 Zellen der myeloiden Reihe

Die Zellen der myeloiden Reihe umfassen sowohl die Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten, als auch die Monozyten und Makrophagen. Als Sonderform werden die DC gezählt, da sie zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem vermitteln [38].

Monozyten zirkulieren im Blut, wandern ins Gewebe ein und differenzieren sich dann zu Makrophagen. Monozyten und Makrophagen beseitigen in ihrer primären Funktion Mikroorganismen durch Phagozytose. Des Weiteren lösen Makrophagen auch eine erworbene Immunantwort aus, indem sie den T-Zellen Antigene präsentieren und diese somit aktivieren [38].

Die wichtigste Aufgabe der neutrophilen Granulozyten stellt ebenfalls die Phagozytose dar. Man vermutet, dass die eosinophilen Granulozyten zur Abtötung von Parasiten, die von Antikörpern eingehüllt sind, dienen. Die Funktion der basophilen Granulozyten ist weniger bekannt [38].

1.3.2.3 Dendritische Zellen als Brückenglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität

Als treibende Kraft für die Entdeckung der DC im Jahre 1972 durch Ralph Steinman und Zanvil Cohn, galt, das Verständnis über die Immunogenizität zu entwickeln, welches bereits von dem Pionier Michael Sela folgendermaßen beschrieben wurde: „*the capacity of an antigen to provoke an immune response*“, sprich die Fähigkeit zur Auslösung einer Immunantwort durch dieses Antigen, zu verstehen [46, 47].

Bei den myeloiden Vorläuferzellen der DC wird zwischen $CD34^+CLA^+$ Zellen und $CD34^+CLA^-$ Zellen unterschieden. Erstere differenzieren sich wiederum in $CD11c^+CD1a^+$ Zellen, welche auch Langerhans-Zellen genannt werden und die $CD34^+CLA^-$ Zellen differenzieren sich zu $CD11c^+CD1a^-$ Zellen, welche als interstitielle DC bezeichnet werden [48].

Es werden zwei Haupt-Subpopulationen von DC aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie, ihrer Marker und ihrer Funktion beschrieben, die konventionellen DC (conventional DC = cDC) und die plasmazytären DC (plasmacytoid DC = pDC). Die cDC werden am häufigsten darüber definiert, dass sie $CD11c^+CD11b^+$ sind. Zusätzlich gelten sie als $MHC-II^+ CD205^+ Gr1^- CD115^{low}$. Die pDC werden dagegen hauptsächlich davon abgegrenzt, dass sie $CD11c^{int}CD11b^-CD45R^+$ ($B220^+$) sind. Auch hier werden noch weitere Definitionen beschrieben, unter anderem ihre Siglec $H^+ Gr1^+$ Eigenschaften. Die Expression der Marker 33D oder DEC 205/CD205 ist zwar spezifisch für DC, jedoch sind sie nicht auf allen Zellen vorzufinden [49].

DC sind vielerorts in peripheren Geweben anzufinden (v.a. Haut und Schleimhaut) und besitzen die Fähigkeit in jegliches Gewebe des Körpers einzuwandern. Die unreifen DC phagozytieren die Bestandteile von untergegangenen Zellen und wandern als antigenpräsentierende Zellen (APC) in die regionalen Lymphknoten ein. Dort werden sie entweder durch Apoptose zerstört oder inaktiviert. Da die unreifen DC auch durch Aktivierung der T_{reg} mit diesen interagieren können, sind sie somit an der Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz beteiligt [50]. Kommt es nun zu einer Infektion, können die unreifen DC mit Hilfe ihrer sog. *Toll like receptors* (TLR) die mikrobiellen Antigene erkennen, wodurch ein Reifungsprozess in Gang gesetzt wird. Sie verlieren damit ihre Endozytoseaktivität und es kommt zu einer vermehrten Expression in der Regel von MHC-II-Molekülen (Signal 1). Zusätzlich findet eine gesteigerte Expression kostimulatorischer und adhäsiver Moleküle (Signal 2), unter

anderem von CD80 (B7.1)/CD86 (B7.2) auf Seiten der DC, statt. Darüber hinaus wird die Produktion von Zytokinen, wie IFN oder IL, induziert (Signal 3), welche die Reifung der DC beschleunigen [50].

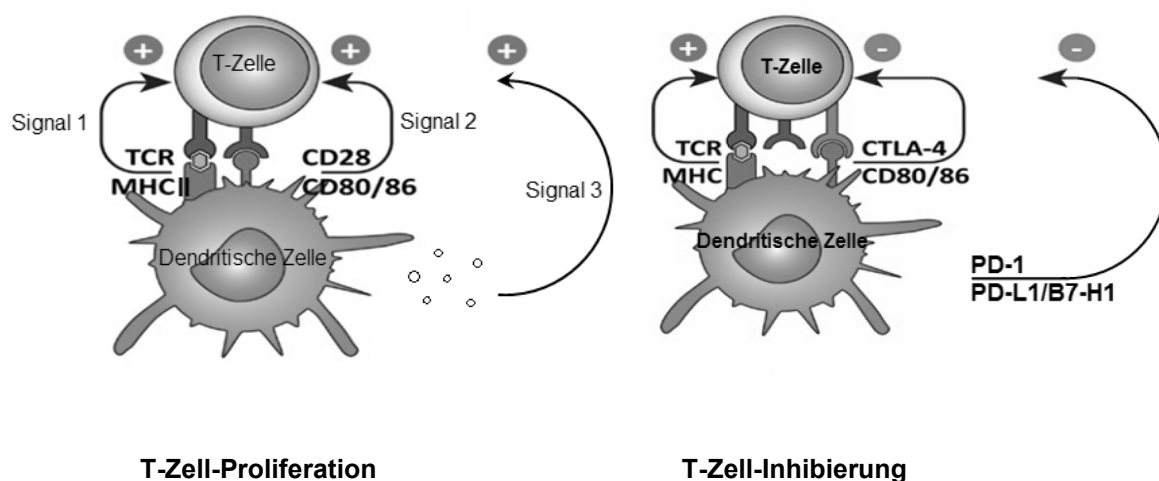


Abbildung 1.3.2-2 Schematische Darstellung der Signalkaskade der DC im Zusammenspiel mit den T-Zellen; modifizierte Abbildung aus: [51]

Signal 1: MHC-AG-Komplex. Signal 2: Kostimulatorische Moleküle. Signal 3: Zytokine.

Die beschriebene Signalkaskade im Zusammenspiel mit den T-Zellen läuft wie folgt ab: Die reifen DC wandern in die sekundären lymphatischen Organe ein und präsentieren auf den MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche den naiven T-Zellen die Antigene und gehen mit dem *T-cell antigen receptor* (TCR) der T-Zelle eine Bindung ein [52]. Diesem Signal folgend gehen die kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie (CD80/CD86) eine Bindung mit CD28 der T-Zellen ein, womit es zu einer Aktivierung und gesteigerten Proliferation der T-Zellen kommt. Durch diese Aktivierung nimmt wiederum die Expression von CD28 zu [53].

Während CD28 konstitutiv exprimiert wird, kommt es im Zuge der T-Zell-Aktivierung nun zu einer induzierten, verstärkten Expression von *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4). CTLA-4 weist eine höhere Affinität zu CD80/CD86 auf und die T-Zell-Aktivierung wird vermindert. Somit wird CTLA-4 als Gegenspieler der CD28-vermittelten Co-Stimulation gesehen und ist für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz verantwortlich [53].

Weitere wichtige regulatorische Moleküle sind die Liganden PD-L1/PD-L2, welche auch auf den DC exprimiert werden können. Binden sie an den Rezeptor PD-1

(programmed cell death protein 1) auf den T-Zellen, können sie dadurch einen supprimierenden Effekt ausüben [54].

Der zuvor beschriebene Vorgang der Reifung der DC kann durch die Anwesenheit der immunsuppressiven Mediatoren, wie IL-10 oder TGF β wieder umgewandelt werden, indem unter anderem die Expression von MHC-II-Molekülen gehemmt wird. Kommt es beispielsweise zu einem starken Anstieg von IL-10, so können sog. tolerogene bzw. regulatorische DC entstehen [55].

1.3.3 Tumormmunologie

Tumorzellen können zwar vom Immunsystem wahrgenommen werden, besitzen aber auch viele Mechanismen um sich unkenntlich zu machen und diesem somit zu entkommen.

1.3.3.1 Anti-Tumor-Immunantwort

Einige Tumorerkrankungen sind in der Lage durch verschiedene Mechanismen dem Immunsystem zu entkommen. Das Immunsystem wiederum besitzt die Fähigkeit durch eine Reihe von verschiedenen Immunzellen und Mechanismen Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Werden jedoch nicht alle Tumorzellen vollständig zerstört, kann es zu Mutationen kommen und folglich entstehen verschiedene Varianten von Tumorzellen, welche dem Immunsystem noch besser entgehen können. Dieser Vorgang wird auch als *Immun-Editing* bezeichnet. Einige Tumorarten, das PaCa im Besonderen, verursachen nicht nur eine Aktivierung des Immunsystems, sondern schaffen in kurzer Zeit auch eine starke immunsuppressive Umgebung.

1.3.3.2 Immunsuppressive Umgebung

Bei den immunsuppressiven Mechanismen handelt es sich auf zellulärer Ebene unter anderem um die T_{reg} und die Myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Auf molekularer Ebene sind vor allem der PD-1 Rezeptor und sein Ligand B7-H1 (oder auch PD-L1) von großer Bedeutung.

T_{reg}:

Bereits im Jahre 1995 wurde durch Sakaguchi gezeigt, dass eine kleine Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen das CD25-Molekül (Interleukin-2 Rezeptor α Kette (IL-2R α)) exprimieren und dies als phänotypischer Marker für die Identifizierung von T_{reg} genutzt werden konnte. Die Mehrheit von CD4⁺CD25^{+/hoch} Zellen reifen im Thymus

(natural $T_{reg} = nT_{reg}$) und stellen annähernd 10% aller peripher vorkommenden $CD4^+$ T-Zellen in immunologisch naiven, erwachsenen Mäusen und Menschen dar [56]. Mit der Identifizierung des *forkhead family transcription factor* (FoxP3) wurde jedoch heutzutage eine präzisere Klassifizierung der nT_{reg} möglich [57-59]. Zusammenfassend kann man sagen, dass nT_{reg} darüber definiert werden, dass sie $CD4^+CD25^{+/hoch}$ und $FoxP3^+$ sind. Eine weitere Charakterisierung der nT_{reg} ist dadurch möglich, dass sie unter anderem $CD127^-$, $PD-1^{+/hoch}$ und $CTLA-4^{+/hoch}$ sind. Zusätzlich exprimieren sie auch den Ligand von PD-1, das B7-H1 Molekül [42, 60, 61]. Außerdem weisen sie ein ausgedehntes Repertoire an T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf, womit sie ein großes Spektrum an körpereigenen und -fremden Antigenen erkennen können [62, 63].

Die nT_{reg} spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz gegenüber Autoantigenen und der Verhinderung potentieller Autoimmunerkrankungen. Verschiedene Mechanismen wurden in der Vergangenheit diskutiert, welche die suppressive Funktion der nT_{reg} erklären sollen und eine Vielzahl an *in vitro* Studien hat verdeutlicht, dass die Suppression von einem direkten Zell-Zell-Kontakt und/oder von Zytokinen (IL-10, TGF β) abhängig ist [64]. Zytokine wie zum Beispiel *Interleukin-2* (IL-2) und TGF β , kontrollieren nicht nur die immunsuppressive Aktivität, sondern auch die Aktivierung und Ausbreitung der T_{reg} [65].

Neben den nT_{reg} Zellen sind die *induzierten* oder *adaptiven* T_{reg} (induced $T_{reg} = iT_{reg}$), auch bezeichnet als Typ 1 regulatorische T-Zellen, von zentraler Bedeutung. Die iT_{reg} weisen zwei unterschiedliche Entstehungsweisen auf. Sie können entweder aus naiven, nicht regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen entstehen oder aber aus bereits aktivierten T-Effektorzellen hervorgehen. Beide iT_{reg} Zelltypen erlangen ihre Funktionalität erst außerhalb des Thymus und entstehen überwiegend anlässlich eines Entzündungsgeschehen oder einer Krebserkrankung. Mit der dadurch hervorgerufenen Expression von CD25 und unter dem Einfluss von IL-10 und/oder TGF β unterdrücken sie ebenfalls die Effektor-T-Zell-Antwort und weisen damit eine stärkere immunsuppressive Wirkung auf [65-68]. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass iT_{reg} in einer gesteigerten Anzahl bei Krebserkrankungen, wie dem Melanom oder dem renale Zellkarzinom, gefunden wurden [68-70].

Diese Akkumulation der T_{reg} kommt durch verschiedene Mechanismen zustande: Die antigen-präsentierenden DC sind teilweise für diese Expansion und Akkumulation der T_{reg} , über ihr zuvor beschriebenes Zusammenspiel mit den T-Zellen, verantwortlich [71]. Des Weiteren kann es zur Migration der T_{reg} aus den lymphoiden Organen kommen. Auch eine Proliferation von bereits vorhandenen T_{reg} auf Seiten des Tumors ist möglich [68]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch MDSC in der Lage sind T_{reg} zu induzieren [72].

Es wurde festgestellt, dass T_{reg} in Krebspatienten deutlich häufiger anzufinden sind als bei gesunden Patienten – sowohl in der Peripherie zirkulierende T_{reg} , als auch tumorgewebsspezifische T_{reg} . Die Akkumulation dieser Zellen in der direkten Umgebung des Tumors geht mit einer schlechteren Prognose, bezogen auf das Tumorstadium und das Überleben der Patienten, einher [73]. Des Weiteren zeigen T_{reg} eine gewisse Toleranz gegenüber Tumor-assoziierten Antigenen und üben einen suppressiven Effekt auf die Anti-Tumor-Immunantwort, insbesondere der T-Zellen, aus. Im Umkehrschluss führte eine Reduzierung der T_{reg} im PaCa-Mausmodell zu einer stagnierenden Tumorstadium und die tumorspezifische Immunantwort konnte folglich wieder gesteigert werden [74]. Dies konnte beispielsweise durch zwei weitere *in vivo* Studien am orthotopen Mausmodell mit PaCa bestätigt werden, worin eine Depletion mittels Antikörpergabe bzw. Vakzination erreicht wurde [75-78].

Allerdings besitzen nicht nur T_{reg} auf zellulärer Ebene suppressive Eigenschaften, sondern es konnten beispielsweise auch bei den MDSC diese Funktionen nachgewiesen werden.

MDSC:

Die MDSC umfassen eine heterogene Gruppe von Zellen myeloiden Ursprungs. Dazu zählen Vorläuferzellen, wie unreife Makrophagen, unreife Granulozyten und unreife DC, die sich im gesunden Organismus zu reifen, spezialisierten Zellen differenzieren. Im kranken Zustand jedoch (unter anderem bei Krebs, infektiöses oder autoimmunologisches Geschehen, Sepsis, Trauma etc.) differenzieren sich die myeloiden Vorläuferzellen nicht, sondern werden zu einem aktivierten unreifen myeloiden Zellpool, den MDSC. Ihre Funktionalität ist durch die steigende Produktion von Arginase-1, iNOS (nitric oxide synthase) und ROS (reactive oxygen species) charakterisiert. Dadurch kommt es folglich zu einem gesteigerten L-Arginin-

Stoffwechsel, das heißt die Aminosäure wird aus der Umgebung verbraucht und steht nicht mehr den proliferierenden T-Zellen zur Verfügung. Auf diese Art und Weise können MDSC zu einer Suppression der T-Zell-Antwort führen [79].

Der Phänotyp in Mäusen ist mit $CD11b^+Gr1^+$ zu dem des Menschen mit $CD11b^+CD33^+HLA-DR^{-/low}$ ähnlich, jedoch exprimieren die humanen Zellen keinen Marker, der vergleichbar mit $Gr1^+$ der Maus wäre. $Gr1^+$ besitzt die Fähigkeit an zwei Epitopen spezifische Antikörper zu binden, nämlich Ly6G und Ly6C. Daraus ergeben sich bei der Maus zwei unterschiedliche Subpopulationen der MDSC, die granulozytischen -oder auch Ly6C-„minder positiven“- MDSC ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$) und die monozytischen -oder auch Ly6C-„hoch positiven“- MDSC ($CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hoch}$). Die humanen MDSC ($CD11b^+CD14^{-/low}CD33^+$ oder $HLA-DR^{-/low}LIN^-CD33^+$) lassen sich ebenfalls in zwei weitere Subpopulationen unterteilen. Die granulozytischen ($CD14^-CD15^+$) und die monozytischen ($CD14^{low}CD15^-$) MDSC [79].

Bei anderen Spezies ist bis heute relativ wenig über MDSC und ihren Phänotyp bekannt. Nur beim Hund konnte in einer Studie aus dem Jahre 2012 gezeigt werden, dass spezifische Antikörper ($CD11b^{low}CADO48A^{low}$) für die Identifizierung von zirkulierenden, myeloiden Zellen in ihrem peripheren Blut sich zu Nutzen gemacht werden können. Die Expression eines hunde-spezifischen Markers, welcher äquivalent zu dem murinen Marker für $Gr-1^+$ ist, konnte genauso wenig wie beim Menschen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in der Studie aufgeführt, dass es zu einem Anstieg dieser Zellen im peripheren Blut bei tumortragenden Hunden gekommen ist und die Proliferation der Lymphozyten supprimiert wurde [80].

Die Aktivierung und Ausbreitung der MDSC kann durch verschiedene Vorgänge erfolgen. Auf der einen Seite können Tumorzellen die Aktivierung von MDSC beschleunigen. Sie stimulieren die Myelopoese derart, dass sich die Vorläuferzellen zu keinen reifen Zellen differenzieren können, sondern mehr MDSC gebildet werden. Für diesen Vorgang sind unter anderem Zytokine, wie beispielsweise Prostaglandine, der *stem-cell factor* (SCF) und der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) verantwortlich. Auf der anderen Seite gibt es Zytokine, welche von aktivierten T-Zellen und Zellen des Tumorstromas ausgehend gebildet werden und die Aktivierung der MDSC positiv beeinflussen. Beispiele hierfür sind $IFN\gamma$, IL-4 und IL-6, sowie $TGF\beta$ [79].

Es konnte bereits dargelegt werden, dass sich MDSC in einigen Tumoren anhäufen [49]. In einer Studie über das maligne Melanom aus dem Jahre 2011 wurde gezeigt, dass sich funktionell aktive MDSC sowohl in der Mikroumgebung des Tumors, als auch in den lymphatischen Organen ansammelten und zu einer drastischen Reduzierung in der Expression der TCR ζ -Kette der T-Zellen führte, welche als Aktivierungsmolekül auf T-Zellen gilt [81]. In einer Studie aus dem Jahre 2009 wurde ein Anstieg von MDSC in Mäusen mit spontanem PaCa in der frühen Tumorentwicklung beobachtet, welcher sich mit fortschreitendem Tumorwachstum auch weiterhin fortsetzte [82].

Durch die Erkenntnisse, dass sowohl MDSC als auch T_{reg} in erhöhten Zahlen bei verschiedenen Krebserkrankungen vorzufinden sind, wird darüber diskutiert, ob sich T_{reg} und MDSC gegenseitig beeinflussen können. In einer Studie aus dem Jahre 2011 wurde bereits festgestellt, dass eine Reduzierung von T_{reg} gleichermaßen auch einen starken Rückgang von B7-H1 Molekülen auf MDSC bewirkte und damit wiederum zu einer stagnierenden Tumorgroße führte. Dies lässt eine starke, vereinheitlichte immunsuppressive Wirkung von T_{reg} und MDSC vermuten [83].

B7-H1/PD-1:

Auf molekularer Ebene der suppressiven Mechanismen soll hier im Speziellen näher auf den Rezeptor PD-1 und seinen Liganden PD-L1 eingegangen werden. PD-1 wird als Transmembranrezeptor zusammen mit ICOS (Inducible T-cell CoStimulator) und BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator, CD272) zu der Familie der CD28 Moleküle gezählt, welche auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen exprimiert werden und eine bedeutende Rolle bezüglich ihrer Regulation spielen. PD-L1 (auch B7-H1 oder CD274 genannt), ist ein Oberflächenglykoprotein der B7 Familie und ein wichtiger Ligand von PD-1. Zu den wichtigsten Mitgliedern der B7 Familie zählen außerdem PD-L2 (B7-DC), der ICOS-Ligand oder auch B7-H2 genannt, die B7-H3 und B7-H4 Moleküle. Der PD-1:PD-L1/PD-L2 Reaktionsweg spielt besonders im Hinblick auf die T-Zell-Aktivierung eine bedeutende Rolle, weshalb im folgenden Abschnitt der Fokus hierauf gelegt wird [84].

Es wird eine duale, regulatorische Rolle des PD-1:PD-L1-Reaktionsweges diskutiert. Wie aus verschiedenen Untersuchungen deutlich wird, konnten ihm sowohl aktivierende, als auch supprimierende Eigenschaften zugesprochen werden. In einer Studie aus dem Jahre 1996 wurde gezeigt, dass PD-1 eine stimulierende Wirkung

auf die T-Zell-Aktivierung haben kann [85]. Andererseits wurde in verschiedenen Studien verdeutlicht, dass Mäuse mit unzulänglichem PD-1-Rezeptor (PD-1^{-/-}) systemische und organspezifische Autoimmunerkrankungen entwickeln [86, 87], was darauf hindeutet, dass das Vorhandensein von PD-1 hinsichtlich der Immunantwort eine inhibierende Stellung und damit eine negative Regulation einnimmt. In einer weiteren Studie wurde dies bestärkt, indem gezeigt werden konnte, dass das Zusammenspiel von PD-1:PD-L1 sowohl auf CD4⁺ T-Zellen als auch auf die CD8⁺ T-Zellen eine hemmende Wirkung mittels dem Unterbinden ihrer Proliferation hat [88]. Diese Interaktion von PD-1 und seinem Liganden PD-L1 gilt auch als sog. „*immunological checkpoint*“, wobei es sich hier im Speziellen um ein negatives Kontrollsignal handelt, welches das Auslösen der T-Zell-Aktivierung hemmt.

Betrachtet man B7-H1 nun im Zusammenhang mit diversen Krebserkrankungen, wie zum Beispiel humane Karzinome (Lungen-, Brust-, Ovarialkarzinom) oder Melanome, wurde verdeutlicht, dass durch eine gesteigerte Produktion von B7-H1 auf Seiten des Tumors, dieser sich der T-Zell-Erkennung und damit der Anti-Tumor-Immunantwort entziehen kann [89]. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass eine gesteigerte Expression von B7-H1 auf Seiten des PaCa, mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors und einer schlechteren Prognose der Patienten einhergeht [90, 91].

Auch in experimentellen Tumormodellen mit bestimmten Tumorzelllinien aus Mäusen (Mastozytom, Melanom, Myelom/Plasmozytom) konnte bereits gezeigt werden, dass die Tumorzellen, welche B7-H1 exprimieren, gut wachsen, ohne vom Immunsystem daran gehindert zu werden. In B7-H1-defizienten (B7-H1^{-/-}) Mäusen dagegen kam es zu einem Wachstumsstillstand bzw. zu einer Suppression dieser Tumorzellen [92].

Eine erfolgreiche Blockade von B7-H1 in Mäusen, und damit eine Blockade des immunologischen Kontrollpunktes, bezogen auf ein schlechteres Wachstum des PaCa, konnte erstmals durch Okudaira und Bazhin gezeigt werden [93, 94]. Auch war eine verlängerte Überlebensrate der Mäuse zu beobachten [94].

Da das B7-H1 Molekül nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf Immunzellen, wie den DC -aber auch auf immunsuppressiven Zellen, wie den T_{reg} und den MDSC-vorkommt, ergibt sich eine interessante, neue Fragestellung, inwiefern B7-H1 diese Zellpopulationen beeinflussen und eine reduzierte Immunantwort hervorrufen kann. Die gesteigerte Expression der B7-H1 Moleküle sowohl auf den Tumorzellen, als auch auf den Immunzellen, lassen die Vermutung zu, dass sie bezüglich der

Immunantwort im Tumorgeschehen auch einen Einfluss auf andere immunsuppressive Zellen nehmen können.

1.4 Ziel dieser Arbeit

In dieser Dissertation lag der Schwerpunkt auf *ex vivo* Untersuchungen der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), der immunsuppressiven Zellen myeloider Abstammung (MDSC), sowie auf den dendritischen Zellen (DC) und welchen Einfluss das B7-H1 Molekül auf diese Immunzellen ausübt. Dabei sollte die B7-H1-Ausschaltung auf der jeweiligen Oberfläche zuvor genannter Zellpopulationen und das dadurch hervorgerufene suppressive bzw. proliferative Verhalten der einzelnen Zellpopulationen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, sowohl im gesunden Zustand, als auch in der Tumorimmunantwort des PaCa analysiert werden. Zusätzlich sollte *in vivo* die Expression des Rezeptors PD-1 auf verschiedenen Immunzellen untersucht werden und inwiefern diese durch die Präsenz des B7-H1 Moleküls beeinflusst wird.

2 Material- und Methodenteil

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Gerätename	Hersteller
Sterilbank	Sterile bench Herasafe	Heraeus
Kühlschrank 4°C		Liebherr
Gefrierschrank	Gefrierschrank -20°C -80°C	Liebherr Thermo Scientific
Mikroskop	Optical microscope Axiostar plus Optical microscope Axiovert 25	Zeiss Zeiss
Hämozytometer	Neubauer Zählkammer	neoLab Laborbedarf GmbH
Deckgläschen	20x26x0,4mm	Laborservice Albert Brenzinger
Zellzähler	Mechanischer Zellzähler	VWR International GmbH
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf
Tischzentrifuge	Kinetic energy 26 jouels	LabNet Laborsysteme GmbH
Inkubator	Incubator Heracell	Heraeus
Magnethalterung	MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec GmbH
Magnet	Quadro MACS	Miltenyi Biotec GmbH
Durchflusszytometer	Flow cytometer FACS BD Canto II	Becton Dickinson (BD)
Warmwasserbad	Shaker Bath SBS30	Stuart Scientific

Pipetten (versch. Volumina)	Pipetman	Gilson
Pipette (0,5-10µl)	Pipette Research	Eppendorf
Pipetus	Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte
Multipipette	Multipipette®plus	Eppendorf
Vortex	Bio Vortex V1	Lab4you
Vortex	VortexGenie 2	Scientific Industries
Wage	EW600-2M	KERN & Sohn GmbH
Schüttler	Titer Plate Shaker	Thermo Scientific
Wecker	Digital timer	neoLab 2-2002
Tintendispensierer	Dispensette®	Brand
Autoklav	2540 EL	Tuttnauer Systec GmbH Labor
Messgerät für Luminex	Bio-Plex 200 System	Luminex MAP Technology von Bio-Rad Laboratories GmbH zur Verfügung gestellt
Messgerät für Luminex	Bio-Plex HTF	Luminex MAP Technology
Luminex Waschstation		Millipore

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verwendetes Material	Bezeichnung	Hersteller
Falcon 15ml, 50ml	Cellstar Tubes	Greiner bio-one
FACS-Röhrchen	5ml Polystyrene Round-Bottom-Tubes	BD
Mikroreaktionsgefäß (1,5ml; 2,0ml)	Safe-Lock Tubes	Eppendorf

Mikroreaktionsgef. 0,5ml	SafeSeal micro tube 0,5ml	Sarstedt
Kryogefäß	Nalegene Cryoware	Thermo Fisher Scientific
Zellschaber	Cell Scraper 25cm	Sarstedt
Zellsieb	Cell Strainer 100µl Nylon Cell Strainer 40µl Nylon	BD
Einmal-Filterhalter	Millex Sterilfilter 33mm Diameter	Millipore
Spritzen (5ml, 10ml)	Syringe Luer-Lok	BD
Spritzen (20ml, 50ml)	Syringe Plastipak	
Spritze 1ml	Injekt-F 1ml	Braun
Nadeln (versch. Größen)	Microlance 3 23Gx1 (0,6mmx25mm) 26Gx1/2 (0,45mmx13mm) 30Gx1/2 (0,3mmx13mm)	BD
Dispensierspritzen	Combitips advanced 5ml und 2,5ml Combitips PLUS 0,5ml	Eppendorf
Pipetten (5, 10, 25ml)	costar Stripette	Corning Incorporated
Pipettenspitzen	Pipette Tip Gilson Style 1000µl und 200µl	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Barrier Tips 10µl	Avant Guard
Gewebekulturschalen/ Petrischalen	35x10mm, mit Nocken 94x16mm, mit Nocken	Greiner bio-one
96-well-Platte	Tissue Culture Plate (Flat-Bottom) (U-Bottom)	BD

Zellkulturflasche mit Schräghals	Tissue Culture Flask (steril)	BD
MACS-Säulen	MACS Separation Columns (25 LS/25 MS Columns)	Miltenyi Biotec GmbH
Tinte	Trypanblau 0,5%	Biochrom AG
Aluminiumfolie	AluFolie	Carl Roth GmbH
Wägeschalen (Gr.1 und 2)		neoLab
Handschuhe	LATEX Disposable gloves S 6-7	VWR

2.1.3 OP-Materialien

Tabelle 3: OP-Materialien

Verwendetes Material	Bezeichnung	Hersteller
OP-Haube	Sentinex Easy	Lohmann & Rauscher
Mundschutzmaske	OP-Maske, Typ II R	DACH Schutzbekleidung GmbH & Co.KG
OP-Kittel		Jungmichel Textil GmbH
Moltex		Kolibri
Sterile Handschuhe	Gammex PF IsDerm	Ansell
Hamilton-Spritze	GASTIGHT Syringe 25µl	Hamilton Company
Watteträger mit Kopf	Meditip	Servoprax GmbH
Nahtmaterial	Polysorb USP 5-0	Covidien AG
Messschieber		Mauser INOX
Klammerapparat	Reflex 7 Clip Applier	CellPoint Scientific
Klammern	Reflex 7 (7mm)	CellPoint Scientific
Klammerentferner	Reflex Clip Remover	CellPoint Scientific
Chirurgische Pinzette		A. Dumont & Fils, Schweiz

Anatomische Pinzette	5 Inox	A. Dumont & Fils, Schweiz
Knüpfpinzette		Fine Sciene Tools
Gebogene Schere		Fine Sciene Tools
Gerade Schere		Fine Sciene Tools
Nadelhalter nach Mayo-Hegar		Fine Sciene Tools
Ringpinzette		Fine Sciene Tools
Schermaschine	Isis GT420	Aesulap
Wärmeplatte	Hot Plate 062 mit Hot Plate Controller	Labotect
Narkosegerät	VIP 3000 Isoflurane	Matrx by Midmark

2.1.4 Pharmaka

Tabelle 4: Pharmaka

Pharmakologisches Produkt	Hersteller
Isofluran Baxter (Isofluran)	Baxter GmbH
Rimadyl ad us. vet., Injection solution (Caprofen)	Pfizer GmbH
Bepanthen Augen- & Nasensalbe	Bayer
NaCl (Isotone Kochsalzlösung 0,9%)	Braun
70%iges Ethanol	Zentralbereich Neuenheimer Feld
Desinfektionsspray antisept N liquid	Schülke & Mayr GmbH
Mycoplasma-Ex Spray	PromoKine
Aqua ad injectabilia	Braun
Trypsin-EDTA	Sigma
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
Humanes Insulin (Insuman Rapid)	Aventis Pharma AG

2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 5: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Endvolumen in µl *	Hersteller
CD4	V450	RM4-5	Rat (DA) IgG _{2a} , κ	1	BD Horizon
Ly-6C	V450	AL-21	Rat IgM, κ	0,1	BD Pharmingen
CD45R	V450	RA3-6B2	Rat IgG _{2a} , κ	1	BD Pharmingen
CD45	V500	30-F11	Rat (LOU/Ws1/M) IgG _{2b} , κ	2	BD Horizon
CD69	FITC	H1.2F3	Armenian Hamster IgG ₁ , λ3	2	BD Pharmingen
NK-1.1	FITC	PK136	Mouse (C3HxBALB/c) IgG _{2a} , κ	1,5	BD Pharmingen
FoxP3	FITC	FJK-16s	Rat IgG _{2a} , κ	2	eBioscience
CD44	FITC	IM7	Rat IgG _{2b} , κ	0,5	BD Pharmingen
CD80	FITC	16-10A1	Armenian Hamster IgG ₂ , κ	1	BD Pharmingen
CD279 (PD-1)	PE	J43	Armenian Hamster IgG ₂ , κ	2,5	BD Pharmingen
CD69	PE	H1.2F3	Armenian Hamster IgG ₁ , λ3	3	BD Pharmingen

Ly-6G	PE	1A8	Rat (LEW) IgG _{2a} , κ	0,3	BD Pharmingen
CD45 RB	PE	16A	Rat IgG _{2a} , κ	1	BD Pharmingen
I-A[b]	PE	AF6-120.1	Mouse (BALB/c) IgG _{2a} , κ	0,5	BD Pharmingen
CD11b	PerCP- Cy 5.5	M1/70	Rat (DA) IgG _{2b} , κ	3	BD Pharmingen
CD8a	PerCP- Cy 5.5	53-6.7	Rat (LOU) IgG _{2a} , κ	1	BD Pharmingen
FoxP3	PerCP- Cy 5.5	FJK-16s	Rat IgG _{2a} , κ	3	eBioscience
CD25	APC	3C7	Rat (LEW) IgG _{2b} , κ	6	BD Pharmingen
NK-1.1	APC	PK136	Mouse (C3HxBALB/c) IgG _{2a} , κ	3	BD Pharmingen
CD69	APC	H1.2F3	Armenian Hamster IgG ₁ , λ3	3	BD Pharmingen
CD11c	APC	HL3	Armenian Hamster IgG ₁ , λ2	1	BD Pharmingen
CD62L	APC	MEL-14	Rat (F344) IgG _{2a} , κ	1	BD Pharmingen
Ly-6G und Ly- 6C (Gr-1)	APC-Cy7	RBG-8C5	Rat IgG _{2b} , κ	0,25	BD Pharmingen

CD3e	APC-Cy7	145-2C11	Armenian Hamster IgG ₁ , κ	1,5	BD Pharmingen
CD86	PE-Cy-7	GL1	Rat (LOU) IgG2a, κ	1	BD Pharmingen
CFSE	entfällt	entfällt	entfällt	0,5μM	eBioscience
CD274 (B7-H1) Functional Grade Purified	entfällt	MIH5	Rat IgG2a, λ	10μl/ml	eBioscience
CD28 Functional Grade Purified	entfällt	37.51	Golden Syrian Hamster IgG	2μl/ml Medium	eBioscience
CD3 Functional Grade Purified	entfällt	17A2	Rat IgG _{2b} , κ	1μl/ml Medium	eBioscience
CD16/CD32 Blocking Reagent	entfällt	93	Rat IgG _{2a} , λ	2	eBioscience

* Volumen pro 2×10^6 Zellen/50μl

2.1.6 Beads für die Kompensation

Tabelle 6: Beads für die Kompensation

Bezeichnung	Komponenten	Klon	Isotyp	Endvolumen	Hersteller
Anti-Rat and Anti-Hamster Ig κ/ Negative Control Compensation Particles Set	51-90- 9000949 (Anti- rat/hamster Ig κ)/ 51-90- 9001291 (Negative Control (FBS))	-	-	1 Tropfen \triangleq 60μl	BD CompBeads

Anti-Rat Ig, κ/ Negative Control (FBS) Compensation Particles Set	51-90- 9001189 (BD CompBeads Anti-rat Ig κ)/ 51-90- 9001291 (Negative Control (FBS))	G16- 510E3	Mouse IgG1	1 Tropfen ≙ 60µl	BD CompBeads
---	---	---------------	---------------	---------------------	-----------------

2.1.7 Beads für die magnetische Zellseparation (MACS)

Tabelle 7: Beads für die magnetische Zellseparation (MACS)

Bezeichnung	Kapazität	Komponenten	Hersteller
Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit (<i>mouse</i>)	Für 2×10^9 Zellen	<ul style="list-style-type: none"> - 2ml Anti-Ly-6G-Biotin - 2ml Anti-Gr-1-Biotin - 2x2ml Anti-Biotin MicroBeads - 2ml Streptavidin MicroBeads - 1ml FcR Blocking Reagent 	Miltenyi Biotec
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T cell Isolation Kit (<i>mouse</i>)	Für 10^9 Leukozyten	<ul style="list-style-type: none"> - 1ml CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cell Biotin-Antibody Cocktail - 2ml Anti-Biotin MicroBeads - 1ml CD25-PE - 1ml Anti-PE MicroBeads 	Miltenyi Biotec
CD11c MicroBeads (<i>mouse</i>)	Für 2×10^9 Zellen	<ul style="list-style-type: none"> - 2ml CD11c MicroBeads 	

2.1.8 Lösungen, Medien und Puffer

Tabelle 8: Lösungen, Medien und Puffer

Lösungen	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10x)	Sigma
RPML-1640 Medium	Sigma
Fetal-Calve-Serum (FCS)	Biochrom AG
Ethylenediaminetetraacetic acid - disodium - salt solution, 0.5M	SERVA Electrophoresis GmbH
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Grüssing GmbH
ISO-Lösung (Bestandteile): <ul style="list-style-type: none"> - DNase I (50.000U) - Kollagenase III - Kollagenase IV - Hyaluronidase - HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) 	Roche Biochrom AG Biochrom AG Sigma PAA Laboratories GmbH
FoxP3 Staining Buffer Set: <ul style="list-style-type: none"> - Fixation/Permeabilization Diluent - Fixation/Permeabilisation Concentrate - 10x Permeabilization Buffer 	eBioscience
Lösungen für FACS: <ul style="list-style-type: none"> - FACS <i>Clean</i> - FACS <i>Flow</i> - FACS <i>Shutdown Solution</i> 	BD

2.1.8.1 Zellkultur

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
Wasch-Puffer für die Zellkultur (steril)
- Medium
RPMI 1640 + FCS 10% (für 30min, bei 56°C hitzeinaktiviert)
- CFSE Stammlösung / Aliquots
Aus jeder Ampulle des CFSE- (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) Proliferationsfarbstoffes wurde steril eine Stammkonzentration von 10mM mit 90µl DMSO hergestellt. Diese Lösung wurde dann in Aliquots à 10µl aufgeteilt und bei -20°C vor Licht geschützt tiefgefroren.
Eine Titration mit den verschiedenen Konzentrationen von 0,5µM, 1,0µM und 1,5µM wurde durchgeführt und daraus die geeignetste Konzentration von 1,0µM für die Zell-Markierung verwendet.
- ISO-Lösung
Aus folgenden Komponenten bestehend:
 - 0,05mg/ml DNase I
 - 0,24mg/ml Kollagenase III
 - 0,56mg/ml Kollagenase IV
 - 0,2mg/ml Hyaluronidase
 - 0,08U/ml H-Insulin➤ In HBSS Pufferlösung zugesetzt

Aliquots à 50ml wurden bei -20°C tiefgefroren.

2.1.8.2 Puffer für das Durchflusszytometer (FACS)

- Stain Buffer
1x PBS Pufferlösung + 2 mM EDTA
- Fixationspuffer für intrazelluläres Färben
1:4 Verdünnung: Fixation / Permeabilization Concentrate
+ Fixation / Permeabilization Diluent
- Waschpuffer für intrazelluläres Färben
1:10 Verdünnung: Permeabilization Buffer + Aqua dest.

2.1.8.3 MACS-Puffer

- 1x PBS Pufferlösung + 2mM EDTA + 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin), steril filtriert

2.1.9 Luminex

Tabelle 9: Luminex

Bezeichnung	Hersteller
Magnetische TGFβ1 Platte	Merck Millipore
Magnetische 7 Plex Platte: IL-6, IFNγ, IL-10, IL-17, IL-1β, IL-2, VEGF	Merck Millipore
Magnetische 12 Plex Platte: IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, VEGF, KC, TNFα, IL-13, IL-12 (p70), IL-4	Merck Millipore

2.1.10 Software

Tabelle 10: Software

Software	Hersteller
FlowJo 7.6.1 Diva	Tree Star
EndNote X7	Thomson Reuters
MS Office Paket 2010	Microsoft
Bio-Plex Manager 4.0	Bio Rad
GraphPad Prism 5.01	GraphPad

2.2 Methoden

2.2.1 Das orthotope Mausmodell

2.2.1.1 Mäuse

Für die Experimente wurden zwei verschiedene Mauslinien verwendet, der Wildtyp (WT) C57BL/6N von Charles River (Sulzfeld) bzw. von Janvier (Saint-Berthevin Cedex) und B7-H1 Knockout (KO) Mäuse aus eigener Zucht. Beide wiesen ein Alter von 8-12 Wochen auf und wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen im klinisch experimentellen Bereich (KEB) an der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg gehalten. Es handelte sich hierbei ausschließlich um männliche Mäuse, da diese im Gegensatz zu weiblichen Mäusen nicht so stark von hormonellen Schwankungen betroffen sind, die einen Einfluss auf das Immunsystem nehmen können.

Die B7-H1 KO-Mäuse wurden ursprünglich von Herrn Dong und seinen Kollegen gezüchtet und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Linda Diehl und Herrn Prof. Dr. Percy A. Knolle bereitgestellt. Die Linie geht auf eine homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der C57BL/6 Mäuse zurück [95].

Die Tierversuche wurden nach Absolvierung des FELASA-Kurs B und der Genehmigung durch die Behörden (Regierungspräsidium Karlsruhe) durchgeführt. Es wurde mit folgenden Tierversuchsanträgen gearbeitet:

35-91585.81 - G184/11 und G121/11, - A10/11 und A37/13, - T50/12 und T78/13.

2.2.1.2 Tierstall

Die Mäuse wurden in Käfigen des Typ II gehalten (Bodenfläche 363cm²). Bei dem Futter LASQCdiet *Rod 18, Auto* der Firma LASvendi handelte es sich um ein spezielles autoklavierbares, zertifiziertes Nagerfutter für Zucht und Haltung. Das Trinkwasser für die Mäuse kam aus extra installierten Leitungen. Es wurde mit UV-Licht bestrahlt, um ein möglichst keimfreies Milieu zu schaffen. Bei der Einstreu *Aspen wood chips*, LTE E-001 der Firma ABEDD handelte es sich um 5x5x1mm große Hackschnitzel.

2.2.1.3 Panc02 Zelllinie

Für die tierexperimentellen Versuche wurde die syngene Zelllinie des duktaalen Pankreasadenokarzinoms verwendet (Panc02) [96]. Dabei handelt es sich um eine

Zelllinie, die in Individuen desselben Inzuchtstammes (C57BL/6 Mäuse) gezüchtet wurde. Dies ist von Vorteil, da aufgrund der genetischen Identität keine Abstoßungsreaktion zu erwarten ist.

Die Arbeit mit diesen Zellkulturen erfolgte unter der Sterilbank. Hierfür wurde das Kultivierungsmedium RPMI 1640 mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin angereichert. Anschließend wurden damit die Zellen in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37,0°C und 5,0% CO₂ inkubiert, bei routinemäßiger Überprüfung von Kontaminationen mit Mykoplasmen. Ein Mediumwechsel erfolgte einmal pro Woche und eine Zellteilung (1:2 oder 1:4) zweimal pro Woche.

2.2.1.4 Vorbereitung der Panc02 Zellen für die OP

Die Panc02 Zellen wurden entsprechend zeitnah zur OP vorbereitet. Die Arbeit erfolgte ebenfalls unter der Sterilbank. Hierbei handelte es sich um eine adhärente Zelllinie, sodass die Abnahme des Mediumüberstandes problemlos erfolgte. Die Zugabe von 2ml Trypsin aus dem Warmwasserbad und das Inkubieren für weitere 4min im Brutschrank ermöglichten das Ablösen der Zellen von dem Boden der Zellkulturflasche. Es wurden 10ml PBS, ebenfalls aus dem Warmwasserbad, hinzugegeben, das Gemisch in ein 15ml Falcon überführt und bei einer Einstellung von 23°C, 400g, 7min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml PBS gelöst. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20µl abgenommen, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mit Trypanblau eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Die gewünschte Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml wurde errechnet und das Zellpellet (nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei gleicher Einstellung) entsprechend in der Menge PBS gelöst. Abschließend wurden die Zellen in ein Kryogefäß überführt und gekühlt gelagert.

2.2.1.5 Orthotopes Mausmodell

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte mittels Inhalationsnarkose. Für die Narkoseeinleitung wurde Isofluran mit einer Konzentration von 5,0 Vol% zusammen mit 60,0 Vol% Sauerstoff gewählt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit einer Gabe von 3,5 Vol% an Isofluran und 20,0 Vol% an Sauerstoff (Weibchen 3,0 Vol% Isofluran, 20,0 Vol% Sauerstoff).

Bepanthen-Augensalbe schützte die Augen vor dem Austrocknen.

Um für eine ausreichende Analgesie zu sorgen, wurden 50µl Rimadyl subkutan (5mg/kg s.c. bei einer 1:10 Verdünnung mit 0,9%igem NaCl) in die Nackenfalte injiziert.

Damit die Mäuse präzise und möglichst schonend operiert werden konnten, wurden sie in dorsaler Position fixiert. Das Abdomen wurde substernal rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Der Eingriff erfolgte in der linea alba. Durch das Vorverlagern des Magens wurde das Pankreas sichtbar, sodass von den vorbereiteten Panc02 Zellen 5µl/Maus, also 1×10^5 Zellen orthotop injiziert werden konnten. Hierfür wurde eine GASTIGHT-Spritze (25µl) von Hamilton verwendet. Nach der Implantation wurde die Injektionsstelle mit einer Ringpinzette für 30 Sekunden abgeklammmt, um einen Rückfluss der Zellen zu verhindern. Anschließend wurde das Pankreas in seine ursprüngliche Position gebracht.

Das Nähen erfolgte in zwei Schichten. Zuerst wurde das Peritoneum zusammen mit der Fascie (Fascia superficialis) und den Bauchmuskeln mit einer fortlaufenden Naht genäht. Dann erfolgte die Hautnaht mit Einzelheften. Für beide Nähte wurde ein resorbierbares Nahtmaterial verwendet; eine polyfile Nadel-Faden-Kombination (Polysorb 5-0, 1 Metric, mit abgerundeter Nadel). Zusätzlich wurde die Haut geklammert; 8 Tage post OP konnten die Klammern wieder entfernt werden.

2.2.2 Präparation von Milzen und Tumoren

Vier Wochen nach der Implantation der Panc02 Zellen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Steril wurden jeweils die Milz und der Primärtumor entnommen und in bereits vorbereitete, mit PBS gefüllte Eppendorfgefäße überführt, um ein adäquates, kühlendes Milieu für sie zu schaffen.

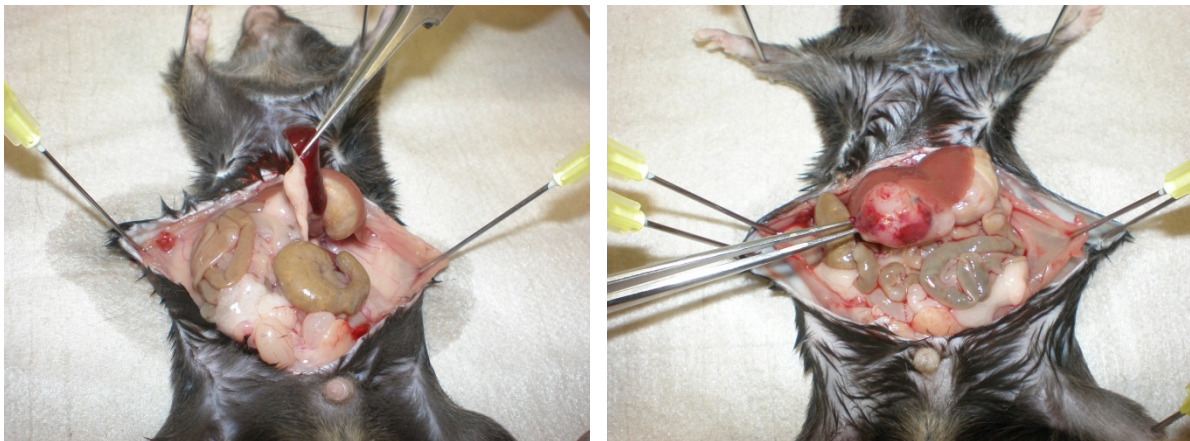


Abbildung 2.2.2-1 Sterile Entnahme der Milz (links) und des Primärtumors (rechts)

2.2.3 Herstellung einer Einzelzellsuspension

2.2.3.1 Milzen

Die nach der Entnahme in PBS aufbewahrten Milzen wurden jeweils durch ein 100µm Zellsieb passiert. Zur Gewinnung möglichst vieler Zellen wurde mit ca. 10ml PBS nachgespült. Danach wurden die Proben bei einer Einstellung von 4°C, 400g, 5min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10ml PBS gelöst und durch ein 40µm Zellsieb passiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 400g, 5min) wurde der Überstand abermals verworfen und das Zellpellet in 1ml PBS gelöst. Von dieser Zellsuspension wurde eine entsprechende Menge mit Trypanblau 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Mittels der Neubauer Zählkammer konnte abschließend die Zellzahl lebender Zellen ermittelt und die Zellkonzentration auf die gewünschte Zellzahl von 2×10^6 Zellen/50µl eingestellt werden [97].

Die Anzahl der Zellen pro ml wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe berechnet.

2.2.3.2 Tumoren

Die Aufbereitung der Tumoren erfolgte in einem ähnlichen Verfahren. Abweichend davon wurde eine spezielle Lösung (ISO-Lösung) verwendet. Diese diente der „Verdauung“ der Tumoren, d.h. die extrazelluläre Matrix der Tumoren und vor allem ihre nekrotischen Areale wurden gelockert:

Die vorhandene Tumorprobe wurde zerkleinert, 5ml der bereits vorgewärmten ISO-Lösung hinzugegeben und für 15min bei 37,5°C und 80rev/min im Warmwasserbad inkubiert.

Eine weitere Ausnahme stellte die zweimalige Passage durch das 40µm Zellsieb dar, um eine höhere Reinheit und ein geringeres Verklumpen der Tumoren zu erzielen.

Die nachfolgenden Schritte erfolgten in gleicher Weise nach dem FACS-Protokoll, wie bereits unter Punkt 2.4.1 beschrieben.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Durchflusszytometer (FACS)

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence activating cell sorting) genannt, basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Fluoreszenz-markierte Antikörper binden spezifisch an Zellen, welche mittels dem Seitwärtsstreulicht (SSC - Side

Scatter) und dem Vorwärtsstreulicht (FSC - Forward Scatter) auf Größe und Granularität bestimmt werden. Zusätzlich erfolgt eine Analyse der Zellen bezüglich ihrer Intensität der Fluoreszenz aufgrund der unterschiedlich gebundenen Antikörper. Jede einzelne Zelle durchwandert nacheinander einen Mikrokanal und wird von einem Laserstrahl angeregt. Das entstehende Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor aufgenommen und ausgewertet.

2.2.4.2 Cytometer Setup & Tracking (CS&-T) Beads

Diese Durchflusszytometer-Setup und Tracking Beads wurden von BD entwickelt, um die Detektoren, die Laserkonfiguration und deren Spannungen täglich auf ein Neues genau zu überprüfen und auf optimale Werte anzupassen.

2.2.4.3 Kompensation

Vor jeder FACS-Messung wurde eine sog. Kompensation durchgeführt, um die Überlappung von verschiedenen Fluoreszenzspektren zu minimieren.

Als zweite Kontrolle der positiven Events wurden FMO-Proben (Fluorescence minus one) gemessen, das heißt diese Proben wurden mit jedem Antikörper, ausgenommen dem der zuvor von Interesse war, gefärbt.

2.2.4.4 Phänotypisierung

Die durch die verschiedenen Verfahren gewonnenen und aufbereiteten Zellsuspensionen aus Milz, Tumor und Knochenmark, wurden mit verschiedenen Antikörper-Kombinationen in sog. *Panelen* angefärbt. Dadurch konnten sie dann auf bestimmte Zellpopulationen genau untersucht werden. Pro Messung konnten mit Hilfe des FACS Gerätes BD Canto II bis zu acht verschiedene Antigene mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern identifiziert werden.

In tumortragenden Mäusen wurde CD45 verwendet, um zwischen Tumorzellen (CD45 negativ) und Tumor-infiltrierenden Leukozyten (CD45 positiv) zu unterscheiden.

CD4/CD8 Panel, T_{reg} Panel:

Um die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu quantifizieren und ihren Phänotyp zu bestimmen, fand das CD4/CD8 Panel seine Verwendung. Zusätzlich wurde die Anzahl und Aktivität der Natürlichen Killerzellen und der Natürlichen Killer-T-Zellen aus den Leukozyten untersucht. Hierbei diente CD69 als Aktivierungsmarker. Weiterhin wurde die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 auf den jeweiligen Zellpopulationen

untersucht. Um die Aktivität der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) aus den $CD4^+$ T-Zellen zu analysieren, wurde das T_{reg} Panel verwendet. In diesem Panel wurden aus $CD4^+$ T-Zellen die T_{reg} aus $CD25^+FoxP3^+$ und die konventionellen T-Zellen (T_{con}) aus $CD25^{0 \rightarrow positiv}FoxP3^-$ dargestellt. Als Aktivierungsmarker wurde abermals CD69 verwendet und die Expression des PD-1 Moleküls untersucht.

CFSE-Panel:

Um den Einfluss der T_{reg} , MDSC und DC auf die Proliferation bzw. Suppression der Splenozyten zu untersuchen, wurde das CFSE-Panel verwendet.

Hierbei handelt es sich um ein intrazelluläres Panel für eine bessere CFSE-Darstellung zur Suppressions- bzw. Proliferationsanalyse.

Es wurden sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen auf ihre Proliferation bzw. Suppression untersucht. Des Weiteren fand der Aktivierungsmarker CD69 seine Verwendung. Darüber hinaus wurden die T_{reg} und T_{con} erfasst.

MDSC Panel:

Dieses Panel wurde angewendet, um die Reinheit der isolierten MDSC Zellpopulation zu untersuchen.

DC Panel:

Dieses Panel fand seine Verwendung, um die Reinheit der isolierten DC Zellfraktion zu untersuchen.

2.2.4.5 Extrazelluläres Anfärben

Zuerst wurden die einzelnen Zellsuspensionen mit dem CD16/CD32 Blocking Reagent für 10min inkubiert (1 μ l CD16/CD32 pro 50 μ l Zellsuspension), um später ein unspezifisches Binden der Antikörper an den Fc-Rezeptoren zu verhindern. Nach diesem Schritt wurden 50 μ l der Zellsuspension in jedes FACS-Röhrchen überführt, die entsprechenden fluoreszenz-gekoppelten Antikörper jeweils hinzugegeben und für 10-20min bei 4°C vor Licht geschützt inkubiert. Während dieser Inkubationszeit können die Antikörper spezifisch binden.

Danach erfolgte ein Waschschrift, indem 2ml Stain-Buffer pro Probe hinzugefügt und bei einer Einstellung von 4°C, 400g, 5min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und der Schritt zweimal wiederholt.

Danach wurden die Zellen in ca. 300 μ l Stain-Buffer aufgenommen, auf Eis gestellt und mittels Durchflusszytometer analysiert.

2.2.4.6 Intrazelluläres Anfärben

Beim intrazellulären Färben ist es wichtig, dass die Zellen fixiert und die Membran für die intrazellulären Antikörper permeabilisiert wird, damit diese an das intrazelluläre Antigen binden können.

Nachdem durch das extrazelluläre Färben die nicht-konjugierten Antikörper gebunden haben, wurden die Zellen nach dem ersten Waschschrift mit 1ml Fixationspuffer fixiert und für mind. 3 Stunden bei 4°C vor Licht geschützt inkubiert. Danach erfolgte zweimalig ein Waschschrift mit je 1ml Permeabilisationspuffer bei einer Zentrifugeneinstellung von 4°C, 400g, 5min. Daraufhin wurden nach Abpipettieren des Überstandes die intrazellulären und die konjugierten extrazellulären Antikörper entsprechend hinzugegeben und für 30min bei 4°C vor Licht geschützt inkubiert. Der Grund für die spätere Zugabe der konjugierten extrazellulären Antikörper ist, dass diese instabiler als die nicht-konjugierten sind und die Gefahr für sie bestünde, bei der Fixation auseinanderzufallen.

Abschließend erfolgten zwei weitere Waschschriffe nach zuvor beschriebener Methode. Die Zellen wurden danach in ca. 300µl Stain-Buffer aufgenommen, auf Eis gestellt und mittels Durchflusszytometer analysiert.

2.2.5 Magnetische Zellseparation – Das MACS-Verfahren

Die magnetische Zellseparation (MACS = magnetic activated cell sorting) diente der Isolation der MDSC aus Tumoren und Knochenmark, der T_{reg} aus Milzen und der DC aus Tumoren, jeweils nach dem Protokoll des Herstellers. Durch die magnetische Zellseparation konnte aufgrund der Expression von spezifischen Rezeptoren die gewünschte Zellpopulation magnetisch markiert werden. Während des Isolierungsvorgangs verblieben die positiv-markierten Zellen in den Säulen. Durch das Auswaschen der Säulen konnte die positive Zellfraktion gewonnen werden.

2.2.5.1 MACS-Isolation von T_{reg}

Die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) werden durch den CD4⁺ und CD25⁺ Marker charakterisiert. Die Isolierung erfolgte in zwei Schritten.

Zuerst wurden für die Isolierung der CD4⁺ T-Zellen diese vorangereichert, indem die nicht-CD4⁺ T-Zellen indirekt mit dem Biotin-Antikörper Cocktail und den Anti-Biotin MicroBeads magnetisch markiert wurden. Gleichzeitig wurden die CD25⁺ T-Zellen mit dem CD25-PE Antikörper markiert.

Im zweiten Schritt erfolgte die positive Selektion von CD4⁺ und CD25⁺ T-Zellen, indem sie mit den Anti-PE MicroBeads magnetisch markiert wurden.

Nach Herstellung der Einzelzellsuspension wurde diese bei einer Einstellung von 4°C, 300g, 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einer bestimmten Menge an MACS-Puffer aufgenommen. Danach wurde der Biotin-Antikörper Cocktail hinzugegeben und für 10min im Kühlschrank (4°C) vor Licht geschützt inkubiert. Als nächstes wurde MACS-Puffer, die Anti-Biotin MicroBeads und der CD25-PE Antikörper hinzugefügt und für weitere 15min im Kühlschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift nach Zugabe von MACS-Puffer bei gleicher Zentrifugeneinstellung. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in MACS-Puffer aufgenommen und es wurde mit der magnetischen Separation begonnen.

Die LD-Säulen wurden im magnetischen Feld platziert und mit MACS-Puffer gespült. Nach Zugabe und Durchlaufen der vorbereiteten Zellsuspension wurden die Säulen nochmals gespült. Bei der aufgefangenen Durchflussfraktion handelte es sich um die nicht-markierten CD4⁺ T-Zellen.

Diese isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden im zweiten Schritt bei 4°C, 300g, 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in MACS-Puffer aufgenommen. Die Anti-PE MicroBeads wurden hinzugefügt und für 15min im Kühlschrank vor Licht geschützt inkubiert. Es erfolgte abschließend ein weiterer Waschschrift wie zuvor beschrieben und der zweite MACS-Vorgang mit MS-Säulen konnte beginnen. Dieses Mal erfolgte jedoch eine positive Selektion, das heißt die magnetisch markierten Zellen (CD4⁺ und CD25⁺ T-Zellen) wurden mittels eines Kolbens und entsprechender Menge an MACS-Puffer aus der Säule gewaschen. Hierbei handelte es sich dann um die isolierte T_{reg} Zellfraktion.

2.2.5.2 MACS-Isolation von MDSC

Die MDSC Subpopulationen werden durch die unterschiedliche Expression von Ly-6C und Ly-6G auf der Zelloberfläche charakterisiert.

In diesem Fall erfolgte zuerst eine positive Selektion der Gr-1^{high} Ly-6G⁺ myeloiden Zellen, indem die Zellen indirekt mit Anti-Ly-6G-Biotin und Anti-Biotin MicroBeads magnetisch markiert wurden. Bei der negativen Durchfluss-Fraktion handelte es sich um Gr-1^{dim} Ly-6G⁻ myeloide Zellen. Diese wurden indirekt mit Anti-Gr-1-Biotin und

Streptavidin MicroBeads magnetisch markiert und es erfolgte eine positive Selektion dieser Gr-1^{dim} Ly-6G⁻ Zellen.

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde diese bei einer Einstellung von 4°C, 300g, 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einer bestimmten Menge an MACS-Puffer aufgenommen. Danach wurde FcR Blocking Reagent hinzugegeben und für 10min im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Anti-Ly-6G-Biotin wurde hinzugefügt und für weitere 10min im Kühlschrank inkubiert. Als nächstes folgte ein Waschschrift mit MACS-Puffer und gleicher Zentrifugeneinstellung. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer entsprechenden Menge MACS-Puffer wieder aufgenommen. Nun wurden die Anti-Biotin MicroBeads beigefügt und für 15min im Kühlschrank inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit MACS-Puffer bei gleicher Einstellung. Die Zellen wurden in der entsprechenden Menge an MACS-Puffer aufgenommen und konnten nun magnetisch separiert werden.

Die LS-Säulen wurden im magnetischen Feld auf einem geeigneten MACS Separator platziert und mit MACS-Puffer gespült. Die vorbereitete Zellsuspension wurde in die Säulen gegeben, wobei die nicht markierte Durchflussfraktion aufgefangen wurde. Abschließend wurden die Säulen mit MACS-Puffer dreimal gewaschen. Die gesamte Durchflussfraktion entsprach den nicht markierten Zellen (Gr-1^{dim} Ly-6G⁻), welche in einem nächsten Schritt eine magnetische Markierung erhielten.

Die positive Zellfraktion (Gr-1^{high} Ly-6G⁺) wurde mit Hilfe von MACS-Puffer und einem Kolben durch Eluierung aus der Säule gewaschen und stellte die granulozytäre MDSC-Population dar. Um ihre Reinheit zu erhöhen, lies man diese Zellfraktion ein weiteres Mal durch neue LS-Säulen laufen.

Im nächsten Schritt wurde die gesammelte Durchflussfraktion magnetisch markiert. Nach einem Waschschrift (4°C, 300g, 10min) wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und Anti-Gr-1-Biotin in entsprechender Menge hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation im Kühlschrank für 10min und daraufhin ein weiterer Waschschrift mit MACS-Puffer bei gleicher Einstellung. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in entsprechender Menge MACS-Puffer aufgenommen. Danach wurden Streptavidin MicroBeads hinzugegeben und für 15min im Kühlschrank inkubiert. Ein weiterer Waschschrift folgte und die Zellen wurden in MACS-Puffer aufgenommen.

Die magnetische Separation und positive Selektion der Gr-1^{dim} Ly-6G⁻ Zellen konnte beginnen.

Hierfür wurden MS-Säulen verwendet und auf die gleiche Weise am Ende die positive Zellfraktion durch Eluierung der Säulen gewonnen, welche die monozytäre Zellpopulation der MDSC darstellte.

Um die Reinheit der Gr-1^{dim} Ly-6G⁻ Zellen zu erhöhen, liefen sie auch hier ein weiteres Mal durch neue MS-Säulen.

2.2.5.3 MACS-Isolation von DC

Die DC Zellpopulation wird unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie CD11c⁺ sind. Es erfolgte eine positive Selektion der CD11c⁺ Zellen.

Nach Herstellung der Einzelzellsuspension wurde diese bei einer Einstellung von 4°C, 200g, 10min zentrifugiert, der Überstand danach verworfen und das Zellpellet in MACS-Puffer aufgenommen. Um die Reinheit und Spezifität der DC zu erhöhen, wurde die Zellsuspension mit dem FcR Blocking Reagent (CD16/CD32) in einer Konzentration von 3µl/100µl MACS-Puffer für 10 min inkubiert. Dies sollte später ein unspezifisches Binden der CD11c MicroBeads an den Fc-Rezeptoren verhindern.

Im nächsten Schritt wurden die CD11c MicroBeads hinzugegeben und für 15min im Kühlschrank (4°C) vor Licht geschützt inkubiert. Nach einem Waschschrift bei gleicher Zentrifugeneinstellung wurde das Zellpellet in der gewünschten Menge an MACS-Puffer aufgenommen und es erfolgte eine positive Selektion der CD11c⁺ Zellen mittels LS-Säulen.

Um die Reinheit zu erhöhen, erfolgte ein zweiter MACS-Durchgang der positiv eluierten Fraktion durch LS-Säulen.

2.2.5.4 Reinheitsmessung

Zur Bestimmung der Reinheit der jeweils zuvor isolierten Zellfraktionen (T_{reg}, MDSC und DC), wurden 0,5x10⁶ Zellen entnommen und wie unter Punkt 2.2.4.5 für die Durchflusszytometrie vorbereitet, indem die Zellen mit dem Anti-Mouse CD45 Antikörper inkubiert wurden. Die Reinheit betrug bei jeder Isolation mindestens 75% oder darüber.

2.2.6 Untersuchung der Aktivität der einzelnen Zellpopulationen

2.2.6.1 Proliferations-/Suppressionsmarker

Um die Proliferation bzw. Suppression der Splenozyten nachzuvollziehen, wurden sie mit dem sog. CFSE- (5-(und 6-) Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) Farbstoff markiert.

CFSE besitzt die Fähigkeit eine intakte Zellmembran zu durchdringen. Es bindet intrazellulär an sekundäre Aminogruppen von Proteinen. Eine Zellteilung wird durch die Halbierung der Farbstoffmenge in der nächsten Zellgeneration deutlich.

Die geeignetste, durch Titration ermittelte Konzentration von 1,0µM wurde für die CFSE-Farbmarkierung der Splenozyten verwendet. Diese wurde zu der Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml gegeben und für 10min bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt inkubiert. Um den Markierungsprozess zu stoppen wurde das Vier- bis Fünffache an Volumen von kaltem Medium dazugegeben und für weitere 5min auf Eis gekühlt inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit kaltem Medium bei einer Zentrifugeneinstellung von 4°C, 400g, 5min gewaschen und konnten anschließend in Kultur gebracht werden.

2.2.6.2 Verwendung des B7-H1 Antikörpers

Um den Einfluss des Oberflächenmoleküls B7-H1 auf die Proliferation bzw. Suppression der Splenozyten zu untersuchen, wurde die eine Hälfte der nach dem jeweiligen MACS-Protokoll isolierten T_{reg} bzw. MDSC bzw. DC von WT-Mäusen für 30min mit dem B7-H1 Antikörper inkubiert (bei einer Konzentration von 10µl/ml). Nach einem zusätzlichen Waschschrift (4°C, 400g, 5min) wurden sie dann in der entsprechenden Konzentration zu den Splenozyten gegeben, parallel zu nicht behandelten Splenozyten.

2.2.6.3 Ko-Kultivierung

Für die Ko-Kultur wurden 96-well-Platten mit U-förmigem Boden verwendet. Die zuvor mit CFSE markierten Splenozyten wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/100µl Medium auf diesen Platten verteilt.

Die isolierten T_{reg}, MDSC bzw. DC -mit bzw. ohne B7-H1 Antikörper- wurden in einer Konzentration im Verhältnis von 1:1 hinzugegeben, das heißt ebenfalls 2×10^5 Zellen/100µl Medium.

Als Aktivierungsstimulus wurden eine Stunde nach Ausplatzierung der Zellen die Antikörper CD3 (1µl/ml) und CD28 (2µl/ml) hinzugefügt.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37°C im Inkubator wurden die Zellen mittels Pipette geerntet. Der Mediumüberstand wurde bei -20°C tiefgefroren, bis er zur Luminex-Analyse herangezogen wurde. Abschließend wurden die Zellen für die anstehende Messung mittels des Durchflusszytometers nach dem üblichen FACS-Protokoll vorbereitet.

2.2.7 Luminex

Luminex dient zur quantitativen Bestimmung vor allem von Zytokinen und Chemokinen aus Mediumüberständen von Zellkulturen, Blutserum oder Blutplasma. Die Methode beruht auf speziellen Mikrosphären (sog. *Beads*), welche als Festphase dienen und jeweils mit spezifischen Antikörpern gekoppelt sind. Zusätzlich weisen diese eine unterschiedliche Fluoreszenz auf. Kommt es nun zu einer Bindung der zugegebenen Analyten, wird dies durch die Zugabe eines zweiten biotinylierten Antikörpers und des Streptavidin-Phycoerythrin Konjugats, welches wiederum an die biotinylierten Nachweisantikörper bindet, erfasst und mittels des Bio Plex-Analysators sichtbar gemacht.

Im Folgenden wurden Mediumüberstände der verschiedenen Ko-Kulturen verwendet. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden die Proben bei 800g für 5min zentrifugiert, um den Zelldebris auf den Boden des Eppendorfgefäßes absetzen zu lassen.

Zuerst wurde die Platte mit Assay Buffer (bei 7 und 12 Plex Kit mit Wash Buffer) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen und nach 10min mit Hilfe der magnetischen Waschstation vorsichtig abgegossen und ausgeklopft. Nach diesem Waschschrift wurden folgende Reagenten hinzugefügt:

Assay Buffer zu den background- und sample-wells, Standard zu den standard-wells und Quality Controls zu den control-wells, Serummatrix zu background-, standard- und control-wells. Danach wurden die ausgewählten Proben zu den sample-wells gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Beads in jedes well pipettiert, die Platte verschlossen und auf den Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden alle Reagenten mit Hilfe der magnetischen Waschstation entfernt und zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden Detection

Antibodies in jedes well pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte direkt die Zugabe eines zweiten Antikörpers, Streptavidin-Phycoerythrin in jedes well und ein Inkubieren für weitere 30min bei Raumtemperatur. Nach zwei erneuten Waschschritten mit Waschpuffer, wurde Sheath Fluid in jedes well hinzugegeben und konnte mit dem Bio-Plex 200 System analysiert werden.

Bei den verwendeten Platten, der TGF β 1 Platte, der 7 Plex Platte und der 12 Plex Platte, handelte es sich jeweils um eine 96-well-Platte, welche zwei Positiv-Kontrollen (Quality Controls), die jeweiligen Standards für die spätere Standardkurve und die restlichen wells für die Proben beinhaltete. Die Proben wurden jeweils als Duplikate gemessen, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen.

2.2.8 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm „GraphPad Prism“ in der Version 5.01 durchgeführt. Die Verteilung von Variablen wurden als SD (Standardabweichung), SE (Standardfehler), Median und 25%- und 75%- Perzentil beschrieben. Zur Analyse von zwei normal verteilten Datengruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige T-Test herangezogen. Hierbei diente die Nullhypothese der Annahme, dass die in der Statistik zu vergleichenden Werte gleich sind. Die Alternativhypothese, als die Menge von alternativen Annahmen gegenüber der Nullhypothese, besagt, dass ebendiese Werte nicht gleich sind.

Für mehrere Gruppen wurde die „one-way ANOVA (Varianzanalyse)“ mit dem Bonferroni's post-hoc Test genutzt und für die nicht-parametrischen Daten der Mann-Whitney U-Test angewendet. Hierbei wurden Unterschiede ab einem p-Wert von $<0,05$ als signifikant betrachtet und mit einem Stern gekennzeichnet. Bei einem p-Wert $<0,01$ wurden zwei und bei einem p-Wert $<0,001$ drei Sterne zur Kennzeichnung verwendet (höchste Signifikanz).

3 Ergebnisse

Um die von mir für diese Arbeit formulierten Ziele zu erreichen und die Rolle des B7-H1 Moleküls im PaCa besser verstehen zu können, wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt und die daraus gewonnen Erkenntnisse beschrieben und aufgezeigt.

Im folgenden Abschnitt wird die Expression des Rezeptors PD-1 auf Immunzellen und der Einfluss des B7-H1 Moleküls untersucht.

3.1 Charakterisierung der Expression von PD-1 auf Immunzellen

Das folgende Experiment wurde durchgeführt, um die Expression des Moleküls PD-1 auf verschiedenen Zellen des Immunsystems zu untersuchen. Hierfür wurden dieselben Immunzellen sowohl von gesunden, männlichen C57BL/6 (Wildtyp, WT) Mäusen als auch von gesunden, männlichen B7-H1 KO-Mäusen isoliert und miteinander verglichen.

3.1.1 Splenozyten aus gesunden Mäusen

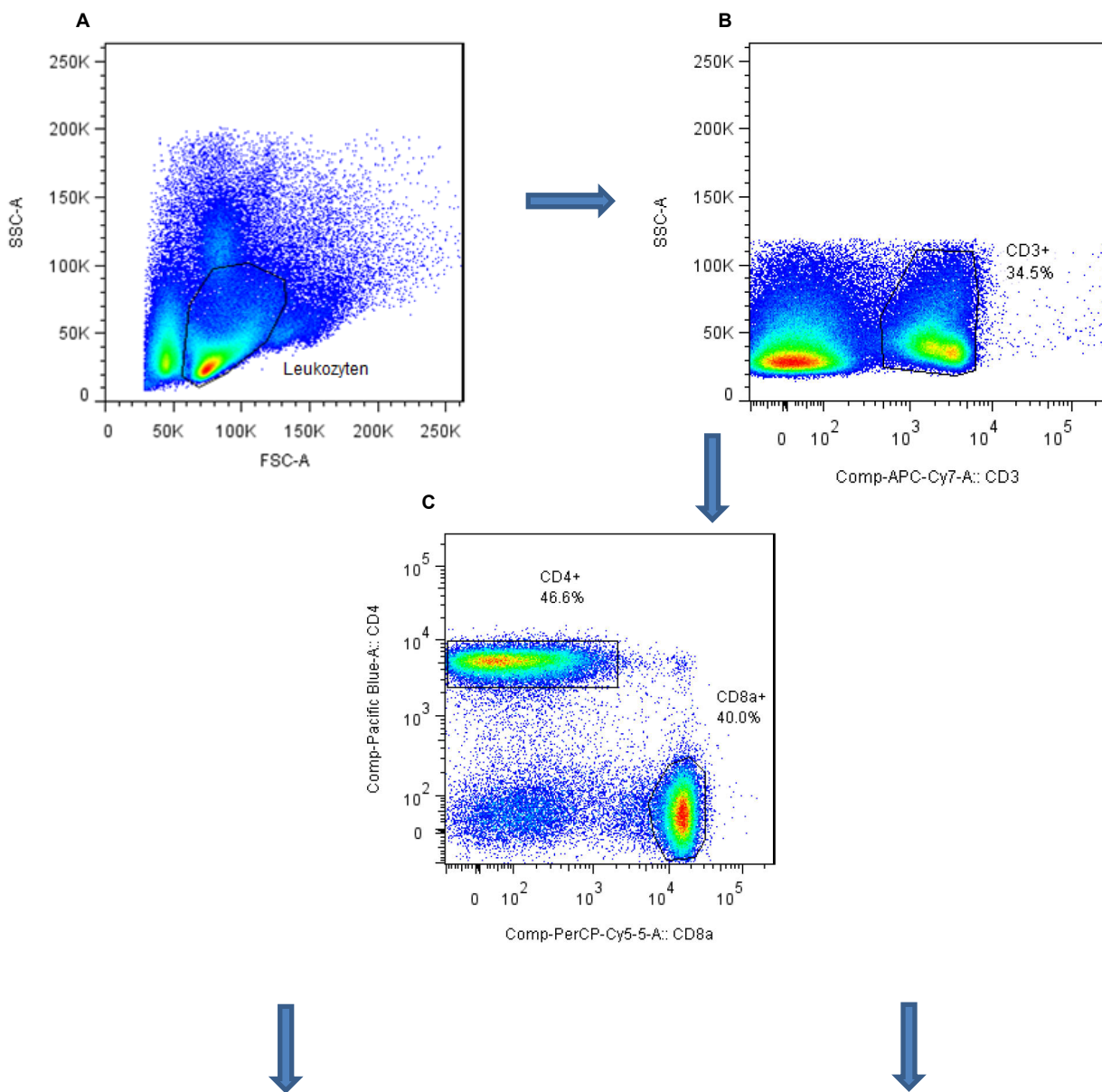
Aus den Milzen gesunder Mäuse (WT und B7-H1 KO) wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Um eine Charakterisierung der gewünschten Zellpopulationen und deren Oberflächenmarker, wie unter anderem PD-1, zu ermöglichen, wurden die Splenozyten mit spezifischen, fluoreszenz-markierten Antikörpern gekoppelt. Damit konnte einerseits ermittelt werden, wie viele der Zellen PD-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren und andererseits eine Aussage über die Unterschiede in der Gesamtzahl dieser Moleküle auf der jeweiligen Zelloberfläche getroffen werden. Hierfür wurde der *mean fluorescence intensity*- (MFI-) Wert herangezogen. Als Kontrollen dienten die jeweiligen FMO-Proben (fluorescence minus one). Die Zellpopulationen konnten abschließend mit Hilfe der FACS-Analyse bildlich dargestellt werden. Das Experiment wurde in drei Durchläufe unterteilt und mit jeweils 3 WT-Mäusen und 3 B7-H1 KO-Mäusen durchgeführt.

3.1.1.1 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die Auswertungsstrategie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist unter der Abbildung 3.1.1-1 dargestellt.

Die Leukozyten wurden mittels des FSC- SSC-*Dot-Plots* dargestellt, also anhand ihrer Größe (forward scatter, FSC) und ihrer Granularität (side scatter, SSC) (Abb. 3.1.1-1 Bild A). Aus ihnen konnten die CD3⁺ T-Zellen identifiziert werden (Abb. 3.1.1-

1 Bild B), woraus dann wiederum sowohl die $CD4^+$, als auch die $CD8^+$ T-Zellen gezeigt wurden (Abb. 3.1.1-1 Bild C). Im Histogramm wurden dann aus beiden Zellpopulationen ($CD4^+$ und $CD8^+$) jeweils diejenigen Zellen analysiert, welche PD-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 3.1.1-1 Bild D). Um den Grad der Aktivierung zu verdeutlichen, wurde der Aktivierungsmarker CD69 verwendet und ebenfalls im Histogramm dargestellt (Abb. 3.1.1-1 Bild E). Die jeweiligen FMO-Proben dienten als Kontrolle (Abb. 3.1.1-1 Bild F und G).



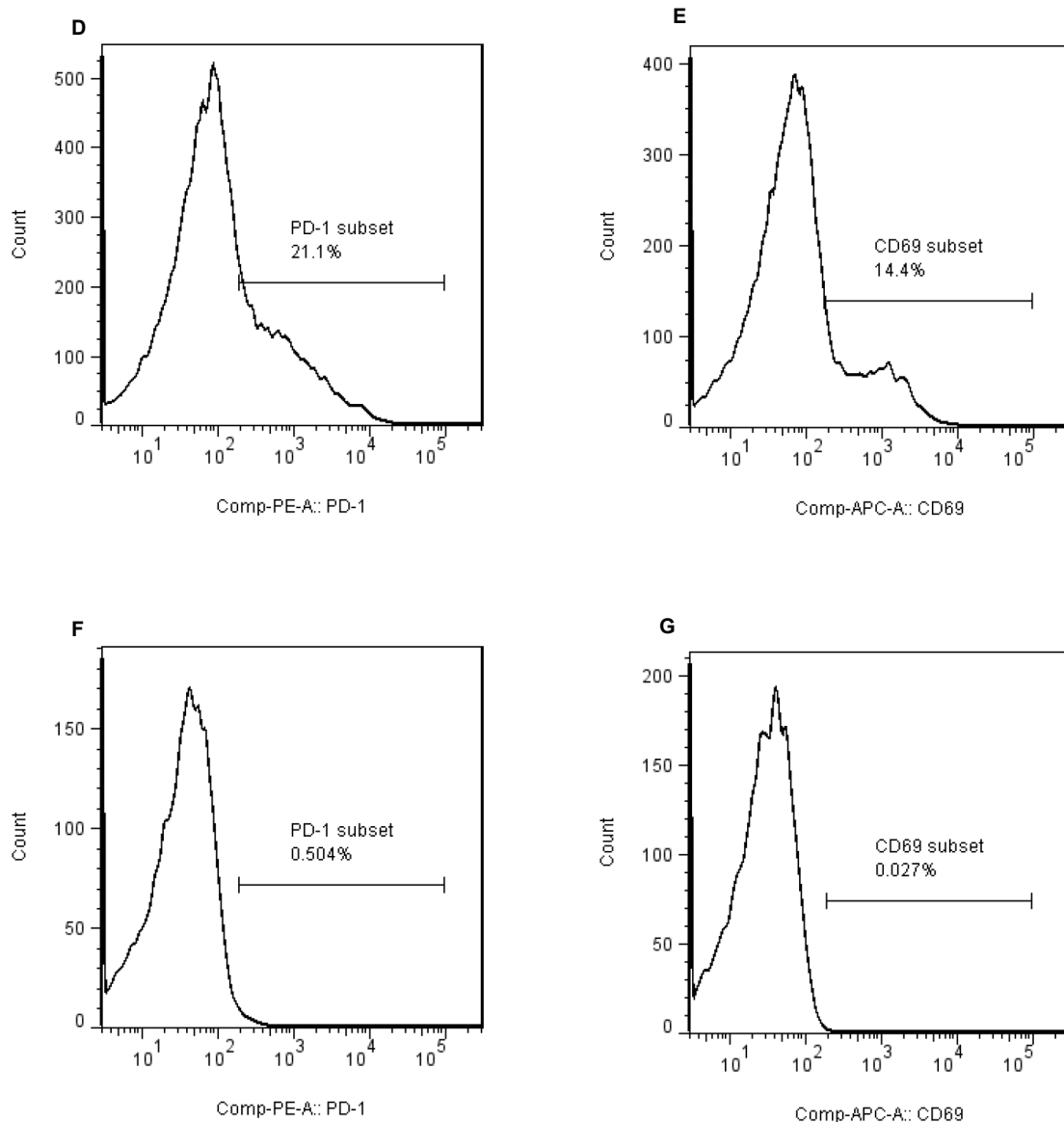


Abbildung 3.1.1-1 Auswertungsstrategie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Leukozyten. **B:** CD3⁺ T-Zellen. **C:** CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen **D:** Darstellung der CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen im Histogramm. **E:** Darstellung der CD4⁺CD69⁺ T-Zellen im Histogramm. **F:** FMO-Probe von PD-1. **G:** FMO-Probe von CD69.

Betrachtet man in der statistischen Auswertung die erste Abbildung, ist ein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich der WT- zu den B7-H1 KO-Mäusen festzustellen (Abb. 3.1.1-2 Bild A). Die B7-H1 KO-Mäuse wiesen einen höheren Anteil an CD4⁺ T-Zellen auf als die WT-Mäuse. Vergleicht man als nächstes die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen zwischen den beiden Mauslinien, so konnte für die B7-H1 KO-Mäuse ein deutlich höherer prozentualer Anteil an PD-1 festgestellt werden (Abb. 3.1.1-2 Bild

B). Um die Veränderungen in der Gesamtzahl des PD-1 Moleküls zu betrachten, wurde der MFI-Wert der PD-1 Moleküle herangezogen. Auch hier konnte bei den B7-H1 KO-Mäusen eine höhere Intensität der Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 3.1.1-2 Bild C). Bei Betrachtung des Aktivierungsgrades der $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe des Markers CD69 war kein wesentlicher Unterschied zu verzeichnen (Abb. 3.1.1-2 Bild D). Einzig bei der Untersuchung des MFI-Wertes von CD69 der $CD4^+CD69^+$ T-Zellen, zeigten die WT-Mäuse einen höheren Wert als die B7-H1 KO-Mäuse (Abb. 3.1.1-2 Bild E).

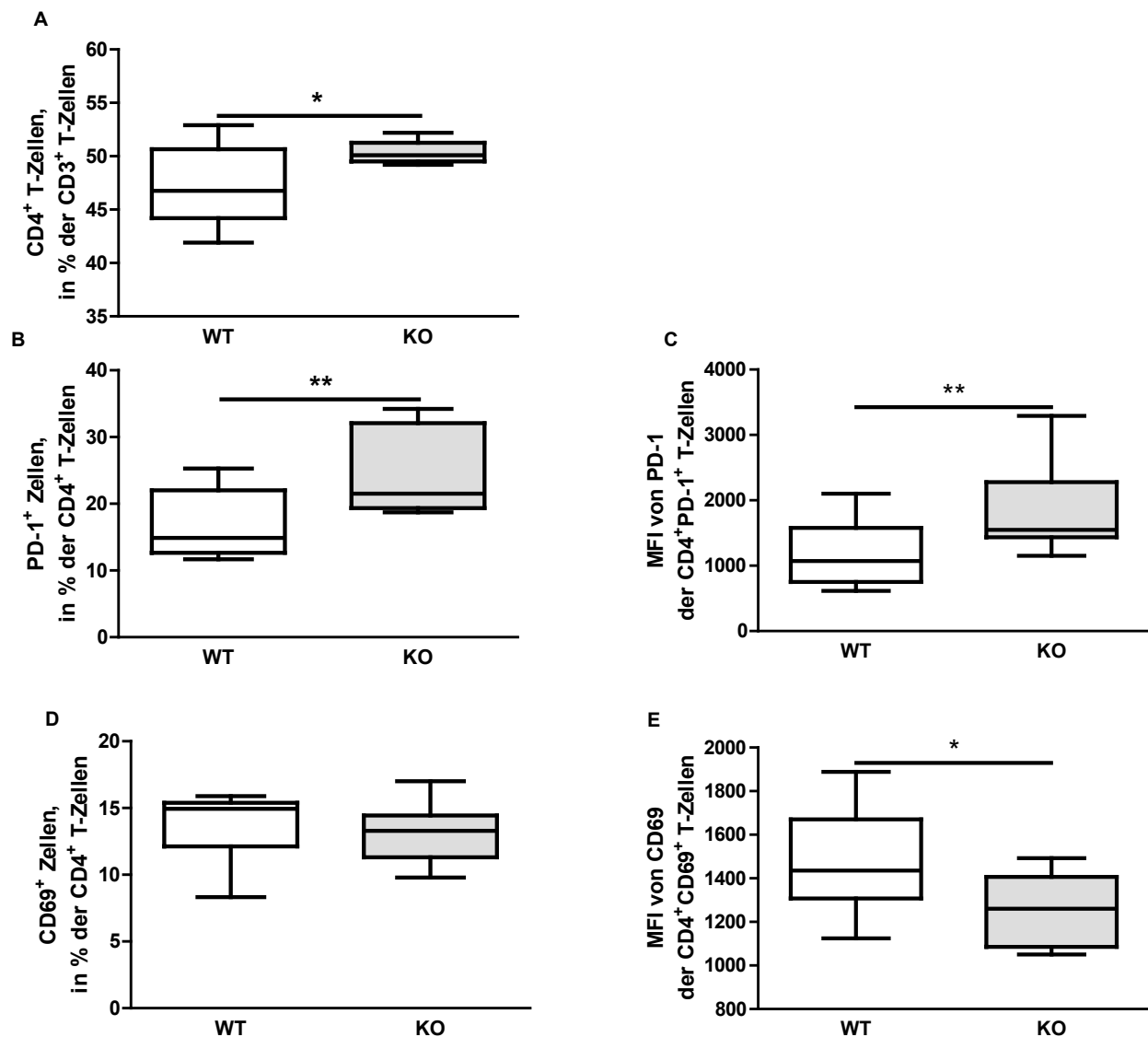
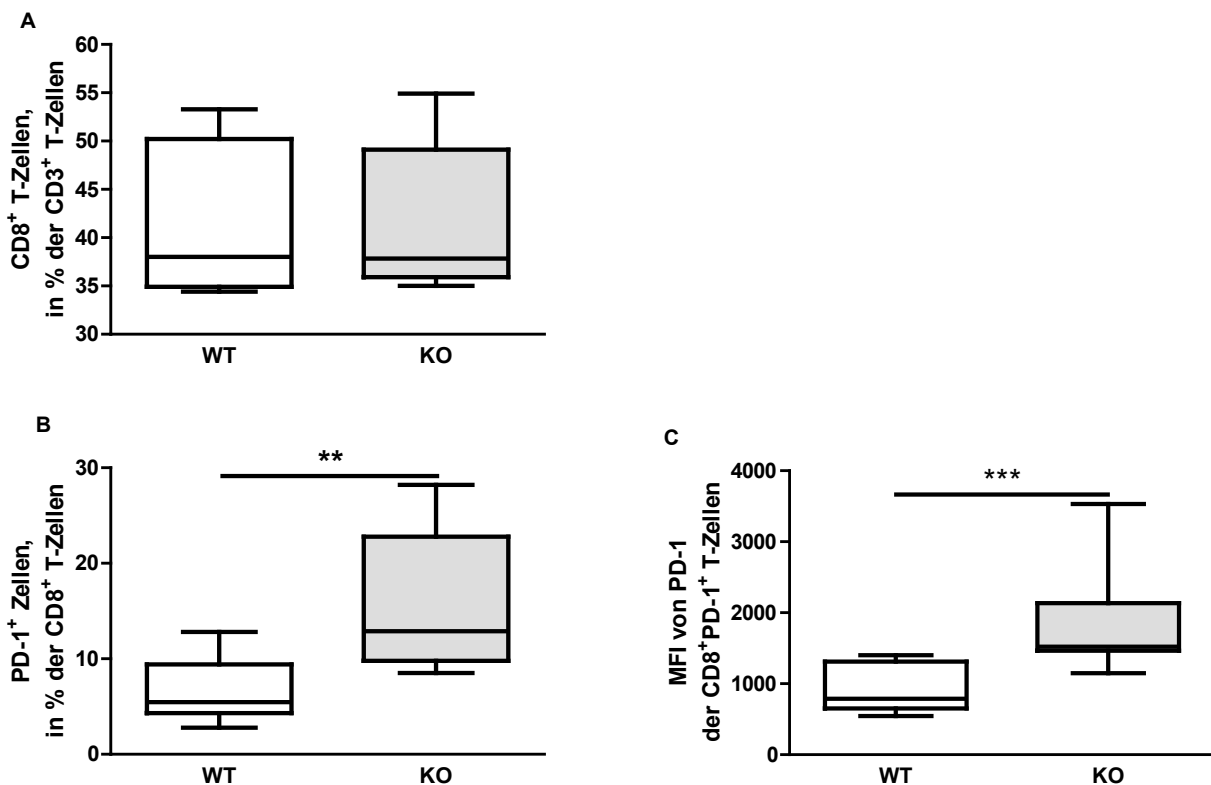


Abbildung 3.1.1-2 Quantifizierung und Charakterisierung der $CD4^+$ T-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der $CD4^+$ T-Zellen in Bezug auf $CD3^+$ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der $PD-1^+$ Zellen in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen. **C:** MFI-Wert von PD-1 der $CD4^+PD-1^+$ T-Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der $CD69^+$ Zellen in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen. **E:** MFI-Wert von CD69 der $CD4^+CD69^+$ T-Zellen. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$.

Im nächsten Schritt galt das Interesse den $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 3.1.1-3). Hier konnte kein Unterschied im prozentualen Anteil der $CD8^+$ T-Zellen in Bezug auf die $CD3^+$ T-Zellen zwischen WT- und B7-H1 KO-Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.1.1-3 Bild A). Betrachtet man dagegen den Prozentsatz der Expression der $CD8^+$ T-Zellen von dem Molekül PD-1, lag dieser bei den B7-H1 KO-Mäusen auf einem signifikant höheren Niveau als bei den WT-Mäusen (Abb. 3.1.1-3 Bild B). Im Hinblick auf den MFI-Wert von PD-1 der $CD8^+PD-1^+$ T-Zellen, konnte sogar ein hoch signifikanter Unterschied gezeigt werden (Abb. 3.1.1-3 Bild C). Die B7-H1 KO-Mäuse wiesen einen deutlich höheren MFI-Wert auf. Abschließend wurde mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 der Aktivierungsstatus der $CD8^+$ T-Zellen zwischen WT- und B7-H1 KO-Mäusen miteinander verglichen (Abb. 3.1.1-3 Bild D). Hierbei konnte jedoch keine statistisch auffallende Abweichung festgestellt werden. Lediglich bei der Beurteilung des MFI-Wertes von CD69 der $CD8^+CD69^+$ T-Zellen war bei den WT-Mäusen ein deutlicher Anstieg im Gegensatz zu den B7-H1 KO-Mäusen zu verzeichnen (Abb. 3.1.1-3 Bild E).



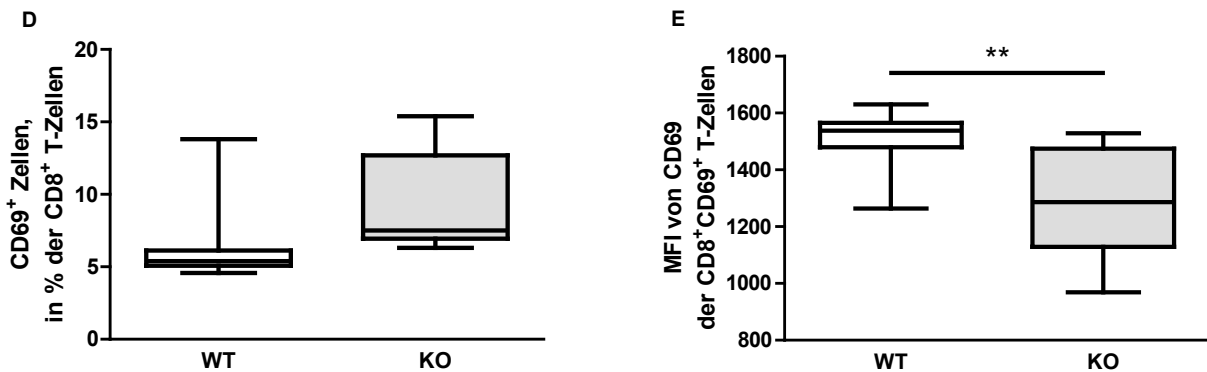


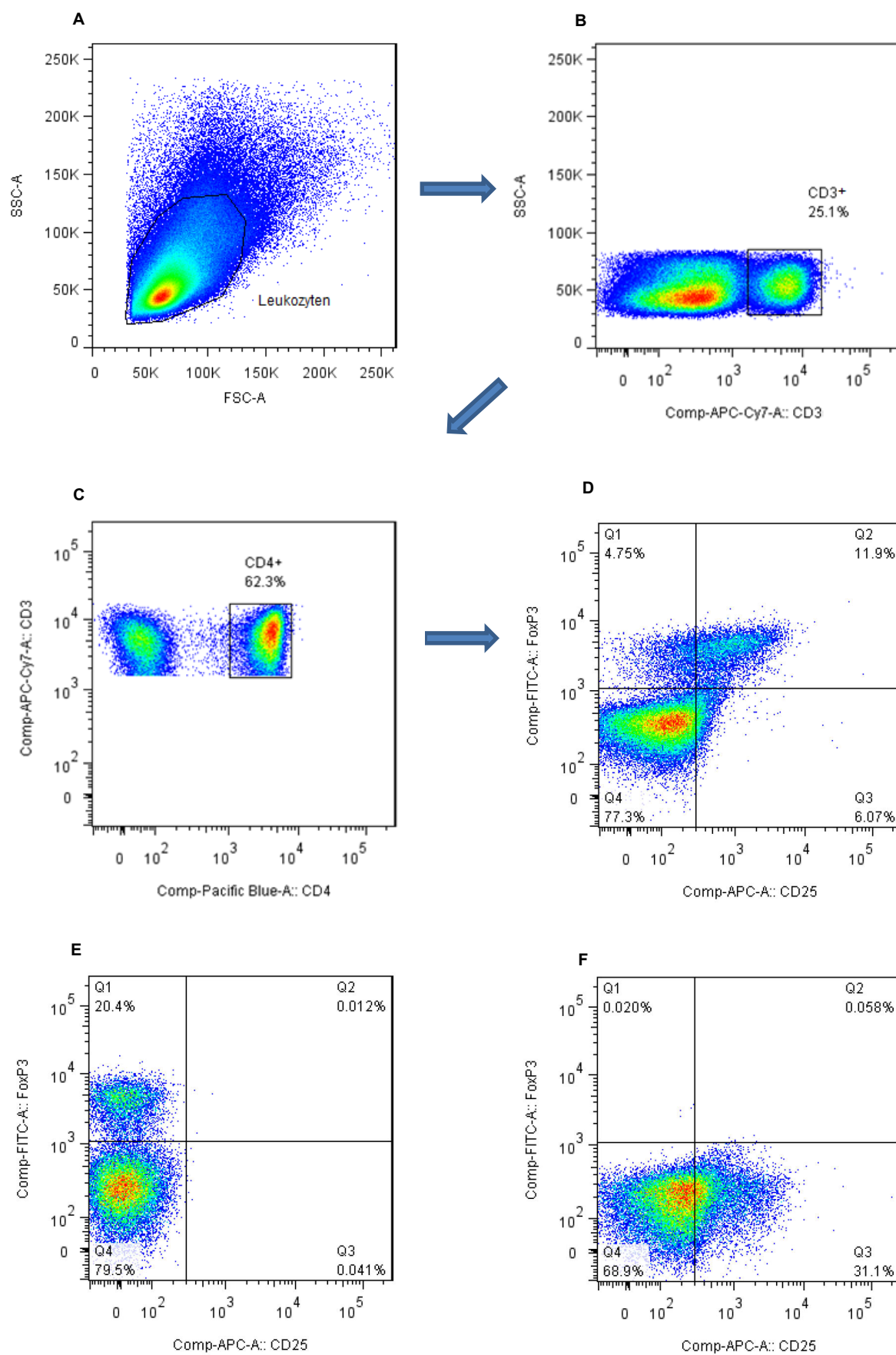
Abbildung 3.1.1-3 Quantifizierung und Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf CD3⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der PD-1⁺ Zellen in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. **C:** MFI-Wert von PD-1 der CD8⁺PD-1⁺ T-Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. **E:** MFI-Wert von CD69 der CD8⁺CD69⁺ T-Zellen. **p ≤ 0,01. ***p ≤ 0,001.

3.1.1.2 Regulatorische und konventionelle T-Zellen, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ und CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ Zellen

Des Weiteren wurden im CD4-Kompartiment die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die konventionellen T-Zellen (T_{con}), die CD25⁻FoxP3⁺ und CD25⁺FoxP3⁻ (T_{con} aktiviert) näher betrachtet.

Mittels FSC und SSC konnten die Leukozyten und daraus alle CD3⁺ T-Zellen bestimmt werden (Abb. 3.1.1-4 Bild A und B). Aus den CD3⁺ T-Zellen wurde die CD4⁺ Zellpopulation erfasst, welche mit Hilfe des CD25 und FoxP3 Markers in vier Quadranten und damit in T_{reg} (Q2), T_{con} (Q4), CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ T-Zellen (Q1) und CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ T-Zellen (T_{con} aktiviert) (Q3) eingeteilt wurden (Abb. 3.1.1-4 Bild C und D). In den jeweiligen Quadranten wurde ebenfalls der Fokus auf die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 gelegt und durch die Darstellung im Histogramm verdeutlicht (Abb. 3.1.1-4 Bild G). Der Aktivierungsstatus der Zellpopulationen in den einzelnen Quadranten wurde durch die Verwendung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 bestimmt und ebenfalls im Histogramm dargestellt (Abb. 3.1.1-4 Bild H). Als Kontrollen wurden die entsprechenden FMO-Proben durchgeführt (Abb. 3.1.1-4 Bild E und F, Bild I und J).



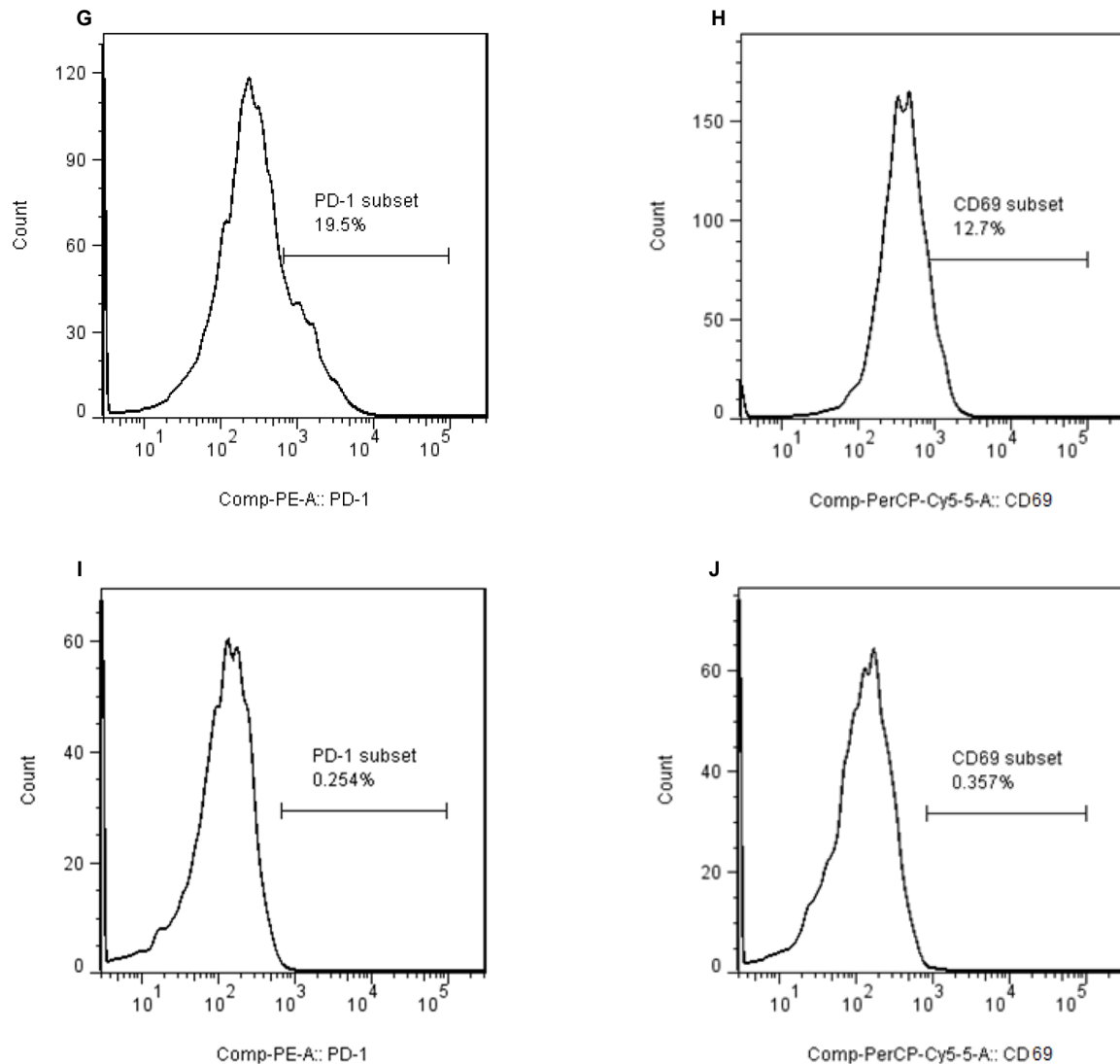


Abbildung 3.1.1-4 Auswertungsstrategie der regulatorischen T-Zellen und der konventionellen T-Zellen aus den Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Leukozyten. **B:** CD3⁺ T-Zellen. **C:** CD4⁺ T-Zellen. **D:** Q1: CD25⁺FoxP3⁺, Q2: CD25⁺FoxP3⁺ (T_{reg}), Q3: CD25⁺FoxP3⁺ (T_{con} aktiviert), Q4: CD25⁺FoxP3⁺ (T_{con}). **E:** FMO-Probe von CD25. **F:** FMO-Probe von FoxP3. **G:** PD-1⁺ T_{reg} im Histogramm. **H:** CD69⁺ T_{reg} im Histogramm. **I:** FMO-Probe von PD-1. **J:** FMO-Probe von CD69.

3.1.1.2.1 Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

Wie aus der Abbildung 3.1.1-5 Bild A ersichtlich wird, konnte keine Abweichung bezüglich des prozentualen Anteils der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen (T_{reg}) im Vergleich von WT- zu B7-H1 KO-Mäusen festgestellt werden. Betrachtet man jedoch die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 auf dieser Zellpopulation, wird ein hoch signifikanter Unterschied erkennbar (Abb. 3.1.1-5 Bild B). Die B7-H1 KO-Mäuse exprimierten unverkennbar mehr PD-1 auf den T_{reg} als die WT-Mäuse. Die Statistik des MFI-Wertes des PD-1 Moleküls auf den T_{reg} verdeutlichte ebenfalls einen

höheren Wert bei den B7-H1 KO-Mäusen (Abb. 3.1.1-5 Bild C). Der Aktivierungsgrad dieser Zellpopulation wurde durch die Darstellung mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 verständlich und es konnte eine deutlich höhere Aktivierung der T_{reg} bei den B7-H1 KO-Mäusen beobachtet werden (Abb. 3.1.1-5 Bild D). Im Gegensatz dazu zeigte der MFI-Wert von CD69 der T_{reg} keine bedeutende Abweichung zwischen den unterschiedlichen Mauslinien (Abb. 3.1.1-5 Bild E).

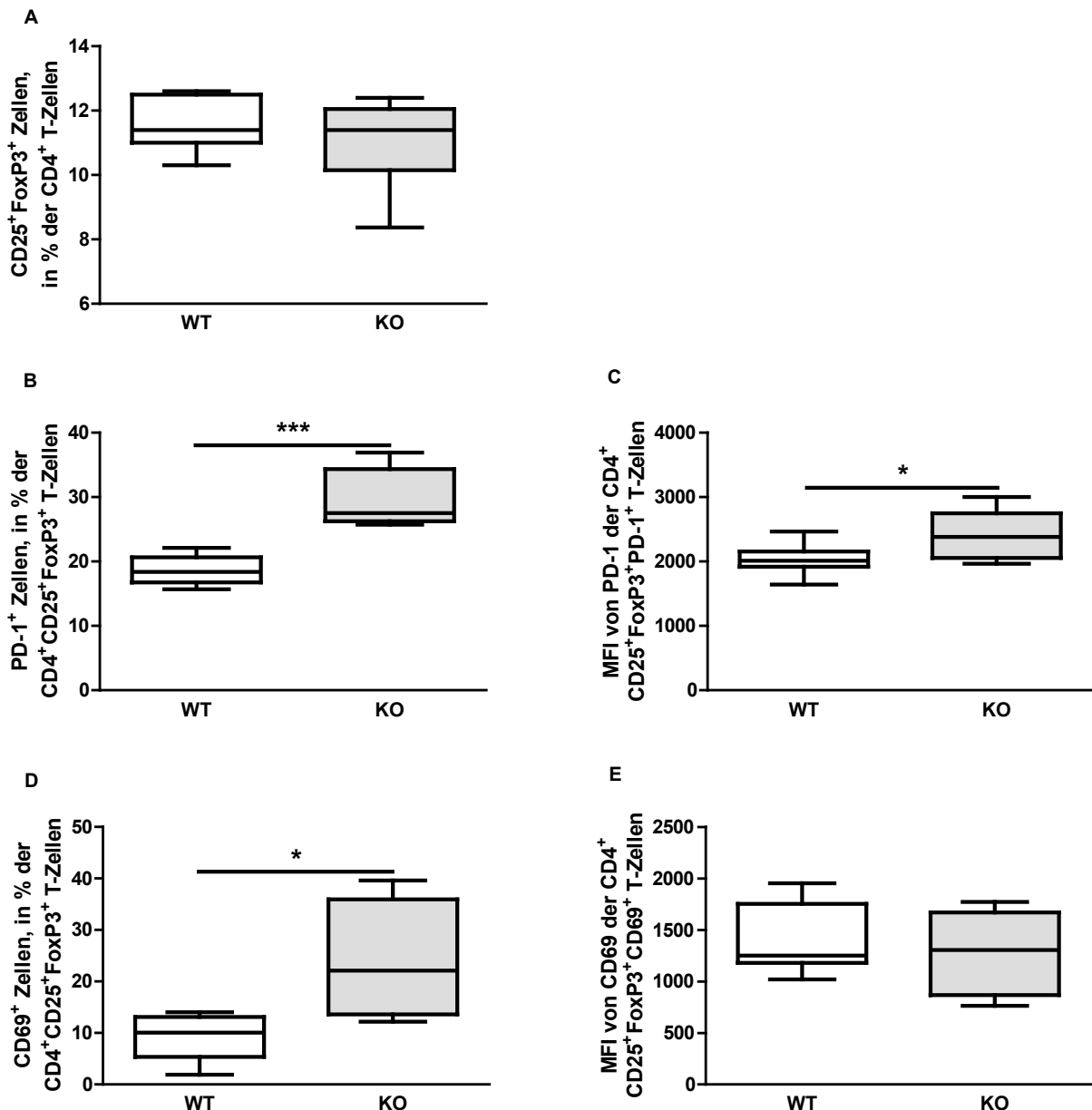


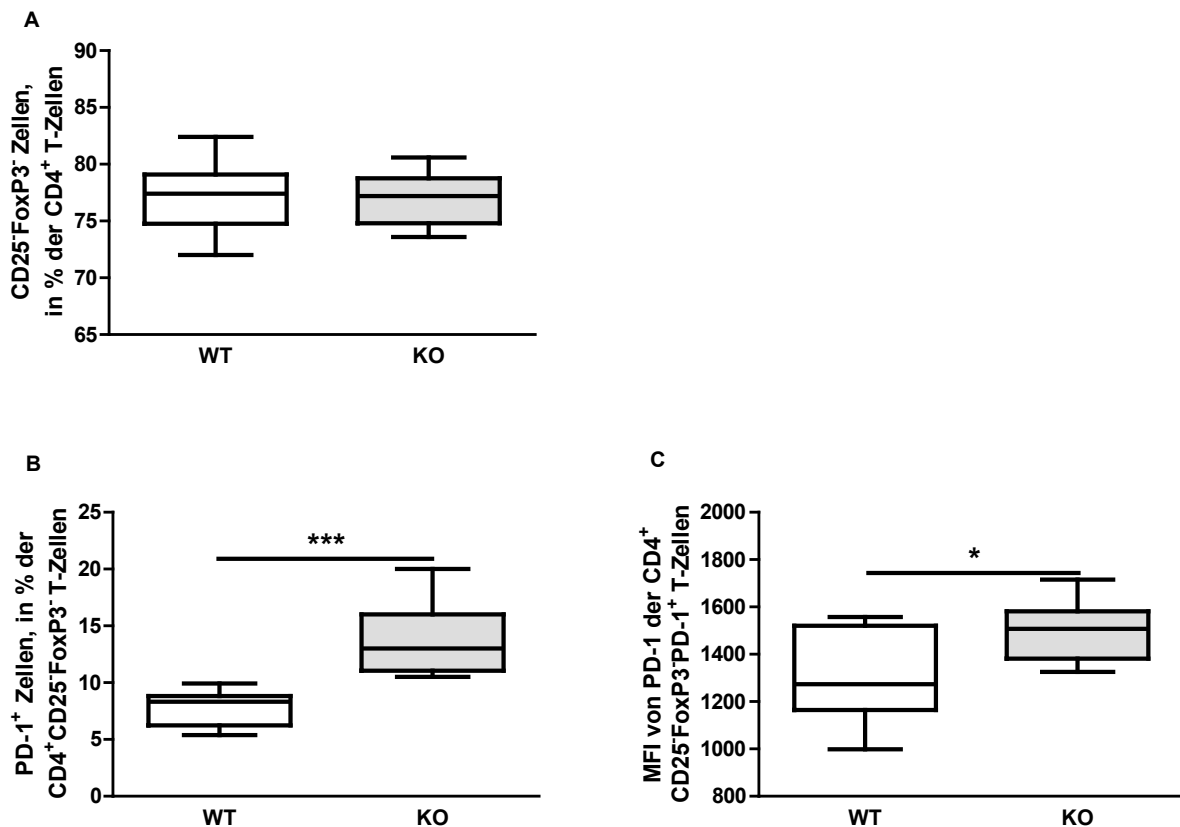
Abbildung 3.1.1-5 Quantifizierung und Charakterisierung der T_{reg} ($CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ Zellen) aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der T_{reg} in Bezug auf $CD4^{+}$ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der $PD-1^{+}$ Zellen in Bezug auf T_{reg} . **C:** MFI-Wert von PD-1 der T_{reg} . **D:** Prozentualer Anteil der $CD69^{+}$ Zellen in Bezug auf T_{reg} . **E:** MFI-Wert von CD69 der T_{reg} . * $p \leq 0,05$.

*** $p \leq 0,001$.

3.1.1.2.2 Konventionelle T-Zellen (T_{con})

Die Abbildung 3.1.1-6 zeigt die statistische Auswertung der $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ T-Zellen (T_{con}). Aus der ersten Abbildung wird ersichtlich, dass der prozentuale Anteil der T_{con} der WT- und B7-H1 KO-Mäuse auf gleichem Niveau lag (Abb. 3.1.1-6 Bild A). Betrachtet man hingegen die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1, so wird ein hoch signifikanter Unterschied erkennbar, da die T_{con} der B7-H1 KO-Mäuse einen deutlich höheren Prozentsatz an PD-1 aufwiesen, als die WT-Mäuse (Abb. 3.1.1-6 Bild B). Im Hinblick auf den MFI-Wert des PD-1 Moleküls der T_{con} wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied bezüglich einer deutlich höheren Gesamtmenge bei den B7-H1 KO-Mäusen erkennbar (Abb. 3.1.1-6 Bild C). Die Aktivierung der T_{con} -durch Verwendung des frühen Aktivierungsmarker CD69 dargestellt- zeigt, dass die WT-Mäuse gegenüber den B7-H1 KO-Mäusen eine ähnlichen Aktivierungsstatus aufwiesen (Abb. 3.1.1-6 Bild D). Auch bei der Beurteilung des MFI-Wertes von CD69 der T_{con} war keine deutliche Abweichung zwischen den beiden Mauslinien festzustellen (Abb. 3.1.1-6 Bild E).



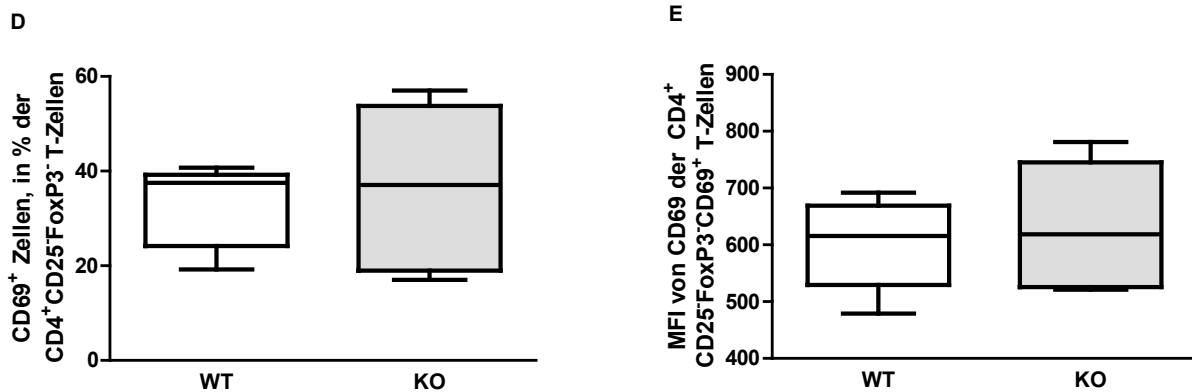


Abbildung 3.1.1-6 Quantifizierung und Charakterisierung der T_{con} ($CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Zellen) aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der T_{con} in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der $PD-1^+$ Zellen in Bezug auf T_{con} . **C:** MFI-Wert von $PD-1$ der T_{con} . **D:** Prozentualer Anteil der $CD69^+$ Zellen in Bezug auf T_{con} . **E:** MFI-Wert von $CD69$ der T_{con} . * $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$.

3.1.1.2.3 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen

Der folgenden Grafik ist zu entnehmen, dass es einen deutlichen Unterschied im prozentualen Anteil der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen zwischen den beiden Mauslinien gegeben hat. Die B7-H1 KO-Mäuse wiesen einen deutlich höheren Prozentsatz auf, als die WT-Mäuse (Abb. 3.1.1-7 Bild A). Betrachtet man die Expression des Oberflächenmoleküls $PD-1$ der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen, so zeigten die B7-H1 KO-Mäuse einen signifikant höheren prozentualen Anteil als die WT-Mäuse (Abb. 3.1.1-7 Bild B). Dies wird auch bei der Beurteilung des MFI-Wertes von $PD-1$ der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen erkennbar, da dieser Wert bei den B7-H1 KO-Mäuse ebenfalls eindeutig über dem der WT-Mäuse lag (Abb. 3.1.1-7 Bild C). Mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers $CD69$ wurde der Aktivierungsgrad der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen untersucht und es konnte keine Abweichung, weder im Aktivierungsstatus (Abb. 3.1.1-7 Bild D) zwischen den beiden Mauslinien, noch bezüglich des MFI-Wertes von $CD69$ (Abb. 3.1.1-7 Bild E) der $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD69^+$ T-Zellen festgestellt werden.

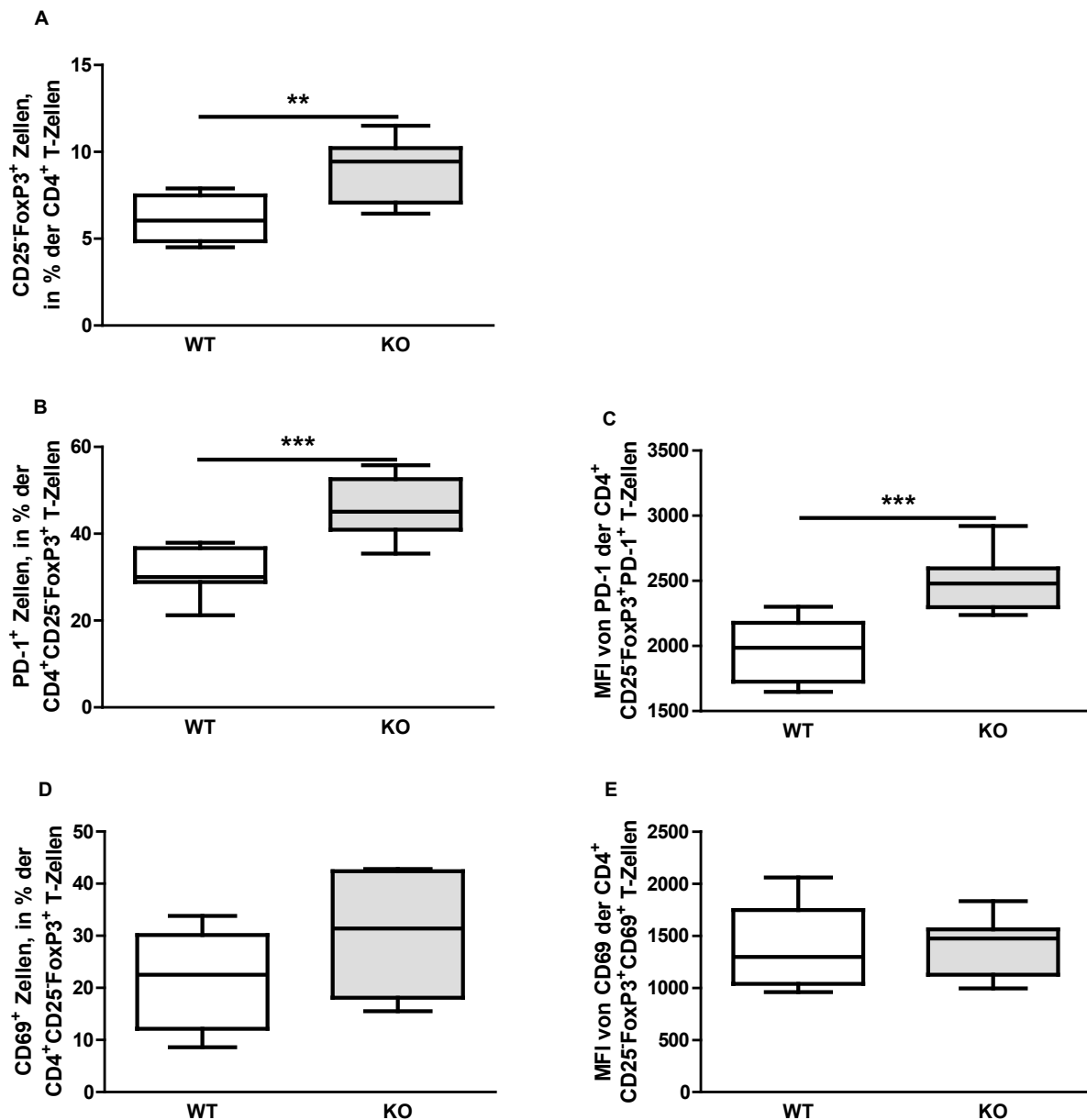


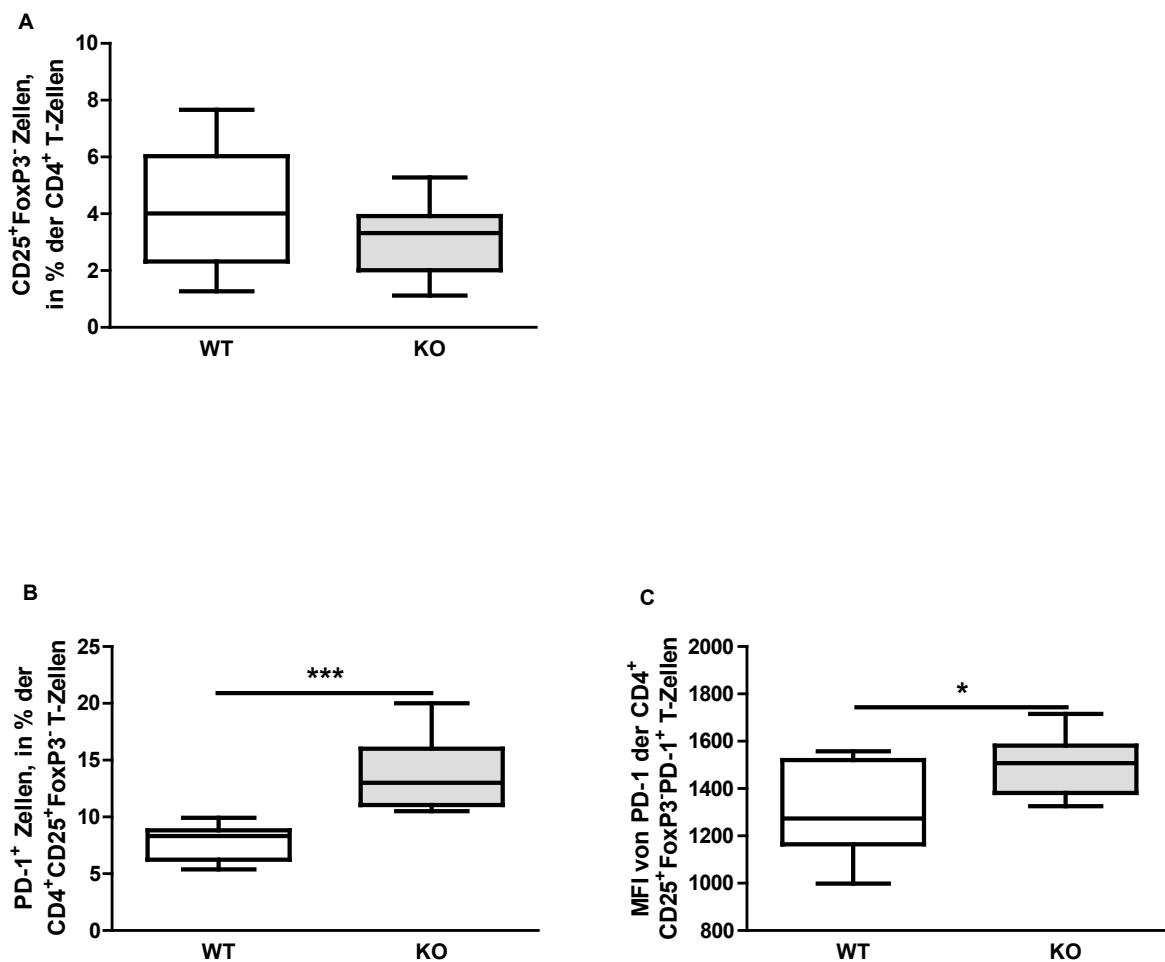
Abbildung 3.1.1-7 Quantifizierung und Charakterisierung der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der CD25⁺FoxP3⁺ Zellen in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der PD-1⁺ Zellen in Bezug auf CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen. **C:** MFI-Wert von PD-1 der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ T-Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen. **E:** MFI-Wert von CD69 der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD69⁺ T-Zellen. **p≤0,01. ***p≤0,001.

3.1.1.2.4 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen (T_{con} aktiviert)

Aus der Abbildung 3.1.1-8 wird die statistische Auswertung der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen (T_{con} aktiviert) ersichtlich. Betrachtet man den prozentualen Anteil der aktivierten T_{con} im Vergleich der WT-Mäuse zu den B7-H1 KO-Mäusen, so konnte kein bedeutender Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 3.1.1-8 Bild A). In Bild B der Abbildung 3.1.1-8, wurde die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 der

aktivierten T_{con} ermittelt und ein hoch signifikanter Unterschied festgestellt. Die B7-H1 KO-Mäuse zeigten einen deutlich höheren Anteil im Prozentsatz der Expression von PD-1 der aktivierten T_{con} gegenüber den WT-Mäusen. Auch im Hinblick auf den MFI-Wert von PD-1 der aktivierten T_{con} wurde bei den B7-H1 KO-Mäusen ein höherer Gesamtwert aufgezeigt (Abb. 3.1.1-8 Bild C). Die Überprüfung des Aktivierungsgrades der aktivierten T_{con} mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 hingegen zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen den WT- und den B7-H1 KO-Mäusen (Abb. 3.1.1-8 Bild D). Auch der Vergleich der Gesamtmenge von CD69 der aktivierten T_{con} durch Heranziehen des MFI-Wertes von CD69 zeigte keine Differenz (Abb. 3.1.1-8 Bild E).



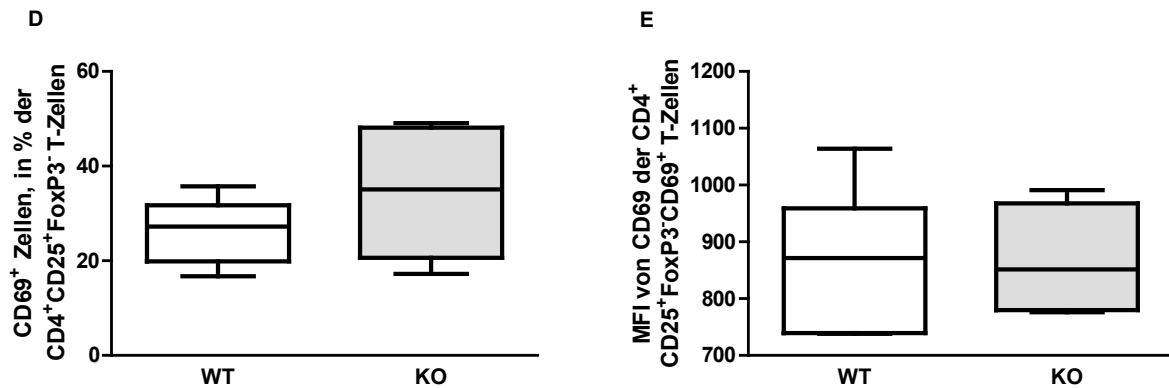
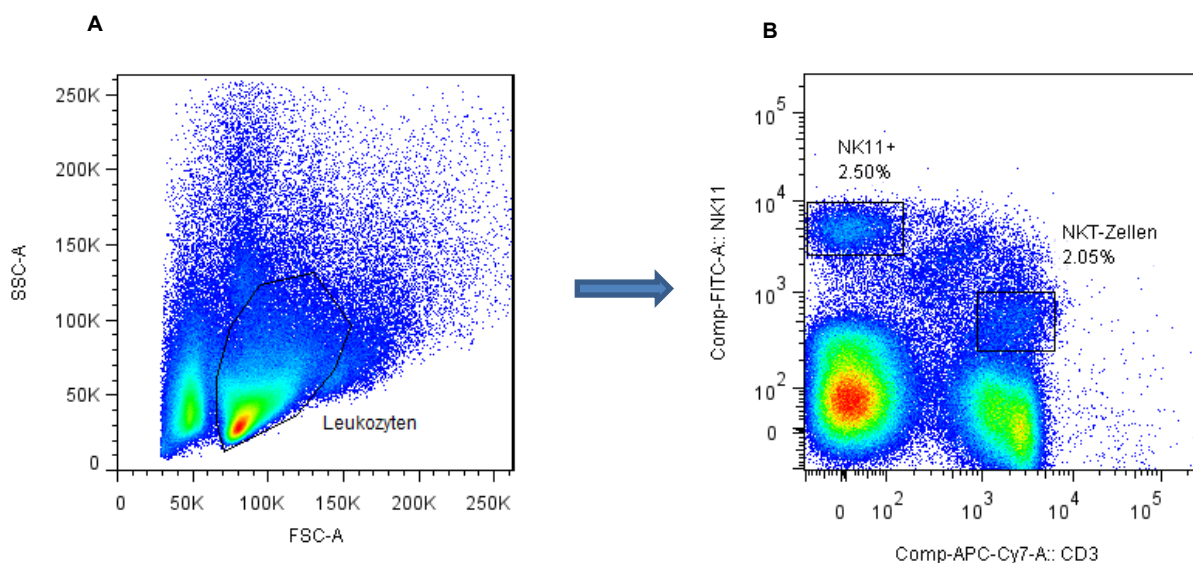


Abbildung 3.1.1-8 Quantifizierung und Charakterisierung der aktivierten T_{con} ($CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Zellen) aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO Mäuse

A: Prozentualer Anteil der aktivierten T_{con} in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der PD-1⁺ Zellen in Bezug auf die aktivierten T_{con} . **C:** MFI-Wert von PD-1 der aktivierten T_{con} . **D:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf die aktivierten T_{con} . **E:** MFI-Wert von CD69 der aktivierten T_{con} . * $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$.

3.1.1.3 Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen)

Abschließend lag ein Augenmerk auf den NK-Zellen und den NKT-Zellen. Die Leukozyten wurden anhand des FSC- SSC-*Dot-Plots* dargestellt (Abb. 3.1.1-9 Bild A) und hieraus konnten wiederum die NK- und NKT-Zellen mit Hilfe der Marker NK1.1 und CD3 abgebildet werden (Abb. 3.1.1-9 Bild B). Im Histogramm wurde auf beiden Zellpopulationen (NK- und NKT-Zellen) die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 (Abb. 3.1.1-9 Bild C) und der Aktivitätsstatus mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 untersucht (Abb. 3.1.1-9 Bild D). Als Kontrollen dienten abermals die jeweiligen FMO-Proben.



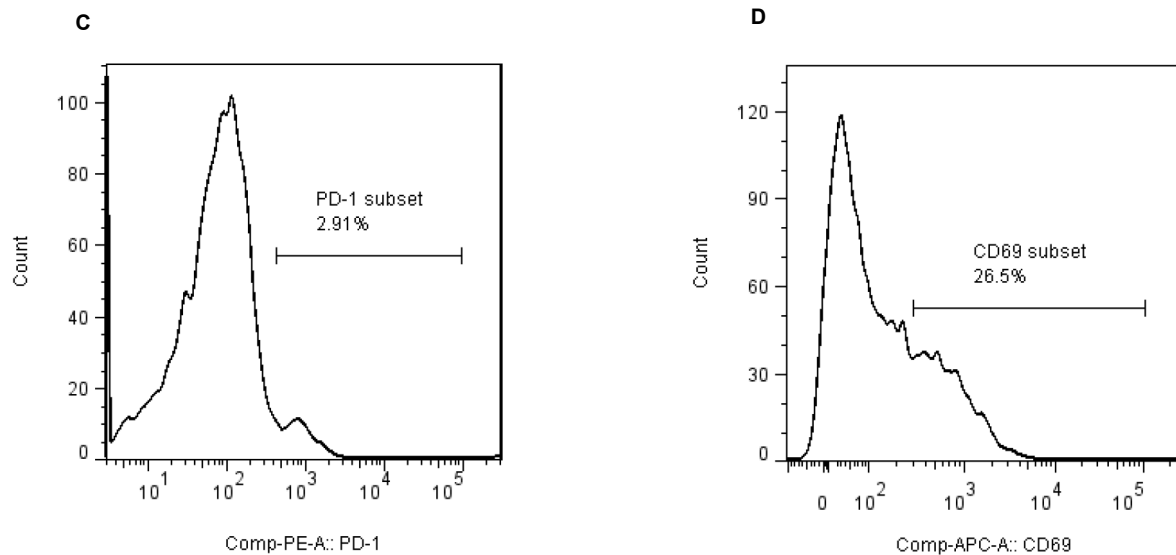


Abbildung 3.1.1-9 Auswertungsstrategie der NK-Zellen und der NKT-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Leukozyten. B: NK- und NKT-Zellen. C: NK1.1⁺PD-1⁺ Zellen im Histogramm. D: NK1.1⁺CD69⁺ Zellen im Histogramm.

3.1.1.3.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Vergleicht man den prozentualen Anteil der NK-Zellen aus den Leukozyten von WT-Mäusen zu B7-H1 KO-Mäusen, so konnte ein signifikant höherer Anteil bei den WT-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 3.1.1-10 Bild A). Im Hinblick auf die Expression des PD-1 Moleküls der NK-Zellen wurde ein größerer Prozentsatz bei den B7-H1 KO-Mäusen festgestellt (Abb. 3.1.1-10 Bild B). Um Veränderungen in der Gesamtzahl der PD-1 Moleküle auf NK-Zellen feststellen zu können, wurde der MFI-Wert von PD-1 der NK1.1⁺PD-1⁺ Zellen herangezogen, wobei hier kein deutlicher Unterschied zwischen WT- und B7-H1 KO-Mäusen aufgezeigt wurde (Abb. 3.1.1-10 Bild C). Der Aktivierungsgrad der NK-Zellen wurde mithilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 untersucht. Hier wurde im Vergleich beider Mauslinien kein prozentualer Unterschied erkennbar (Abb. 3.1.1-10 Bild D). Auch der MFI-Wert von CD69 der NK1.1⁺CD69⁺ Zellen zeigte keine statistisch auffallende Abweichung zwischen WT- und B7-H1 KO-Mäusen (Abb. 3.1.1-10 Bild E).

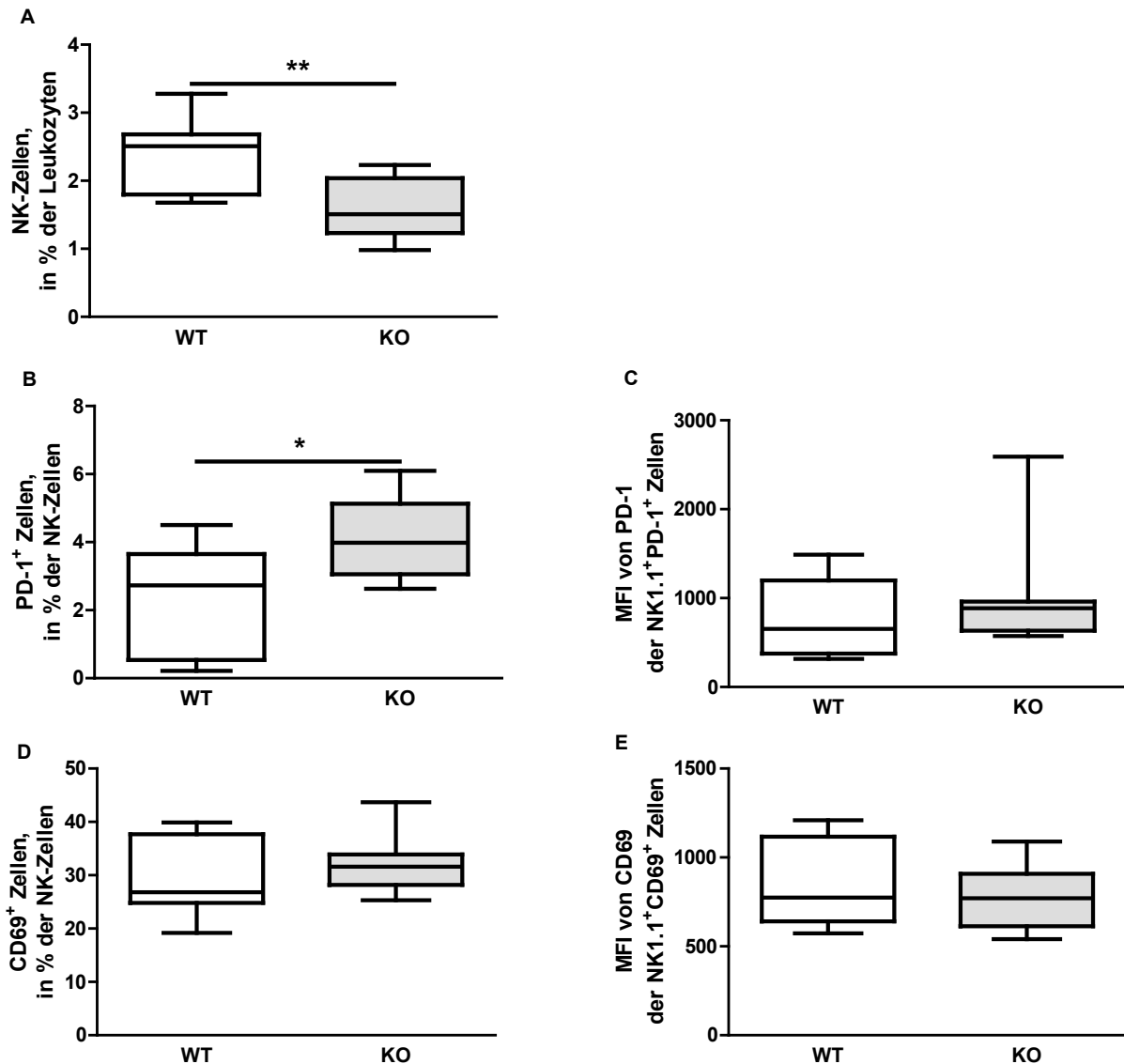


Abbildung 3.1.1-10 Quantifizierung und Charakterisierung der NK-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der NK-Zellen in Bezug auf Leukozyten. **B:** Prozentualer Anteil der PD-1⁺ Zellen in Bezug auf NK-Zellen. **C:** MFI-Wert von PD-1 der NK1.1⁺PD-1⁺ Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf NK-Zellen. **E:** MFI-Wert von CD69 der NK1.1⁺CD69⁺ Zellen. *p<0,05. **p<0,01.

3.1.1.3.2 Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen)

Betrachtet man Bild A der Abbildung 3.1.1-11, so wurde ein höherer Prozentsatz der NKT-Zellen den WT-Mäusen -verglichen mit den B7-H1 KO-Mäusen- zugeschrieben. Ein Blick auf die nächste Abbildung (Abb. 3.1.1-11 Bild B), zeigt die Untersuchung der Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 der NKT-Zellen, wobei hier keine auffallende prozentuale Abweichung zwischen den jeweiligen Mauslinien zu erkennen war. Zieht man nun den MFI-Wert von PD-1 der NKT-Zellen heran, um eine Aussage über die Abweichung in der Gesamtmenge der PD-1 Moleküle treffen

zu können, so zeigte sich eindeutig ein statistisch signifikanter Unterschied. Die B7-H1 KO-Mäuse wiesen einen deutlich höheren MFI-Wert an PD-1 als die WT-Mäuse auf (Abb. 3.1.1-11 Bild C). Bei der Betrachtung des Aktivitätsgrades der NKT-Zellen durch Verwendung des frühen Aktivierungsmarkers CD69, konnte ein bedeutend höherer prozentualer Anteil an CD69 der NKT-Zellen bei den WT-Mäusen ausgemacht werden (Abb. 3.1.1-11 Bild D). Im Gegensatz dazu zeigte der MFI-Wert von CD69 der NKT-Zellen keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien (Abb. 3.1.1-11 Bild E).

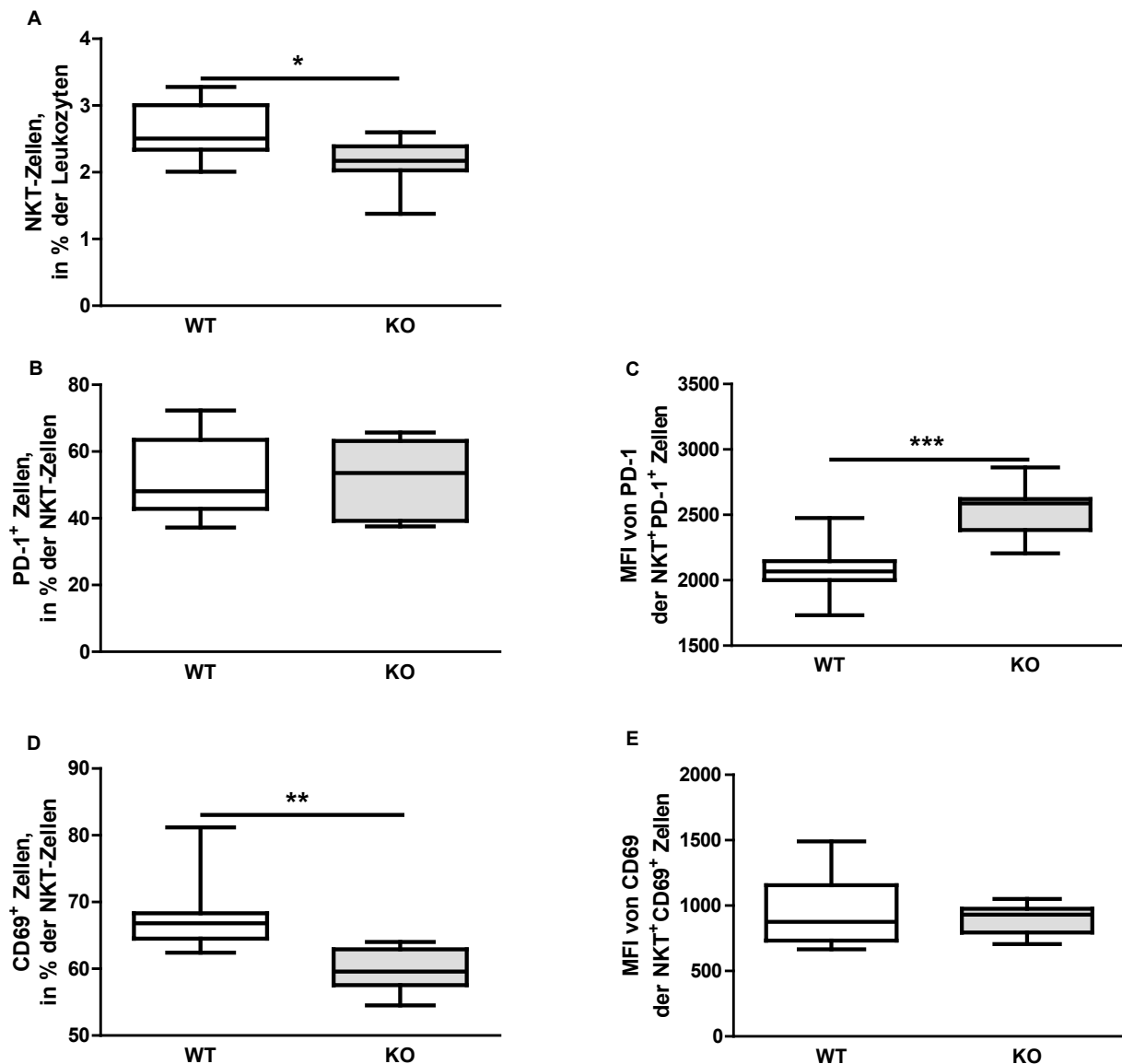


Abbildung 3.1.1-11 Quantifizierung und Charakterisierung der NKT-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der NKT-Zellen in Bezug auf Leukozyten. **B:** Prozentualer Anteil der PD-1⁺ Zellen in Bezug auf NKT-Zellen. **C:** MFI-Wert von PD-1 der NKT⁺PD-1⁺ Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf NKT-Zellen. **E:** MFI-Wert von CD69 der NKT⁺CD69⁺ Zellen. *p≤0,05. **p≤0,01. ***p≤0,001.

Im Hinblick auf die Charakterisierung der Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 auf den unterschiedlichen Immunzellen konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass die B7-H1 KO-Mäuse einen deutlich höheren Prozentsatz an PD-1 aufwiesen, als es bei den WT-Mäusen der Fall war. Einzig bei den NKT-Zellen lag der Wert von PD-1 auf einem ähnlichen prozentualen Niveau. Auch bei Betrachtung der Unterschiede in der Gesamtzahl dieser Moleküle auf den jeweiligen Zelloberflächen konnte ein signifikant höherer MFI-Wert von PD-1 den B7-H1 KO-Mäusen jeweils zugeschrieben werden.

3.2 Untersuchung der Effekte einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche von T_{reg} auf ihr Suppressionspotential

Wie bereits gezeigt werden konnte, besitzen T_{reg} ein suppressives Potential. Das B7-H1 Molekül auf der Oberfläche der T_{reg} könnte eine wichtige Rolle bei dem Suppressionspotential der T_{reg} spielen. Um die Bedeutung des B7-H1 Moleküls genauer zu untersuchen wurden im nachfolgenden Experiment T_{reg} mit dem B7-H1 Antikörper behandelt, um eine B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche der T_{reg} zu erreichen. Diese wurden dann mit Splenozyten ko-kultiviert und mit ko-kultivierten unbehandelten T_{reg} verglichen.

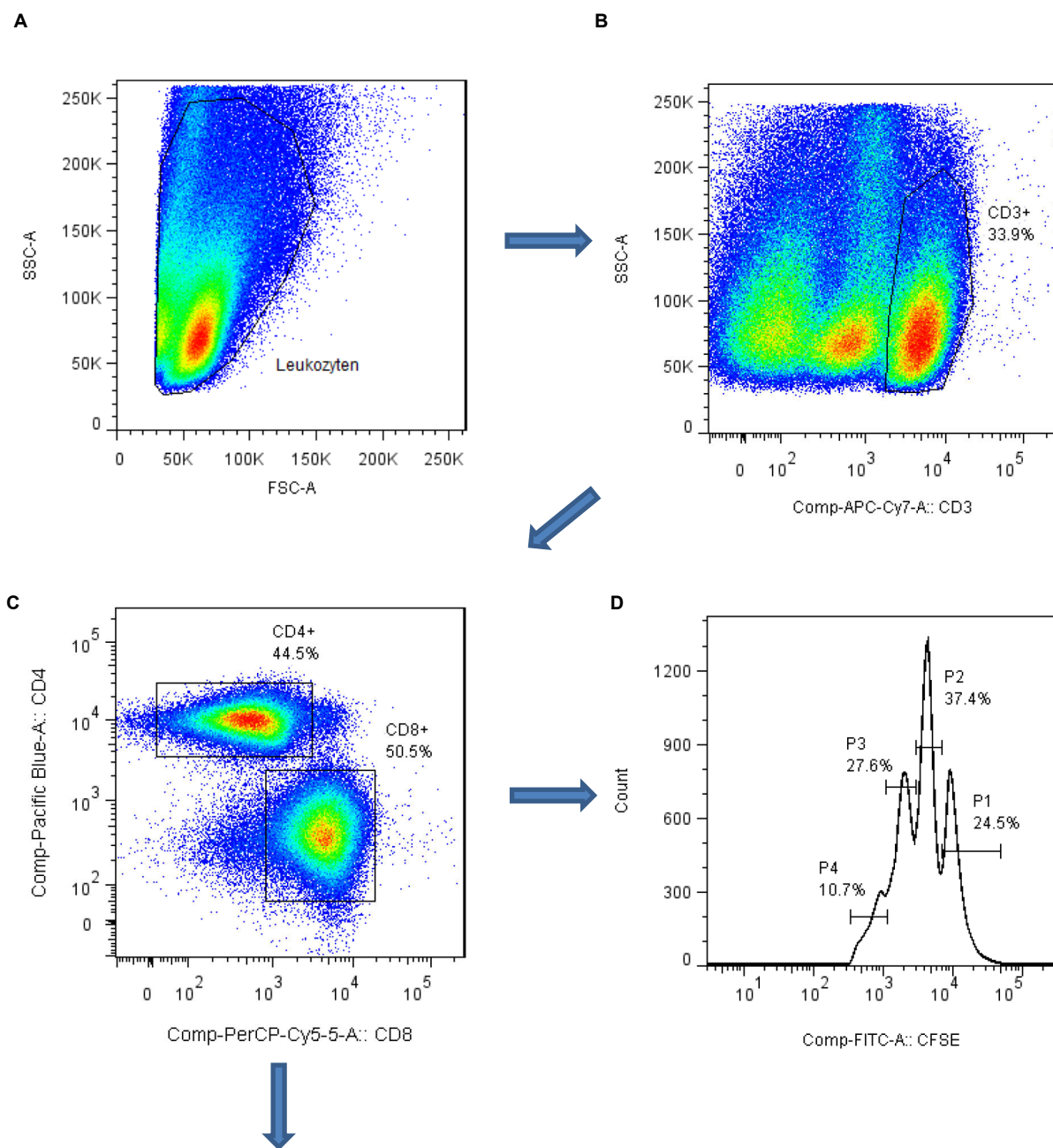
3.2.1 T_{reg} aus Splenozyten gesunder C57BL/6 WT-Mäuse

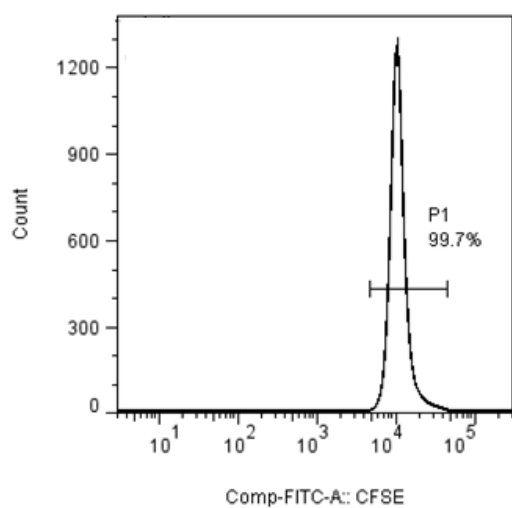
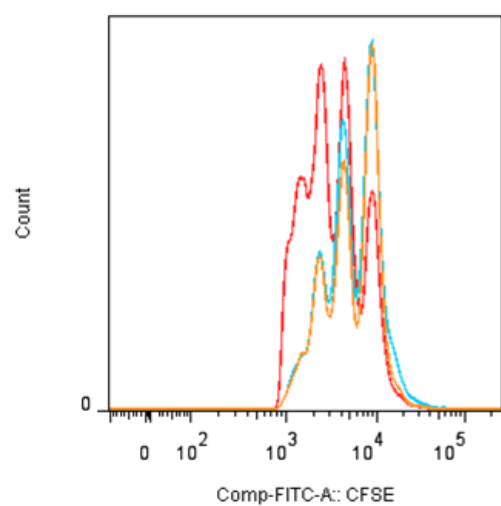
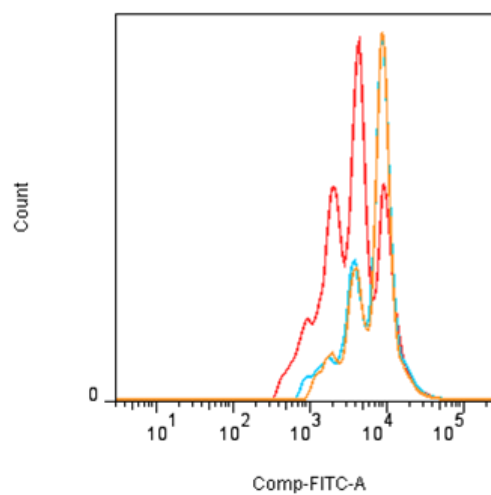
Aus den Splenozyten gesunder C57BL/6 WT-Mäuse wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und T_{reg} als Zellfraktion isoliert. Ein Teil der T_{reg} wurde mit dem B7-H1 Antikörper behandelt, wobei der andere Teil der T_{reg} unbehandelt blieb. Mithilfe des CFSE-Proliferationsfarbstoffes wurden Splenozyten markiert und sowohl einzeln ausplatziert als auch mit den T_{reg} (+/- B7-H1 Antikörper) ko-kultiviert. Dies erfolgte sowohl mit, als auch ohne Aktivierung mittels der Antikörper CD3/CD28, um den suppressiven Effekt der T_{reg} nachvollziehen zu können. Folglich ergaben sich 6 verschiedene Ansätze.

Eine Charakterisierung der $CD4^+/CD8^+$ Zellpopulationen und des suppressiven Verhaltens der T_{reg} erfolgte mit Hilfe der FACS-Analyse. Als Negativkontrollen dienten die jeweiligen FMO-Proben. Der Versuch wurde in 3 Durchläufe mit jeweils 10 gesunden, männlichen WT-Mäusen unterteilt.

3.2.1.1 Suppressionsanalyse - Auswertungsstrategie der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg}

Wie in der Auswertungsstrategie unter Abbildung 3.2.1-1 ersichtlich wird, wurden die CD3⁺ T-Zellen (Bild B) aus den Leukozyten identifiziert (Bild A), welche wiederum anhand von FSC und SSC dargestellt wurden. Aus den CD3⁺ T-Zellen konnte dann die CD4⁺/CD8⁺ Zellfraktion identifiziert werden (Abb. I.2.1.1.13.2.1-1 Bild C). Der Proliferationsstatus der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen und das dadurch bestimmte Suppressionsverhalten der T_{reg} wurde durch die Intensität der CFSE-Färbung verdeutlicht (Abb. 3.2.1-1 Bild D-H).



E**F****G**

	Proben
	Spl. A + Treg + B7-H1 Ak
	Spl. A + Treg - B7-H1 Ak
	Spl. A

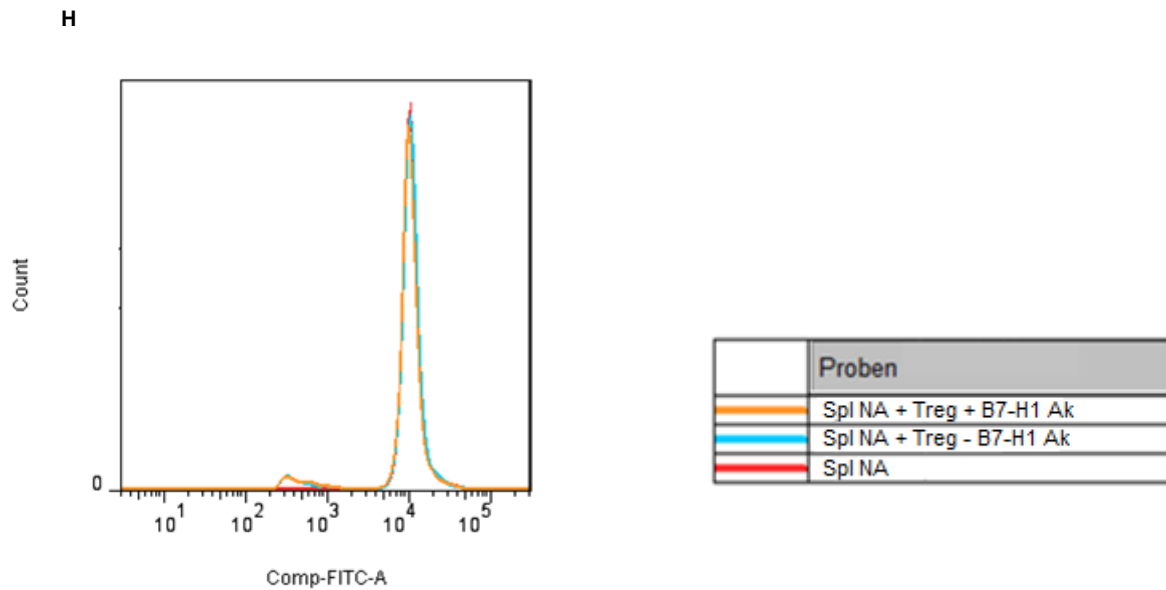


Abbildung 3.2.1-1 Auswertungsstrategie der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und ihres proliferativen Verhaltens aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse

A: Leukozyten. **B:** $CD3^+$ T-Zellen. **C:** $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen **D:** CFSE-Darstellung aktivierter Splenozyten aus $CD4^+$ T-Zellen im Histogramm. **E:** CFSE-Darstellung nicht-aktivierter Splenozyten aus $CD4^+$ T-Zellen im Histogramm. **F:** CFSE-Darstellung im overlay der aktivierten Zellfraktionen aus $CD4^+$ T-Zellen im Histogramm. **G:** CFSE-Darstellung im overlay der aktivierten Zellfraktionen aus $CD8^+$ T-Zellen im Histogramm. **H:** CFSE-Darstellung im overlay der nicht-aktivierten Zellfraktionen aus $CD4^+$ T-Zellen im Histogramm. **F/G/H:** Spl A - aktivierte Splenozyten. T_{reg} – regulatorische T-Zellen. B7-H1 Ak – B7-H1 Antikörper. Spl NA – nicht-aktivierte Splenozyten.

Die statistische Auswertung zeigt in den ersten beiden Abbildungen (Abb. 3.2.1-2 Bild A und B) den Prozentsatz aller $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen, die sich nicht geteilt hatten (Peak 1). Wie zu erwarten war, zeigten die nicht-aktivierten Splenozyten gegenüber den aktivierten Splenozyten einen hoch signifikanten Unterschied, wobei sich die aktivierte Zellfraktion bereits geteilt hatte und damit einen deutlich geringeren Prozentsatz aufwies. Vergleicht man die aktivierten Splenozyten mit den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit T_{reg} (+/- B7-H1 Antikörper), so ließ sich ein deutlich höherer Anteil nicht-geteilter $CD4^+$ T-Zellen beider Ko-Kulturen ausmachen, was für das suppressive Verhalten der T_{reg} spricht. Mit Blick auf die nicht-geteilten $CD8^+$ T-Zellen zeigte sich ein sehr ähnliches Bild, wobei bei allen aktivierten Zellfraktionen eine noch höhere Teilungsaktivität zu beobachten war.

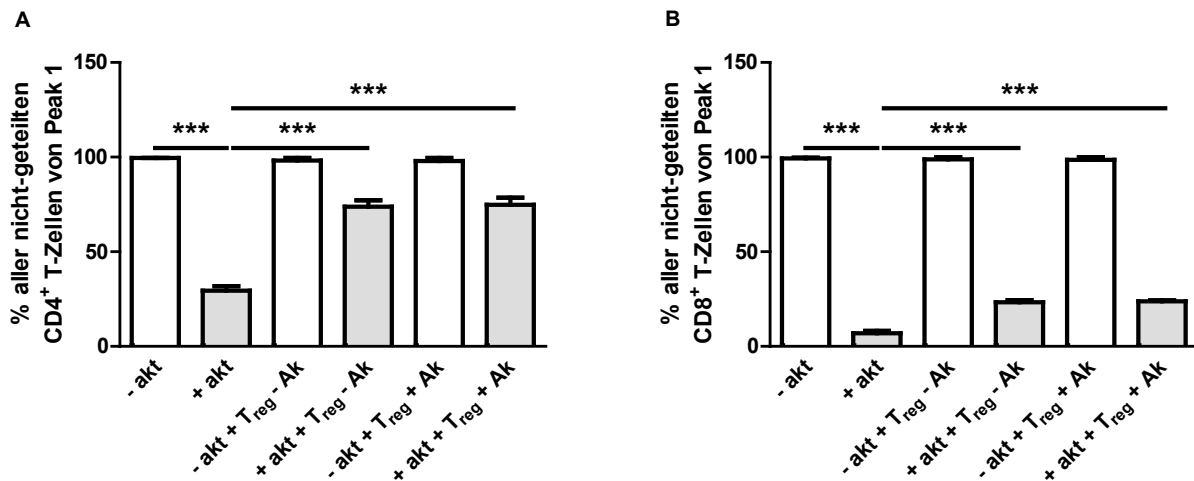


Abbildung 3.2.1-2 Quantifizierung aller nicht-geteilten CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen (Peak 1) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse

A: Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten CD8⁺ T-Zellen. ***p≤0,001.

Betrachtet man in den nächsten beiden Abbildungen (Abb. 3.2.1-3 Bild A und B) den prozentualen Anteil der teilungsaktiven CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen (Peak 2), also aller zum ersten Mal geteilten Zellen, so wurde bestätigt, dass die nicht-aktivierten Zellfraktionen keinerlei Teilungsvermögen aufwiesen. Die aktivierten Zellfraktionen hingegen zeigten einen sehr hohen Wert und damit eine hohe Teilungsaktivität. Gegenüber den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit T_{reg} (+/- B7-H1 Antikörper) wiesen die aktivierten Splenozyten einen hoch signifikanten, größeren Wert auf. Bei der Teilungsaktivität der CD8⁺ T-Zellen konnte nur ein deutlicher Unterschied zwischen den aktivierten und den nicht-aktivierten Splenozyten bestätigt werden.

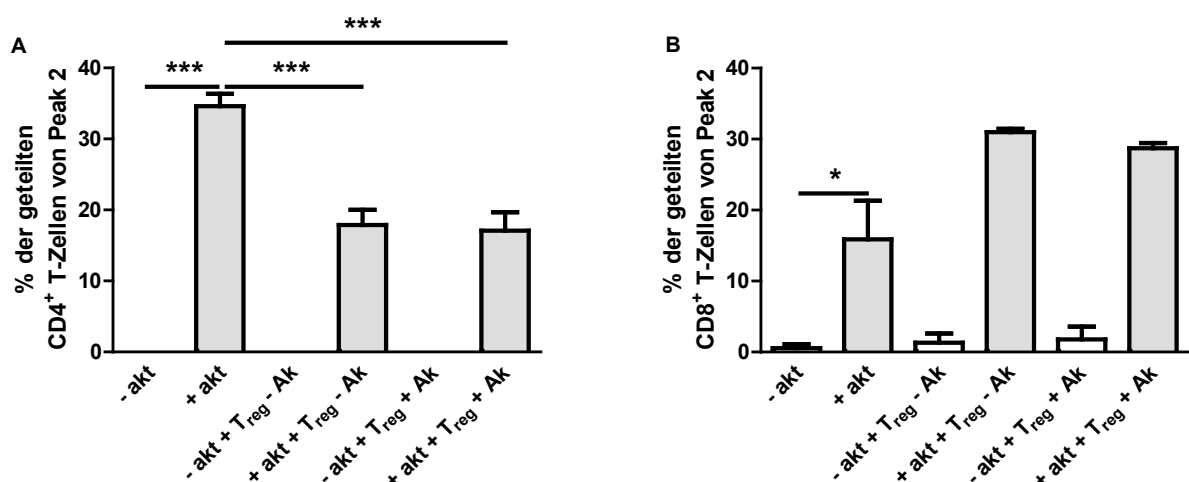


Abbildung 3.2.1-3 Quantifizierung aller zum ersten Mal geteilten CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen (Peak 2) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse

A: Prozentualer Anteil aller erstmalig geteilten CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil aller erstmalig geteilten CD8⁺ T-Zellen.

*p≤0,05. ***p≤0,001.

Im Hinblick auf den CFSE-Peak 3 und 4 der $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 3.2.1-4 Bild A-D), wurde abermals das Proliferationsverhalten der aktivierten Zellfraktionen bestätigt. Auch hier konnte eine Suppression der proliferierenden Splenozyten durch die T_{reg} festgestellt werden. Der Peak 3 der $CD8^+$ T-Zellen wies keine deutliche Differenz auf. Bei Peak 4 der $CD8^+$ T-Zellen war ein signifikanter Unterschied zwischen den aktivierten Splenozyten zu den nicht-aktivierten und zwischen den aktivierten Splenozyten zu den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit T_{reg} (+/- B7-H1 Antikörper) zu verzeichnen.

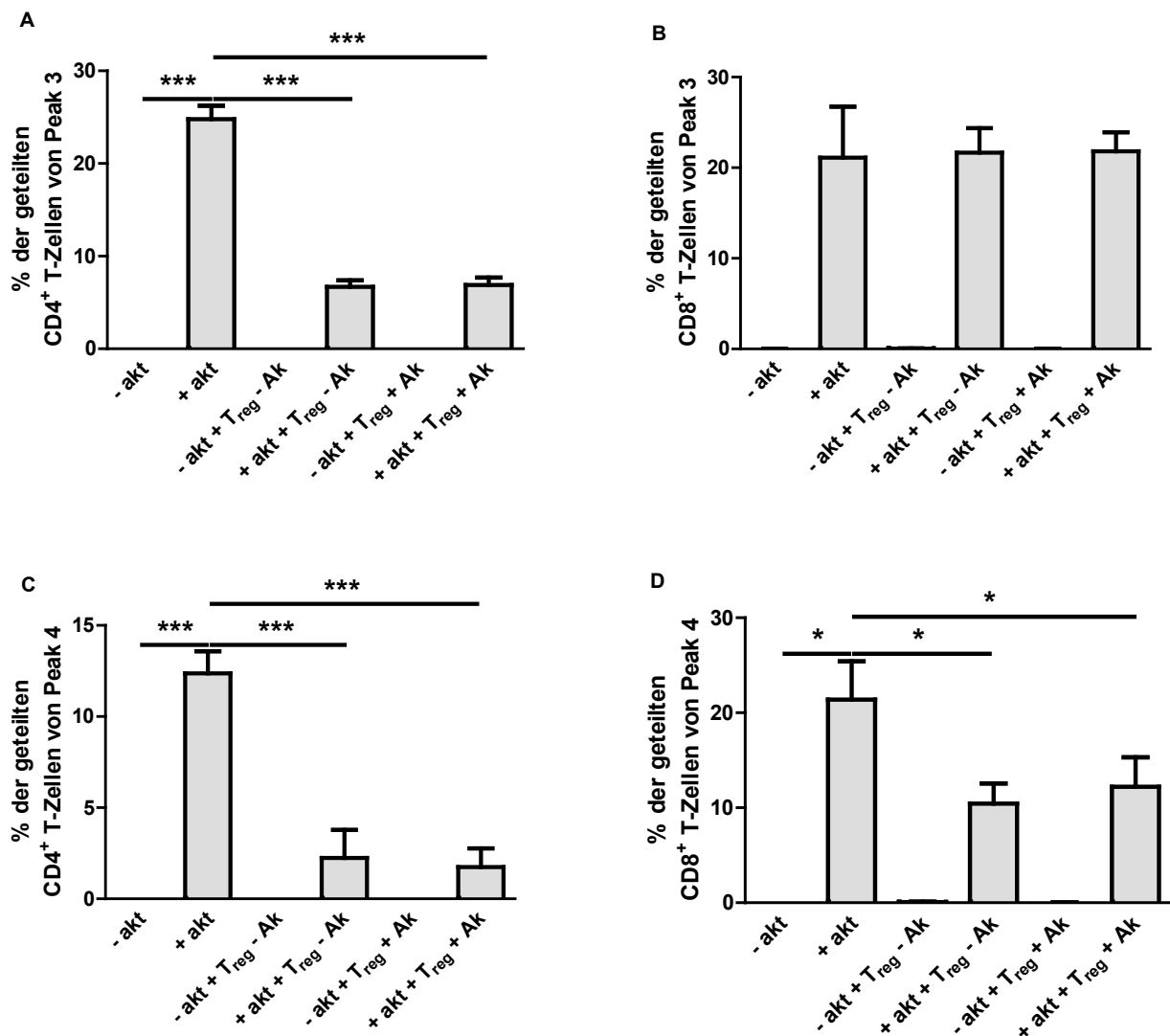


Abbildung 3.2.1-4 Quantifizierung aller zum zweiten und dritten Mal geteilten $CD4^+$ / $CD8^+$ T-Zellen (Peak 3 und 4) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse

A: Prozentualer Anteil aller zum zweiten Mal geteilten $CD4^+$ T-Zellen, Peak 3. **B:** Prozentualer Anteil aller zum zweiten Mal geteilten $CD8^+$ T-Zellen, Peak 3. **C:** Prozentualer Anteil aller zum dritten Mal geteilten $CD4^+$ T-Zellen, Peak 4. **D:** Prozentualer Anteil aller zum dritten Mal geteilten $CD8^+$ T-Zellen, Peak 4. * $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$.

Diese Auswertung der einzelnen Peaks zeigte, dass bei der Zugabe von T_{reg} zu den Splenozyten das Teilungsvermögen sowohl der $CD4^+$ als auch der $CD8^+$ T-Zellen abnahm. Dieses Verhalten bestätigt das suppressive Potential der T_{reg} , jedoch konnte kein signifikanter Unterschied bei einer B7-H1-Ausschaltung im Vergleich zu keiner B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche von T_{reg} beobachtet werden.

3.2.1.2 Weitere Auswertungen der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg}

Um den Aktivierungsgrad der $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen zu verdeutlichen, wurde der frühe Aktivierungsmarker CD69 verwendet (Abb. 3.2.1-5 Bild A). Zusätzlich wurden die $CD8^+$ T-Zellen auf ihren prozentualen Anteil von CD25 untersucht (Abb. 3.2.1-5 Bild B).

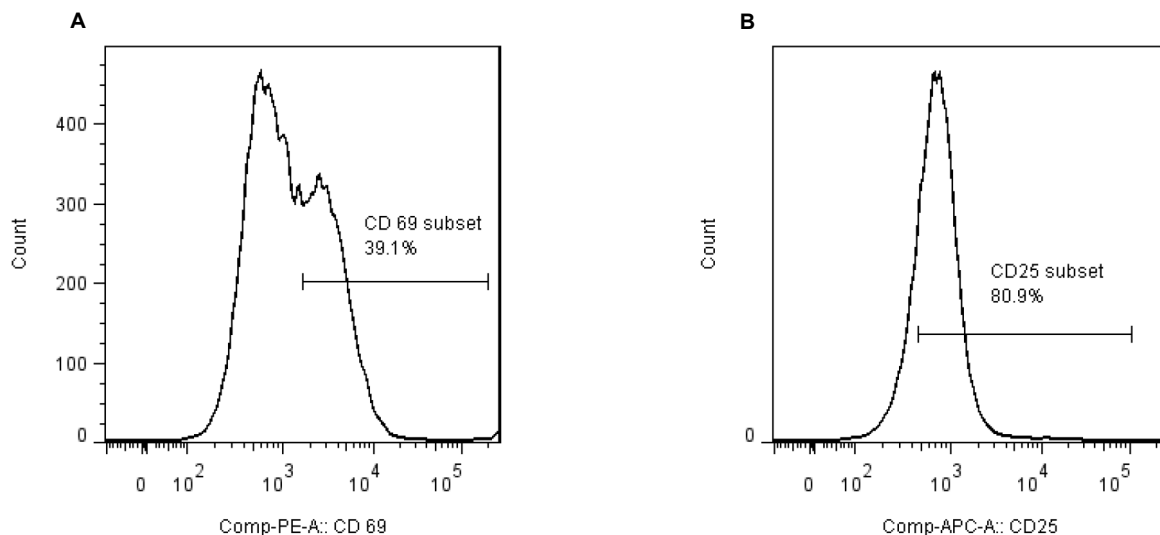


Abbildung 3.2.1-5 Auswertungsstrategie der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse

A: Darstellung der $CD8^+CD69^+$ T-Zellen aus aktivierten Splenozyten im Histogramm. **B:** Darstellung der $CD8^+CD25^+$ T-Zellen aus aktivierten Splenozyten im Histogramm.

Der Aktivitätsstatus der $CD4^+$ T-Zellen wurde durch Verwendung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 bestimmt (Abb. 3.2.1-6 Bild A). Wie zu erwarten, proliferierten die durch CD3/CD28 aktivierten Zellpopulationen gegenüber den nicht-aktivierten Zellpopulationen deutlich, womit sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ergab. Auch bei Betrachtung des Aktivierungsgrades der $CD8^+$ T-Zellen mithilfe des Markers CD69 wurden die gleichen Erwartungen bestätigt und ein deutlicher Unterschied im Proliferationsgrad zwischen den aktivierten und den nicht-aktivierten Zellfraktionen festgestellt (Abb. 3.2.1-6 Bild B). Bei den $CD8^+$ T-Zellen

wurde zusätzlich ein Augenmerk auf den prozentualen Anteil von CD25 gelegt. Alle aktivierten Zellfraktionen wiesen einen höheren prozentualen Anteil an CD8⁺CD25⁺ T-Zellen gegenüber den jeweiligen nicht-aktivierten Zellfraktionen auf, wobei hier der größte und signifikanteste Unterschied zwischen den aktivierten und den nicht-aktivierten Splenozyten nachgewiesen wurde (Abb. 3.2.1-6 Bild C). In Anbetracht der Verwendung des B7-H1 Antikörpers und damit der Ausschaltung des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche der T_{reg}, konnte kein signifikanter Unterschied im suppressiven Verhalten der T_{reg} im Vergleich zu keiner B7-H1-Ausschaltung festgestellt werden.

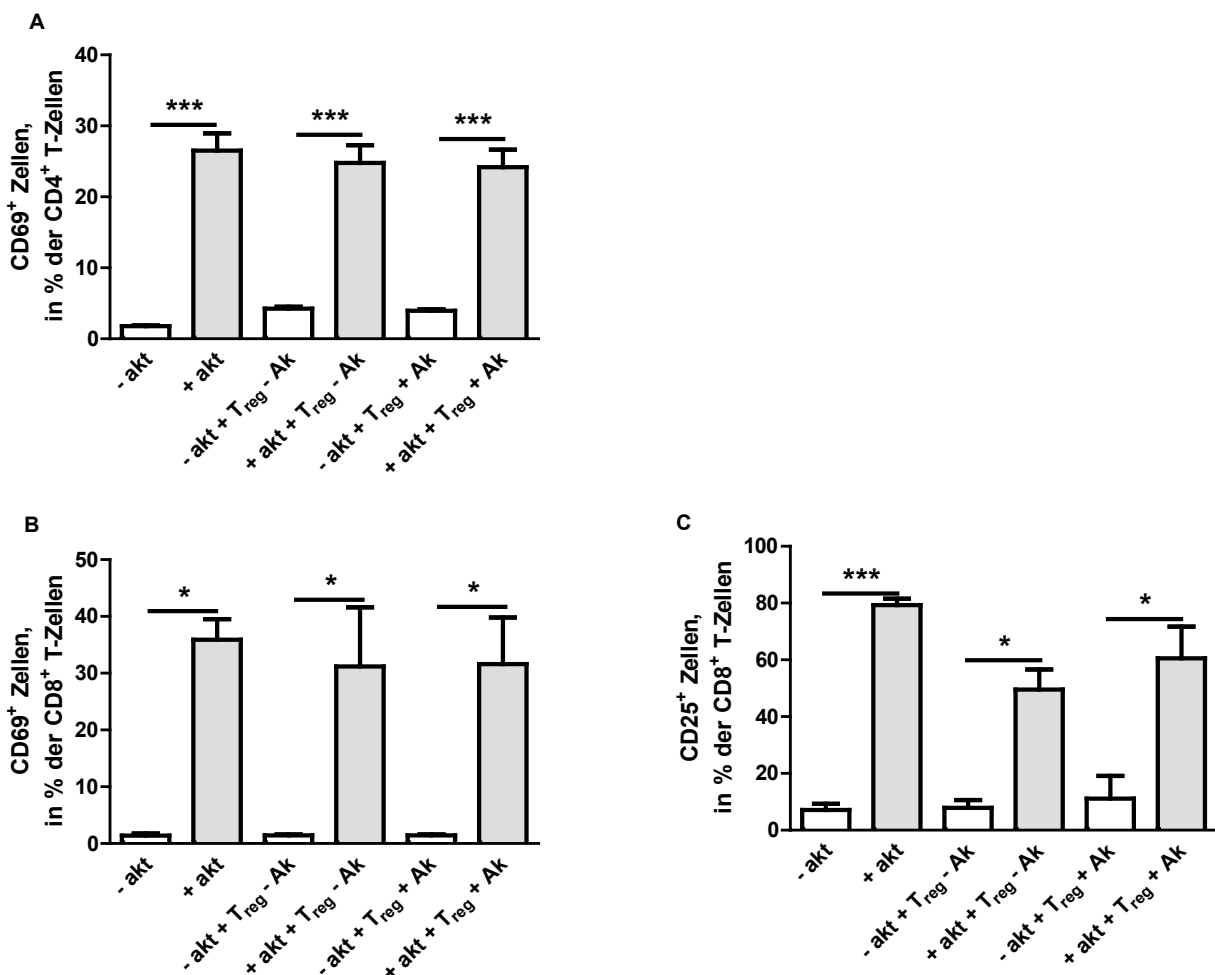


Abbildung 3.2.1-6 Quantifizierung und Charakterisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. **C:** Prozentualer Anteil der CD25⁺ Zellen in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. *p<0,05. ***p<0,001.

3.3 Untersuchung der Effekte einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche von MDSC auf ihr Suppressionspotential

In diesem Experiment sollte auf dem Wissen basierend, dass MDSC ein suppressives Potential zeigen, ihr Suppressionsvermögen auf CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Um die Auswirkungen, die dabei das B7-H1 Molekül mit sich bringt, zu untersuchen, wurde durch Verwendung des B7-H1 Antikörpers eine Ausschaltung dieses Moleküls auf der Oberfläche der MDSC erzielt. Das ganze erfolgte vergleichend mit unbehandelten MDSC. Die MDSC wurden dann jeweils mit Splenozyten ko-kultiviert.

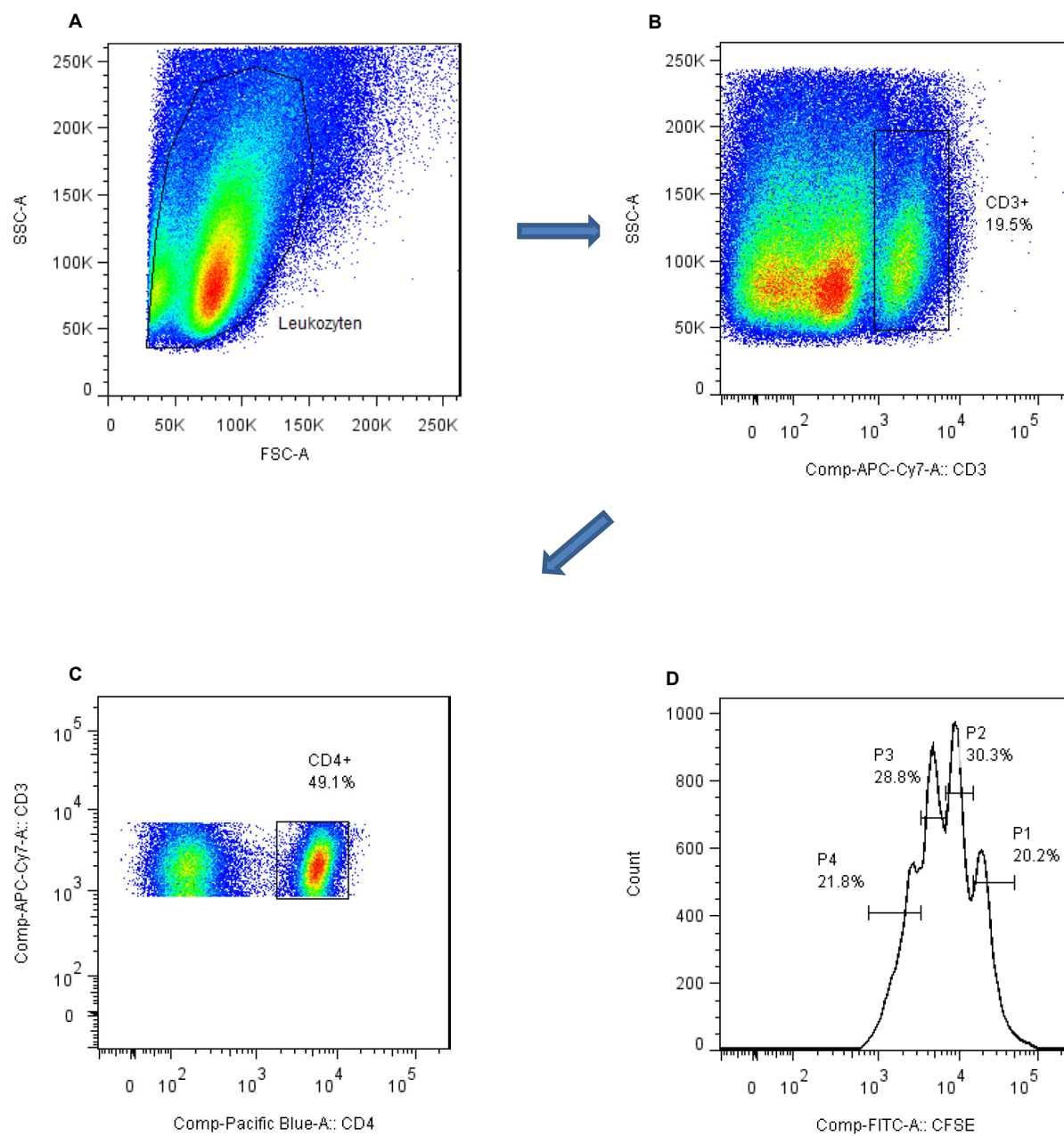
3.3.1 Vergleich zwischen MDSC aus Tumoren und Knochenmark

Im ersten Teil dieses Experiments sollte das immunsuppressive Potential der MDSC aus Tumoren mit MDSC aus dem Knochenmark verglichen werden. Hierfür wurden aus tumortragenden, männlichen C57BL/6 WT-Mäusen sowohl die Primärtumoren, als auch das Knochenmark der Hinterextremitäten isoliert, daraus jeweils Einzelzellsuspensionen hergestellt und MDSC als Zellfraktion isoliert. Des Weiteren wurden die Milzen isoliert und daraus eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Splenozyten wurden mit dem CFSE-Farbstoff markiert und mit den jeweiligen MDSC ko-kultiviert. Zusätzlich erfolgte bei einem Teil der Zellen eine Aktivierung mit den CD3/CD28 Antikörpern. Dies ergab insgesamt 6 verschiedene Ansätze.

Eine Charakterisierung der Zellen erfolgte mittels der FACS-Analyse. Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen FMO-Proben herangezogen. Der Versuch wurde in zwei Durchläufe mit jeweils 10 tumortragenden, männlichen WT-Mäusen unterteilt.

3.3.1.1 Auswertungsstrategie

Anhand von FSC und SSC wurden zuerst die Leukozyten dargestellt, woraus anschließend alle CD3⁺ T-Zellen identifiziert wurden (Abb. 3.3.1-1 Bild A und B). Aus dieser Zellpopulation ließen sich alle CD4⁺ T-Zellen darstellen, worauf dann der Proliferationsstatus durch die CFSE-Färbung im Histogramm zu sehen war (Abb. 3.3.1-1 Bild C-F).



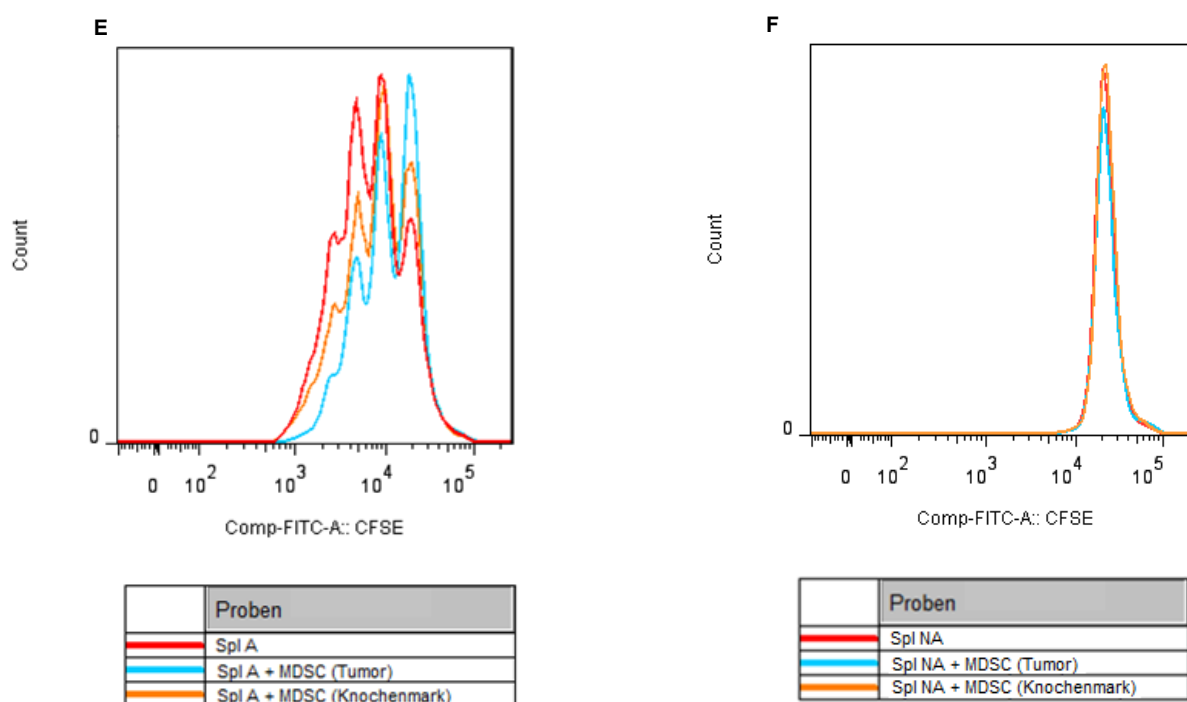
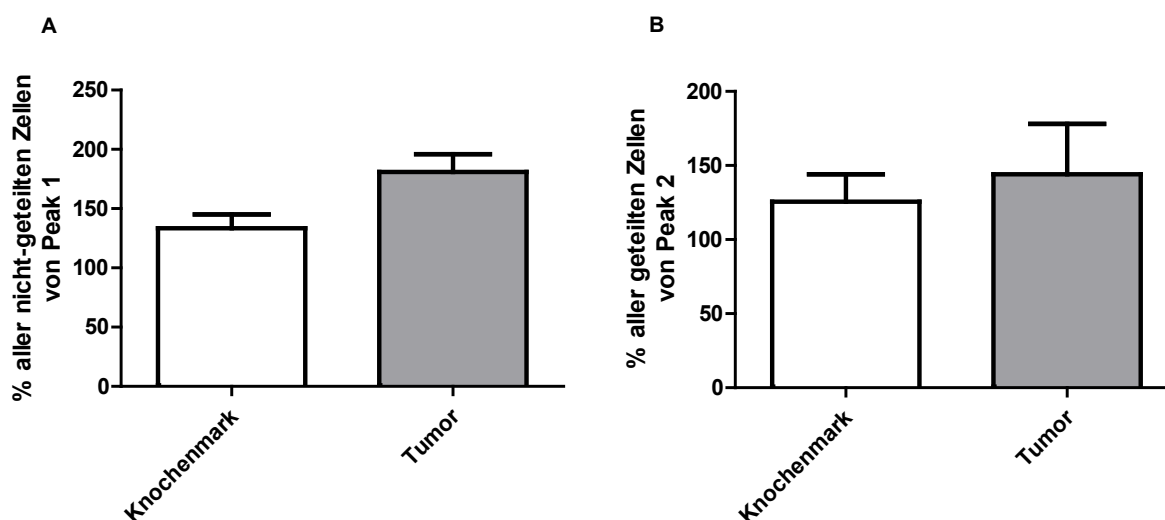


Abbildung 3.3.1-1 Auswertungsstrategie der CD4⁺ T-Zellen und des suppressiven Verhaltens der MDSC aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse

A: Leukozyten. **B:** CD3⁺ T-Zellen. **C:** CD4⁺ T-Zellen **D:** CFSE-Darstellung der aktivierten Splenozyten aus CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **E:** CFSE-Darstellung im overlay der aktivierten Zellfraktionen im Histogramm aus CD4⁺ T-Zellen. **F:** CFSE-Darstellung im overlay der nicht-aktivierten Zellfraktionen im Histogramm aus CD4⁺ T-Zellen. **E/F:** Spl A – aktivierte Splenozyten. Spl NA – nicht-aktivierte Splenozyten. MDSC – Myeloid derived suppressor cells.

Wie die statistische Auswertung zeigt, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem suppressiven Verhalten der MDSC aus den Tumoren und dem Knochenmark (Abb. 3.3.1-2 Bild A-C). Aus diesem Grund wurde entschieden, MDSC für die weiteren Versuche aus Tumoren zu isolieren.



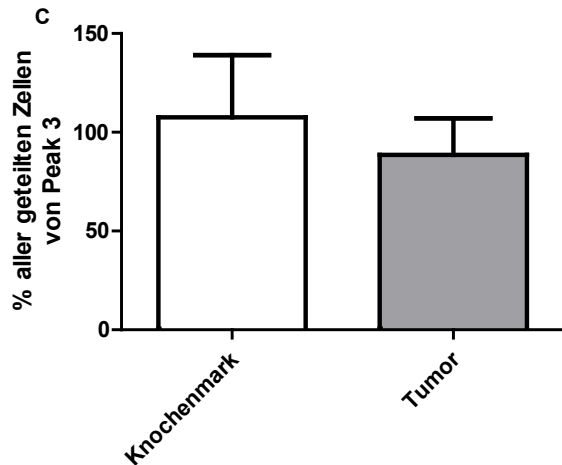


Abbildung 3.3.1-2 Quantifizierung der geteilten bzw. nicht-geteilten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC in Gegenüberstellung der MDSC aus Tumoren und aus Knochenmark

A: Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten Zellen, Peak 1. **B:** Prozentualer Anteil aller zum ersten Mal geteilten Zellen, Peak 2.

C: Prozentualer Anteil aller zum zweiten Mal geteilten Zellen, Peak 3.

3.3.2 MDSC aus Tumoren von C57BL/6 WT-Mäusen

Im nachfolgenden Experiment wurden die Milzen und Tumoren aus WT-Mäusen isoliert und daraus jeweils Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aus den Tumoren wurden MDSC als Zellfraktion isoliert und teilweise mit dem B7-H1 Antikörper behandelt. Der andere Teil der MDSC blieb unbehandelt. Die Einzelzellsuspension der Splenozyten wurde mit dem CFSE-Proliferationsfarbstoff versetzt. Anschließend wurden die Splenozyten sowohl einzeln, als auch in Ko-Kultur mit den MDSC (+/- B7-H1 Antikörper) ausplatziert. Zuletzt erfolgte eine Aktivierung der Zellen mittels der Antikörper CD3/CD28, im Vergleich zu keiner Aktivierung. Daraus ergaben sich insgesamt 6 verschiedene Ansätze.

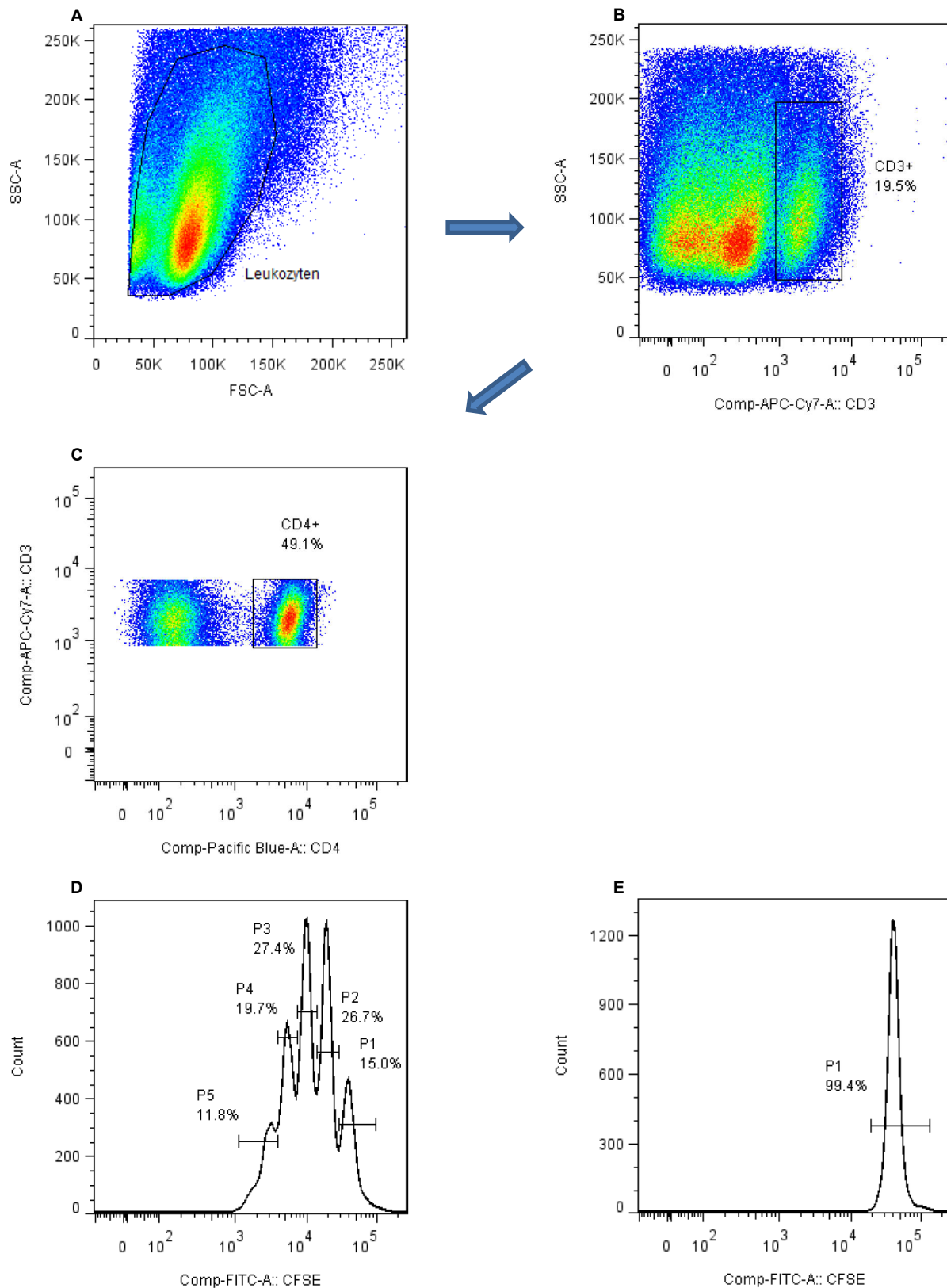
Eine Phänotypisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe der FACS-Analyse. Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen FMO Proben herangezogen. Der Versuch wurde in vier Durchläufe unterteilt mit jeweils 12 tumortragenden, männlichen WT-Mäusen.

3.3.2.1 Auswertungsstrategie der CD3⁺ und CD4⁺ T-Zellen

Anhand von FSC und SSC wurden zuerst die Leukozyten dargestellt, woraus anschließend alle CD3⁺ T-Zellen identifiziert werden konnten. Aus dieser Zellpopulation ließen sich alle CD4⁺ T-Zellen darstellen. Der Proliferationsstatus der

CD4⁺ T-Zellen und das Suppressionsverhalten der MDSC wurde durch die Intensität der CFSE-Färbung bestimmt.

Die folgenden Abbildungen zeigen ein sog. *overlay*, also eine Überlagerung der unterschiedlich aktivierten bzw. nicht-aktivierten Zellpopulationen.



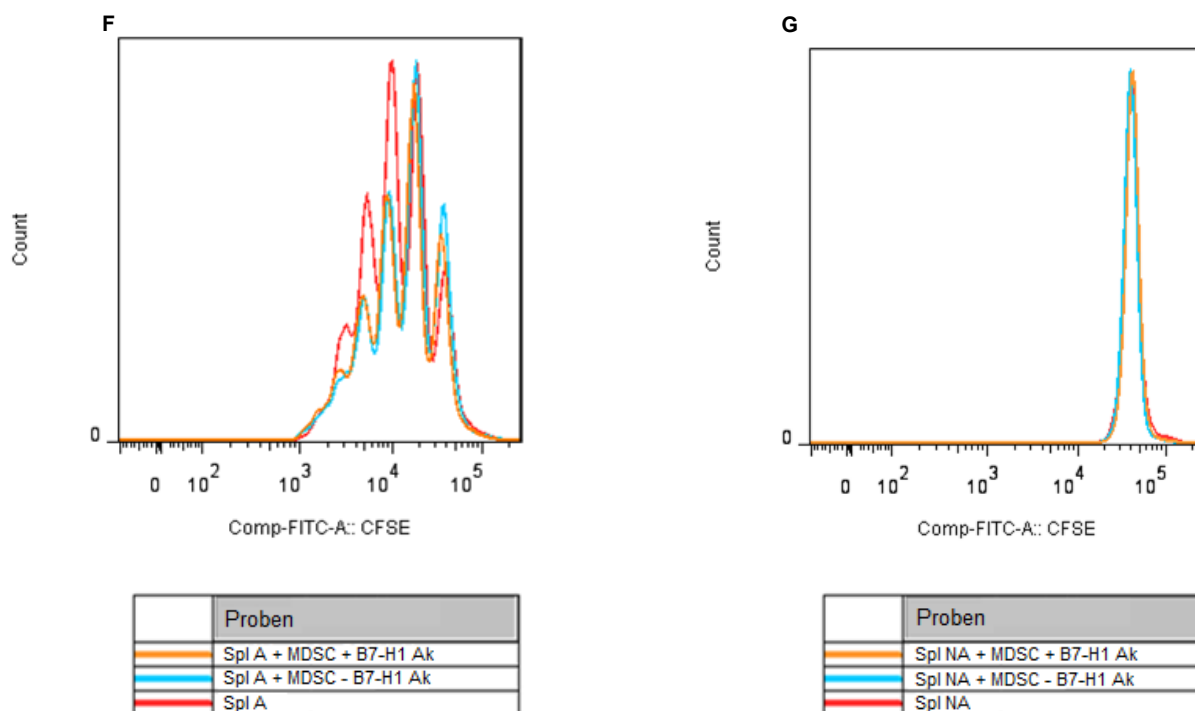
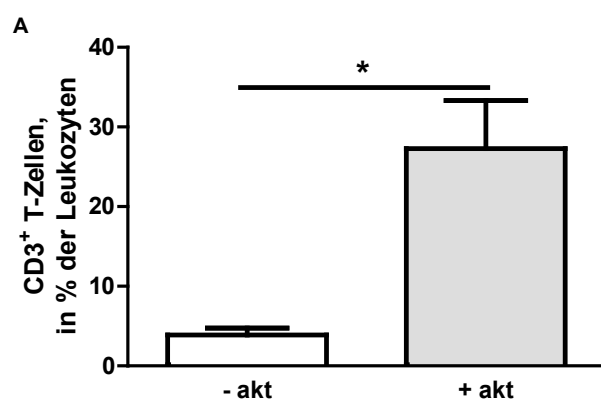


Abbildung 3.3.2-1 Auswertungsstrategie der CD4⁺ T-Zellen und des proliferativen Verhaltens im Histogramm aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse

A: Leukozyten. **B:** CD3⁺ T-Zellen. **C:** CD4⁺ T-Zellen. **D:** CFSE-Darstellung aktivierter Splenozyten aus CD4⁺ T-Zellen. **E:** CFSE-Darstellung nicht-aktivierter Splenozyten aus CD4⁺ T-Zellen. **F:** CFSE-Darstellung im overlay der aktivierten Zellfraktionen aus CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **G:** CFSE-Darstellung im overlay der nicht-aktivierten Zellfraktionen aus CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **F/G:** Spl A – aktivierte Splenozyten. MDSC – Myeloid derived suppressor cells. B7-H1 Ak – B7-H1 Antikörper. Spl NA – nicht-aktivierte Splenozyten.

Bei der Beurteilung des prozentualen Anteils der CD3⁺ T-Zellen bezogen auf die Leukozyten, war ein signifikanter Unterschied und höherer Wert aller aktivierten, im Gegensatz zu allen nicht-aktivierten Zellen festzustellen (Abb. 3.3.2-2 Bild A). Betrachtet man im Einzelnen die nicht-aktivierten Zellfraktionen (Splenozyten +/- MDSC, +/- B7-H1 Antikörper) und die aktivierten Zellfraktionen untereinander, so wurde kein deutlicher Unterschied im prozentualen Anteil der CD3⁺ T-Zellen aus den Leukozyten nachgewiesen (Abb. 3.3.2-2 Bild B und C).



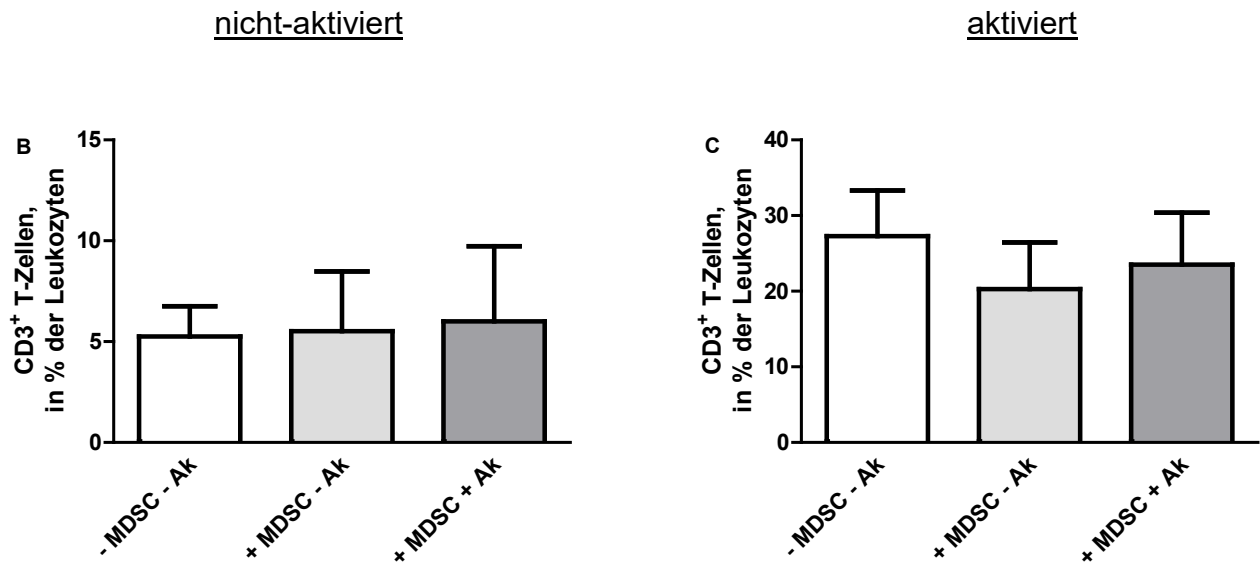
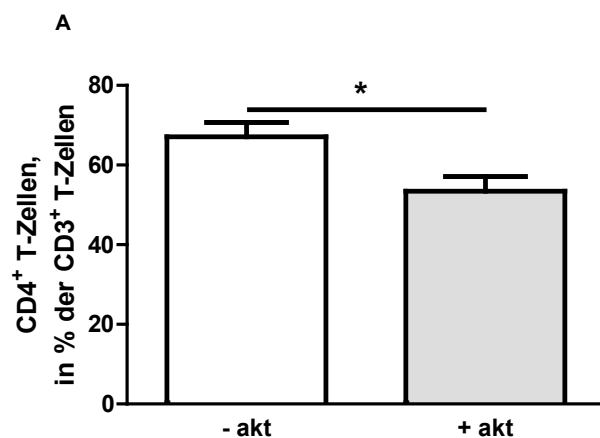


Abbildung 3.3.2-2 Quantifizierung der CD3⁺ T-Zellen aus den Leukozyten aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der CD3⁺ T-Zellen in Bezug auf die Leukozyten. **B:** Prozentualer Anteil der CD3⁺ T-Zellen in Bezug auf die Leukozyten, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil der CD3⁺ T-Zellen in Bezug auf die Leukozyten, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. *p≤0,05.

Im Hinblick auf die CD4⁺ Zellfraktion und ihrem prozentualen Anteil der CD3⁺ T-Zellen, zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den in ihrer Gesamtheit aktivierten und nicht-aktivierten Zellpopulationen (Abb. 3.3.2-3 Bild A). Die nicht-aktivierten Zellen wiesen insgesamt einen höheren Anteil an CD4⁺ T-Zellen auf, als die aktivierten. Vergleicht man sowohl die nicht-aktivierten Zellfraktionen untereinander, als auch die aktivierten Zellfraktionen, so war abermals keine deutliche Abweichung zu verzeichnen (Abb. 3.3.2-3 Bild B und C).



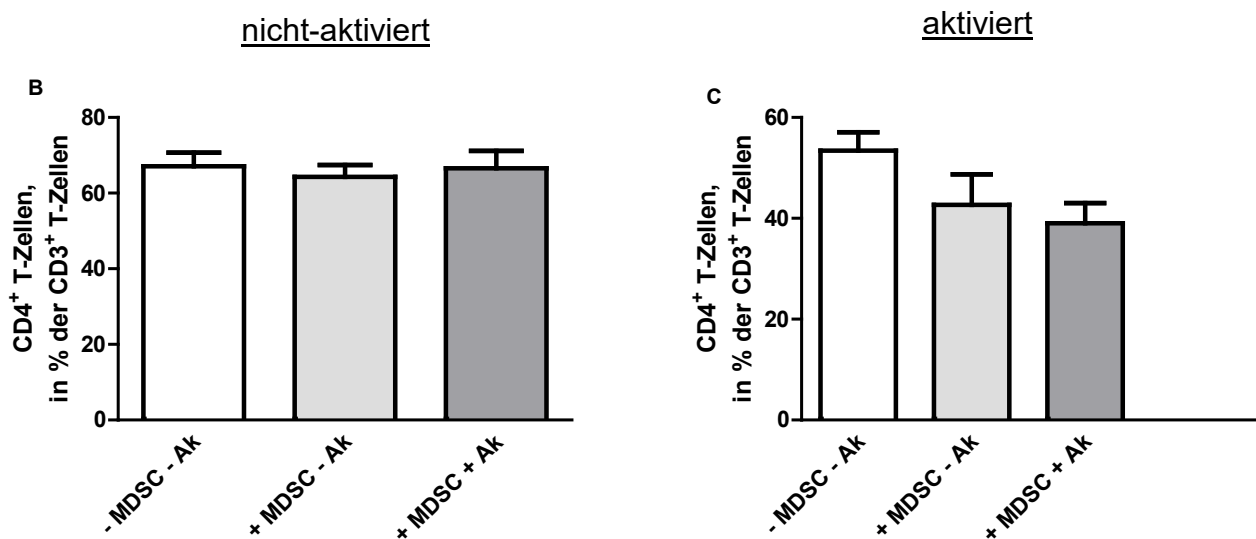


Abbildung 3.3.2-3 Quantifizierung der CD4⁺ T-Zellen aus den CD3⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der CD4⁺ T-Zellen in Bezug auf die CD3⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der CD4⁺ T-Zellen in Bezug auf die CD3⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil der CD4⁺ T-Zellen in Bezug auf die CD3⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. *p≤0,05.

Wie zu erwarten war, zeigte der durch Verwendung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 dargestellte Aktivierungsstatus der CD4⁺ T-Zellen eine hoch signifikante Abweichung (Abb. 3.3.2-4 Bild A). Die durch CD3/CD28 aktivierten Zellen wiesen einen sehr viel höheren Prozentsatz an CD4⁺CD69⁺ T-Zellen auf, als die nicht-aktivierten. Im Hinblick auf den prozentualen Vergleich aller nicht-aktivierten CD4⁺CD69⁺ T-Zellen untereinander, wurde ein größerer Wert der nicht-aktivierten Splenozyten im Vergleich zu den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (+/- B7-H1 Antikörper) festgestellt (Abb. 3.3.2-4 Bild B). Dies verdeutlicht das suppressive Potential, welches den MDSC zugeschrieben wird, selbst wenn die MDSC zu nicht-aktivierten Splenozyten zugegeben wurden. Die B7-H1-Ausschaltung durch Zugabe des B7-H1 Antikörpers hatte keine Auswirkungen auf das suppressive Potential der MDSC. Bei Betrachtung aller aktivierten CD4⁺CD69⁺ T-Zellen im Vergleich fiel keine bedeutende Abweichung auf (Abb. 3.3.2-4 Bild C).

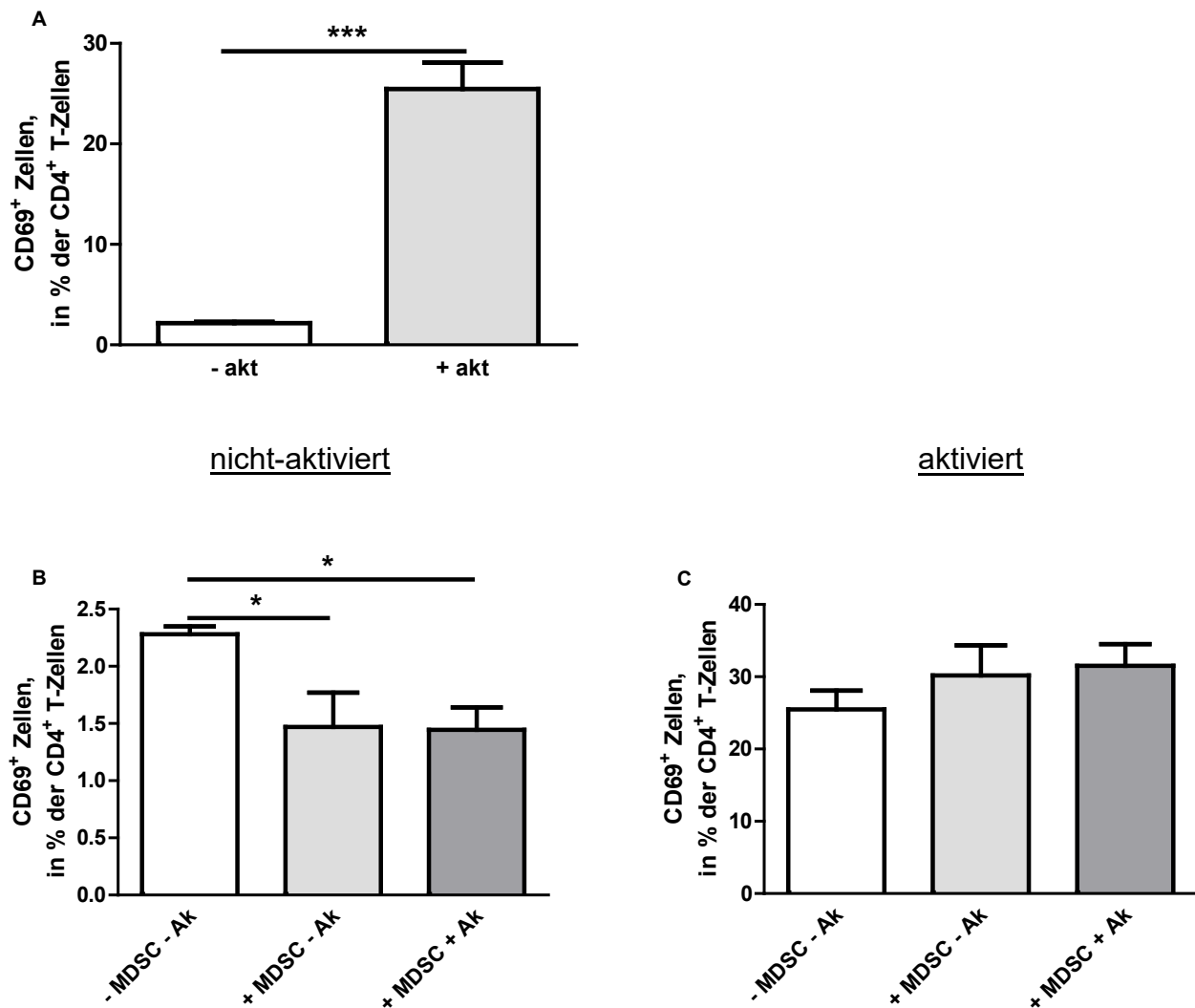


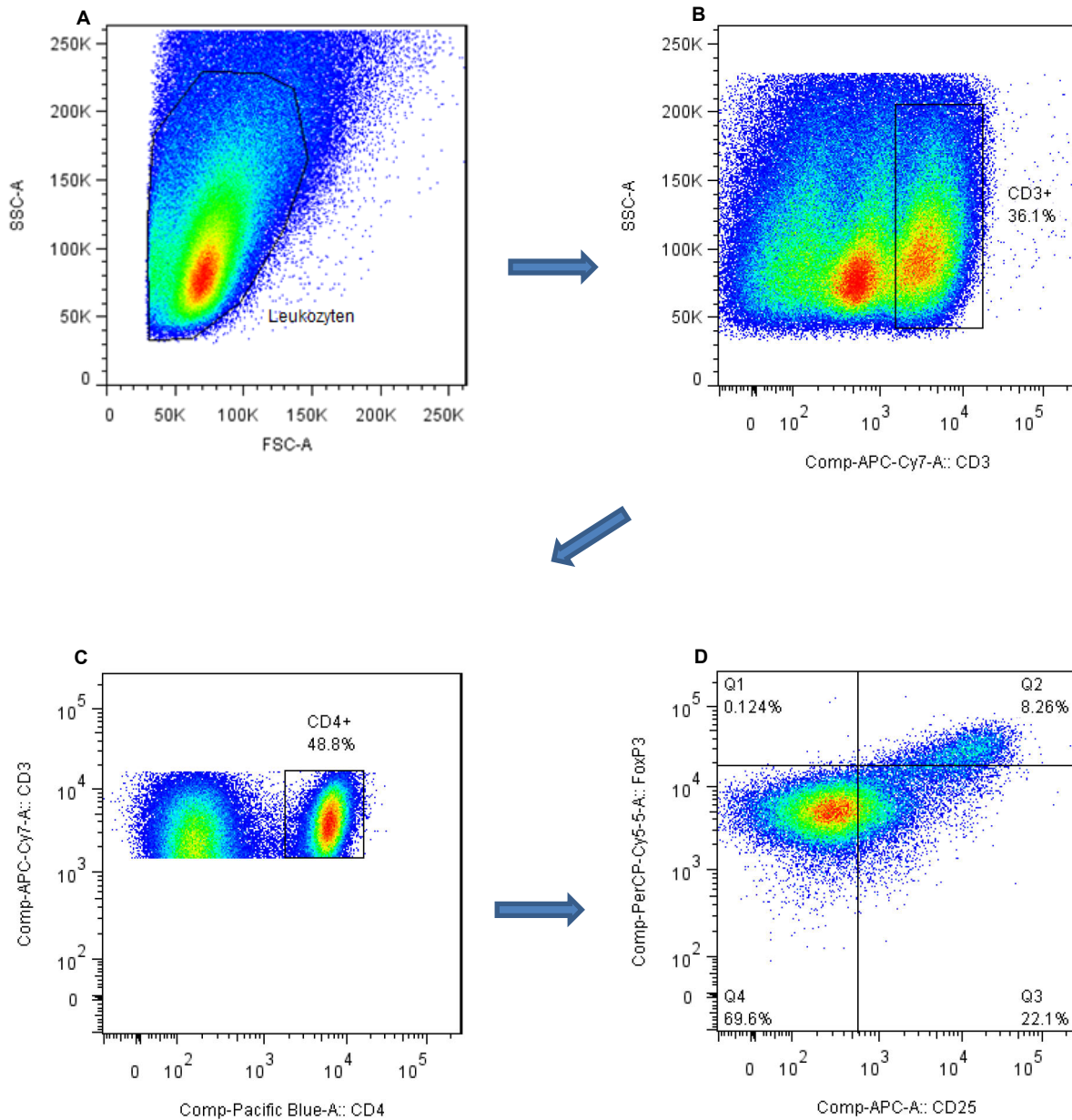
Abbildung 3.3.2-4 Quantifizierung der CD69⁺ Zellen aus den CD4⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse

A: Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf die CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf die CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ T-Zellen in Bezug auf die CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. *p≤0,05. ***p≤0,001.

3.3.2.2 Untersuchung der Effekte von MDSC auf T_{reg}, T_{con}, T_{con} aktiviert und CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ Zellen

Des Weiteren wurden die Effekte der MDSC auf T_{reg}, T_{con}, T_{con} aktiviert und CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ Zellen untersucht. Hierfür wurden mittels FSC und SSC die Leukozyten dargestellt und hieraus wiederum alle CD3⁺ T-Zellen abgebildet (Abb. 3.3.2-5 Bild A und B). Aus der CD3⁺ Zellfraktion wurden danach die CD4⁺ T-Zellen identifiziert (Abb. 3.3.2-5 Bild C). Aus diesen konnten mit Hilfe der Marker CD25 und FoxP3 die Zellpopulationen (T_{reg}, T_{con}, T_{con} aktiviert und CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ Zellen) in

vier Quadranten geteilt dargestellt werden (Abb. 3.3.2-5 Bild D). Als Negativkontrollen dienten die jeweiligen FMO-Proben (Abb. 3.3.2-5 Bild E und F).



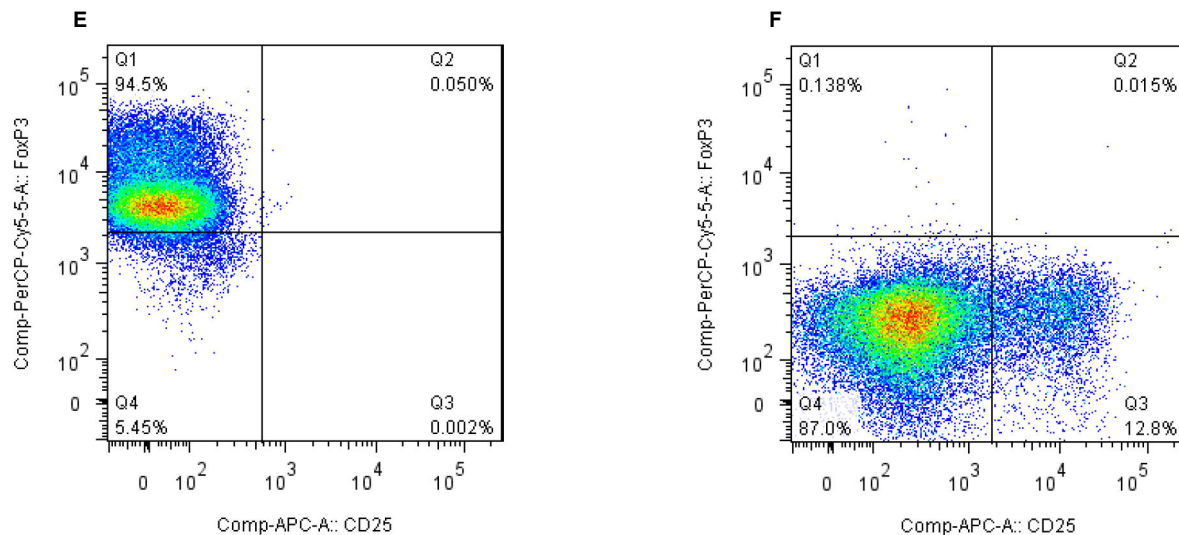


Abbildung 3.3.2-5 Auswertungsstrategie der T_{reg} , T_{con} , T_{con} aktiviert und der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen aus der Ko-Kultur mit Splenozyten und MDSC tumortragender WT-Mäuse

A: Leukozyten. B: $CD3^+$ T-Zellen. C: $CD4^+$ T-Zellen. D: Q1: $CD25^+FoxP3^+$, Q2: $CD25^+FoxP3^+$ (T_{reg}), Q3: $CD25^+FoxP3^-$ (T_{con} aktiviert), Q4: $CD25^+FoxP3^-$ (T_{con}). E: FMO-Probe von CD25. F: FMO-Probe von FoxP3.

3.3.2.2.1 T_{reg} , $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen

Im Folgenden sollte das Verhalten der MDSC auf T_{reg} untersucht werden. Dabei zeigte sich wie zuvor schon beschrieben ein ähnliches Muster: Es konnte ein deutlicher Unterschied und damit höherer Prozentsatz der T_{reg} gemessen an den $CD4^+$ T-Zellen aller aktivierten Zellfraktionen im Vergleich zu den nicht-aktivierten festgestellt werden (Abb. 3.3.2-6 Bild A). Betrachtet man die nicht-aktivierten Zellpopulationen im Vergleich, konnte ein signifikant höherer prozentualer Anteil der aktivierten Splenozyten gegenüber den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (+/- B7-H1 Antikörper) jeweils nachgewiesen werden (Abb. 3.3.2-6 Bild B). Bei den aktivierten Zellpopulationen der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen, wurde im Vergleich untereinander keine bedeutende Abweichung ermittelt (Abb. 3.3.2-6 Bild C).

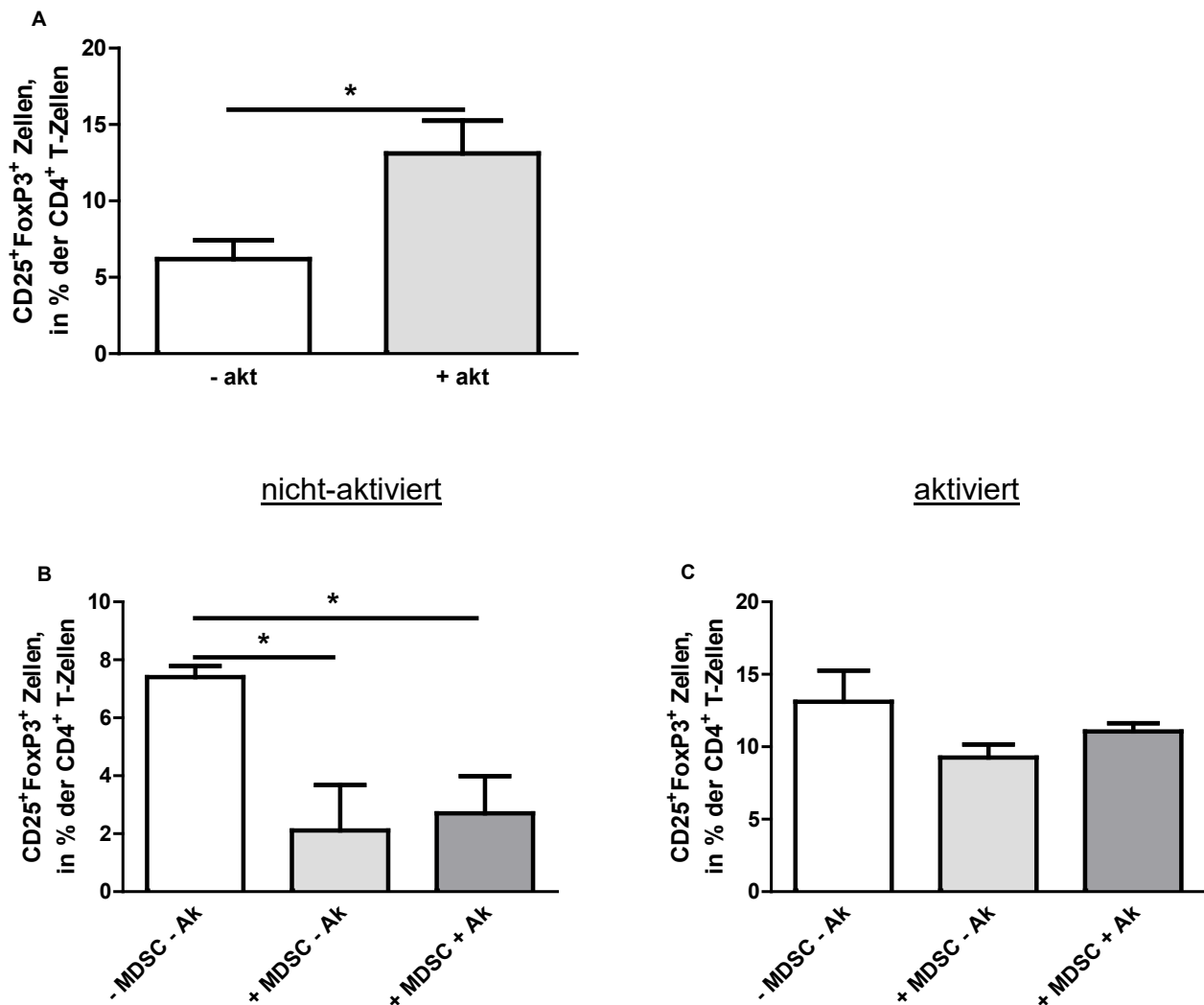


Abbildung 3.3.2-6 Quantifizierung der T_{reg} aus den CD4⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC aus tumortragenden WT-Mäusen (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Prozentualer Anteil der T_{reg} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der T_{reg} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil der T_{reg} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. *p≤0,05.

3.3.2.2.2 T_{con}, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen

In der nachfolgenden Auswertung lag das Augenmerk auf den T_{con}. Vergleicht man den prozentualen Anteil der nicht-aktivierten zu den aktivierten Zellen der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen, so konnte eine stark signifikante Differenz festgestellt werden (Abb. 3.3.2-7 Bild A). Die nicht-aktivierten Zellen wiesen einen deutlich höheren Wert an T_{con} auf als die aktivierten. Hinsichtlich der nicht-aktivierten Zellpopulationen untereinander, befanden sich alle drei Ansätze auf ungefähr gleichem Niveau (Abb. 3.3.2-7 Bild B). Auch die aktivierten Zellpopulationen der T_{con} zeigten keine auffallenden Abweichungen untereinander (Abb. 3.3.2-7 Bild C).

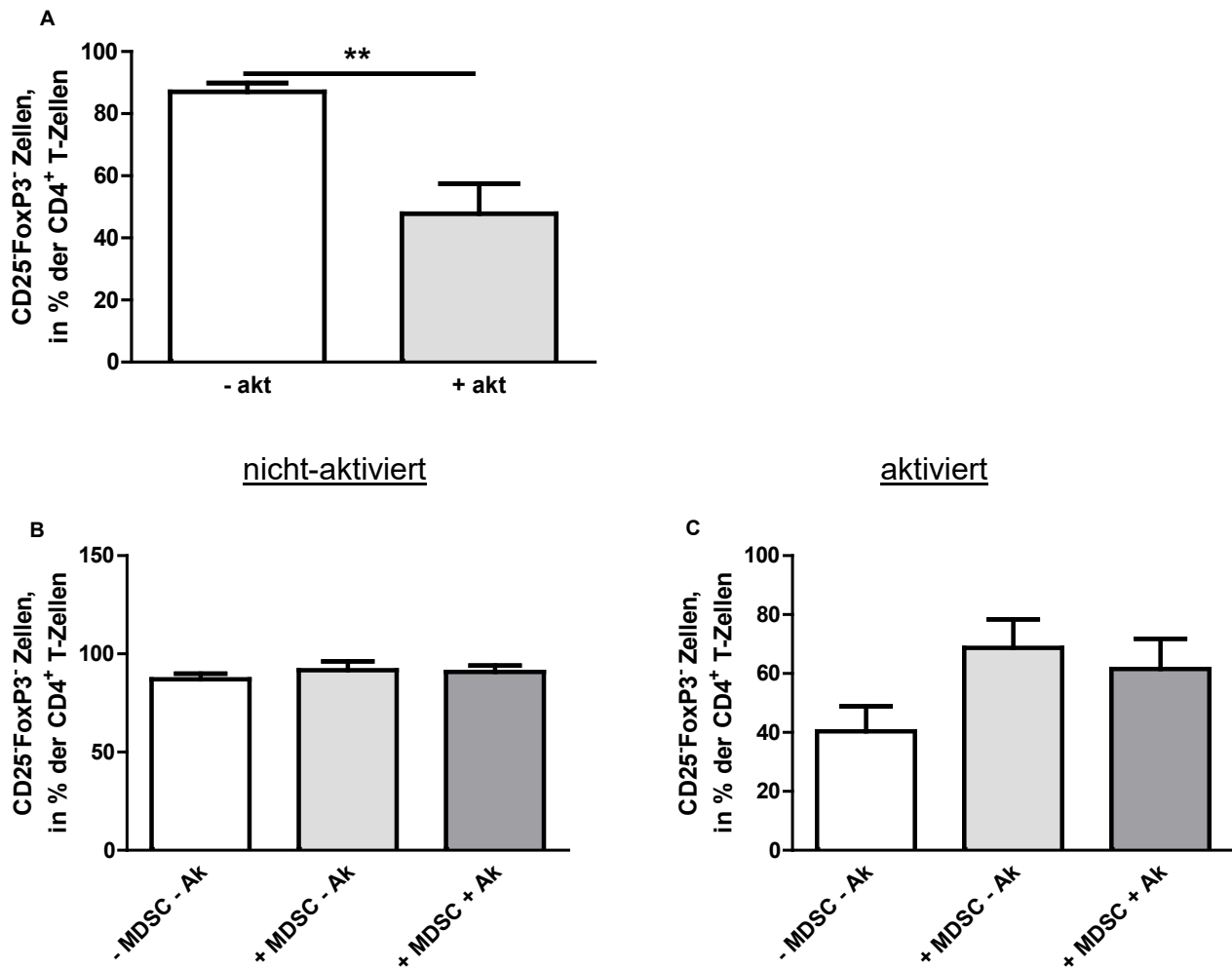


Abbildung 3.3.2-7 Quantifizierung der T_{con} aus den CD4⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC aus tumortragenden WT-Mäusen (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Prozentualer Anteil der T_{con} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der T_{con} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil der T_{con} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. **p≤0,005.

3.3.2.2.3 T_{con} aktiviert, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ Zellen

Zieht man einen Vergleich zwischen den aktivierten und nicht-aktivierten Zellen, so ist auch hier wieder ein deutlicher Unterschied erkennbar, denn der prozentuale Anteil der aktivierten Zellen der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ Zellen lag signifikant höher, als der der nicht-aktivierten Zellen (Abb. 3.3.2-8 Bild A). Die Aktivierung der Zellen führte erwartungsgemäß zu einer gesteigerten Expression von CD25, was bereits bei den T_{reg} deutlich wurde. Betrachtet man als nächstes die nicht-aktivierten Zellpopulationen der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ Zellen, so konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den nicht-aktivierten Splenozyten und den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC sowohl mit, als auch ohne B7-H1 Antikörper nachgewiesen

werden (Abb. 3.3.2-8 Bild B). Weiterhin befanden sich alle aktivierten Fraktionen auf einem ähnlichen prozentualen Niveau (Abb. 3.3.2-8 Bild C).

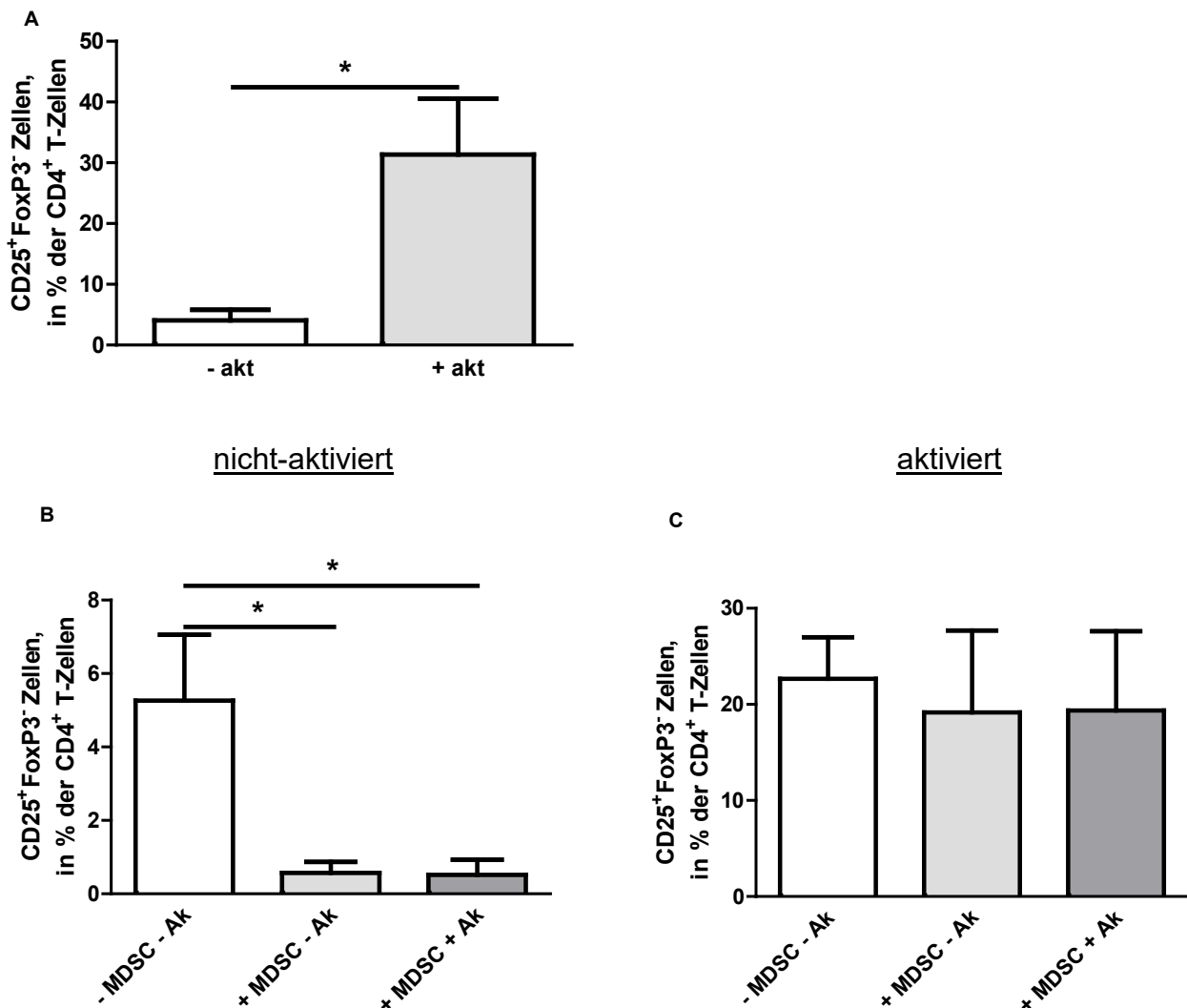


Abbildung 3.3.2-8 Quantifizierung der T_{con} aktiviert aus $CD4^+$ T-Zellen aus der Ko-Kultur mit Splenozyten und MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Prozentualer Anteil der T_{con} aktiviert in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der T_{con} aktiviert in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil der T_{con} aktiviert in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. * $p \leq 0,05$.

3.3.2.2.4 $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Zellen

Die Statistik über die $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ T-Zellen zeigte eine hoch signifikante Abweichung aller nicht-aktivierten Zellen, im Sinne eines deutlich höheren Anteils gegenüber den aktivierten Zellen (Abb. 3.3.2-9 Bild A). Des Weiteren wurden die nicht-aktivierten Zellpopulationen der $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ T-Zellen miteinander verglichen (Abb. 3.3.2-9 Bild B). Darin konnte ein stark signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (+/-

B7-H1 Antikörper) und den nicht-aktivierten Splenozyten alleine festgestellt werden. Die letzte Abbildung der $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ T-Zellen weist zwischen den aktivierten Splenozyten und den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC -sowohl mit, als auch ohne B7-H1 Antikörper- einen deutlichen Unterschied auf, da die ko-kultivierten Zellpopulationen jeweils einen höheren Prozentsatz zeigten (Abb. 3.3.2-9 Bild C).

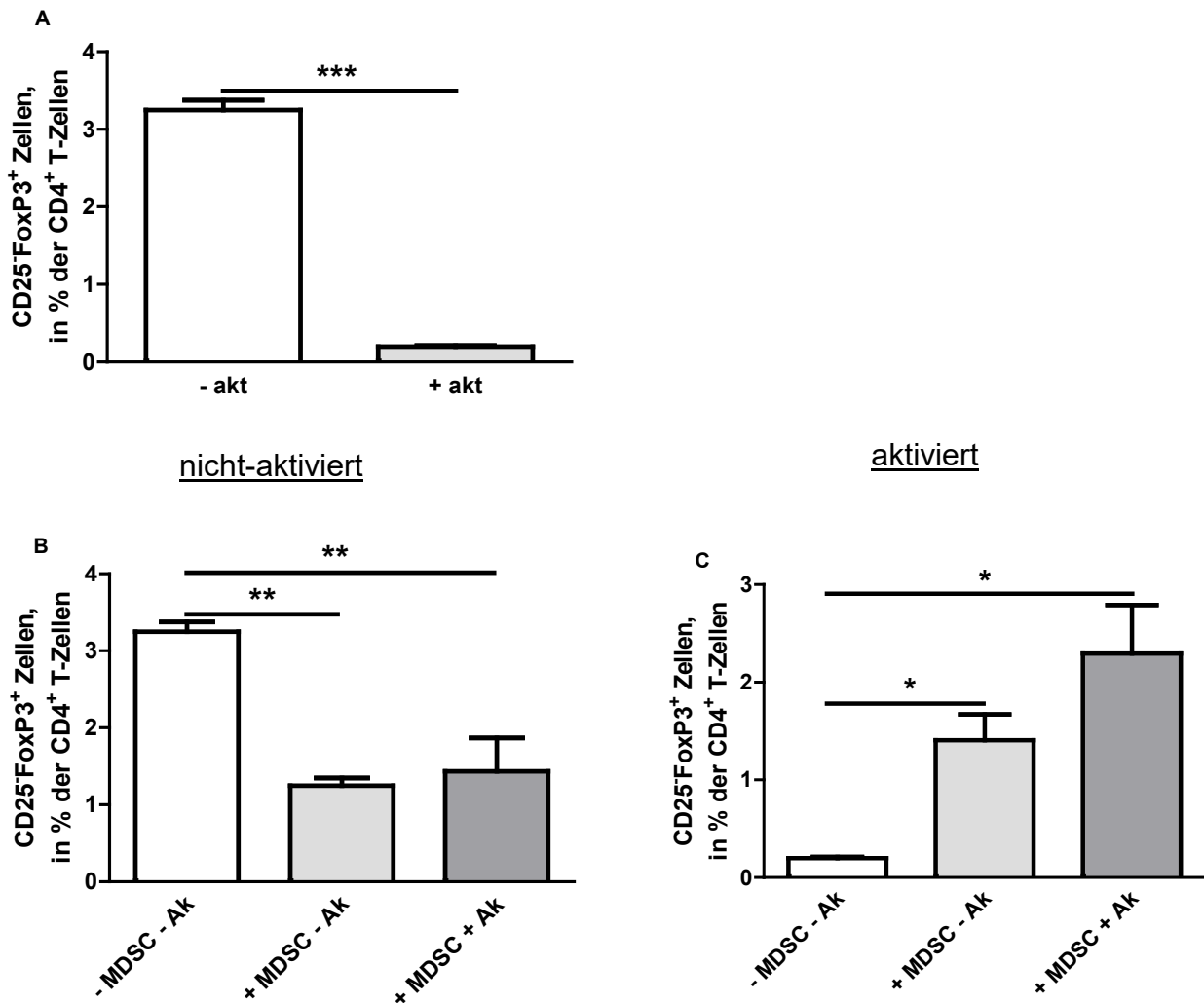


Abbildung 3.3.2-9 Quantifizierung der $CD25^+FoxP3^+$ Zellen aus $CD4^+$ T-Zellen aus der Ko-Kultur mit Splenozyten und MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

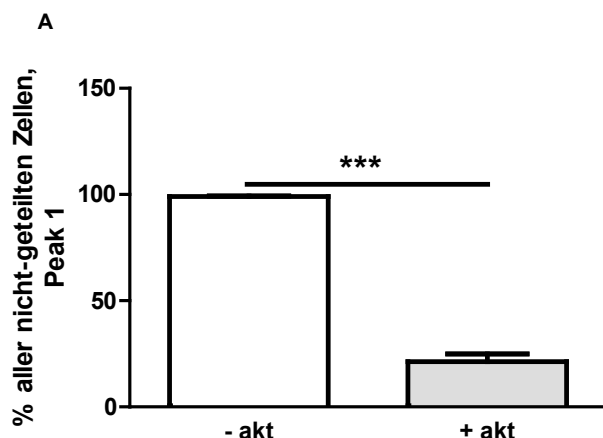
A: Prozentualer Anteil der $CD25^+FoxP3^+$ Zellen in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der $CD25^+FoxP3^+$ Zellen in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil der $CD25^+FoxP3^+$ Zellen in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$. *** $p \leq 0,001$.

Bei dieser Untersuchung der Effekte der MDSC auf T_{reg} , T_{con} , T_{con} aktiviert und $CD25^-FoxP3^+$ Zellen wurde die Erwartung bestätigt, dass eine Aktivierung der Zellen (T_{reg} , T_{con} aktiviert) zu einer gesteigerten Expression von CD25 führt. Des Weiteren konnte

kein signifikanter Unterschied bei einer B7-H1-Ausschaltung verglichen mit keiner B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche der MDSC festgestellt werden.

3.3.2.3 Das suppressive Verhalten der MDSC

Betrachtet man die statistische Auswertung der einzelnen CFSE-Peaks, so zeigte der prozentuale Anteil aller nicht-geteilten Zellen, dass die nicht-aktivierten Zellen einen eindeutig höheren Wert als die aktivierten Zellen aufwiesen (Abb. 3.3.2-10 Bild A). Das heißt es konnte bei den aktivierten Zellfraktionen erwartungsgemäß eine deutliche Teilungsaktivität nachgewiesen werden. Zieht man einen direkten Vergleich zwischen den nicht-aktivierten Zellfraktionen und ihrer Teilungsaktivität, so zeigten alle das gleiche Verhalten (Abb. 3.3.2-10 Bild B). Im Gegensatz dazu konnte bei den aktivierten Zellfraktionen ein deutlicher Unterschied in ihrer Teilungsaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.3.2-10 Bild C). Während die ko-kultivierten, aktivierten Splenozyten mit MDSC **ohne** B7-H1 Antikörper sich am wenigsten teilten, zeigten die aktivierten Splenozyten alleine die aktivste Teilung. Bei den ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC **mit** B7-H1 Antikörper war der Unterschied zu den aktivierten Splenozyten ebenfalls signifikant, zu den ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC ohne B7-H1 Antikörper jedoch nur minimal geringer. Das Verhalten aller zum ersten Mal geteilten Zellen verglichen zwischen aktivierten und nicht-aktivierten Zellpopulationen, bestätigt die Erwartung, dass sich alle nicht-aktivierten Zellen auch nicht geteilt und sich die aktivierten Zellen dagegen sehr stark geteilt hatten (Abb. 3.3.2-10 Bild D). Blickt man abschließend auf das prozentuale Verhalten der aktivierten, zum ersten Mal geteilten Zellpopulationen, ist ein deutlicher Unterschied feststellbar (Abb. 3.3.2-10 Bild E). Während die aktivierten Splenozyten sich am aktivsten geteilt hatten, zeigten die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (+/- B7-H1 Antikörper) eine statistisch signifikante, geringere Teilungsaktivität.



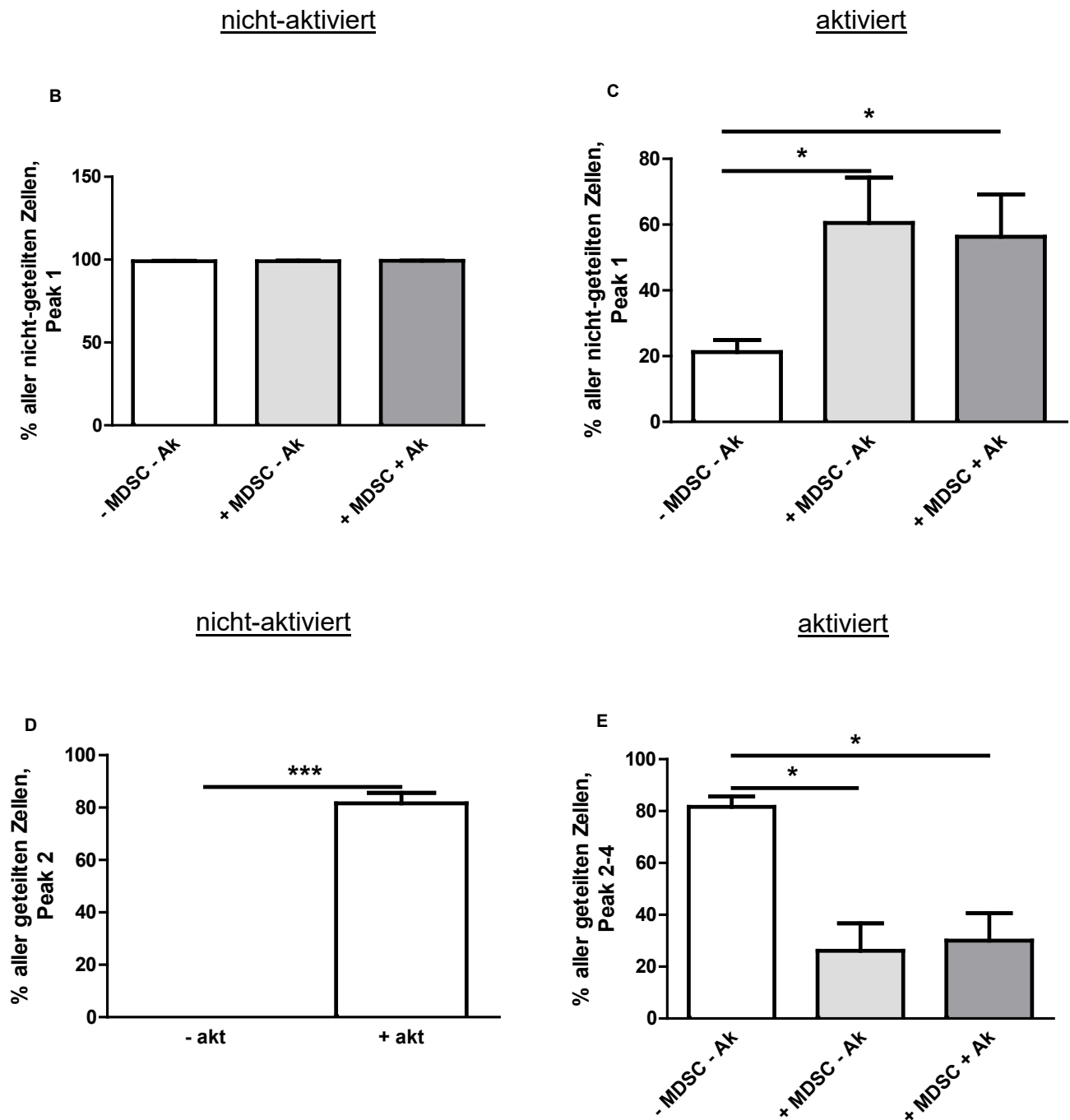


Abbildung 3.3.2-10 Quantifizierung aller nicht-geteilten (Peak 1) und zum ersten Mal geteilten (Peak 2) CD4⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **C:** Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. **D:** Prozentualer Anteil aller geteilten CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den nicht-aktivierten Zellfraktionen. **E:** Prozentualer Anteil aller geteilten CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich unter den aktivierten Zellfraktionen. *p≤0,05.

***p≤0,001.

3.4 Untersuchung der Effekte einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche von DC auf ihr Proliferationsverhalten

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob DC im Falle des PaCa ebenfalls ein aktivierendes Verhalten zeigen, wie es im gesunden Zustand der Fall ist. Das proliferative Verhalten der aus Tumoren gewonnenen DC wurde folglich auf $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen untersucht. Dabei wurde durch Verwendung des B7-H1 Antikörpers eine Ausschaltung des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche von DC erzielt und vergleichend mit unbehandelten DC wurden sie jeweils in Ko-Kultur mit Splenozyten gebracht.

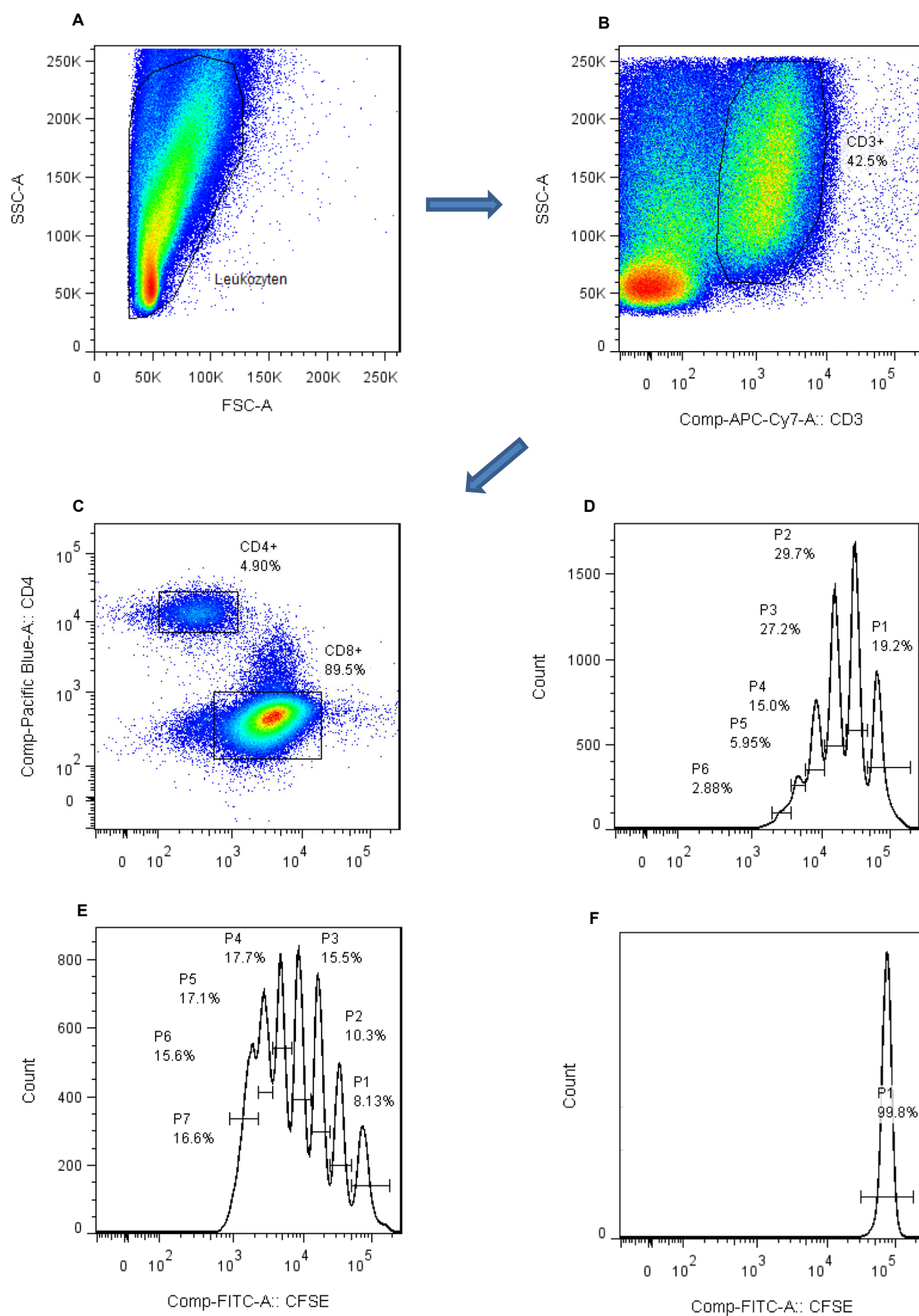
3.4.1 DC aus Tumoren von C57BL/6 WT-Mäusen

Aus tumortragenden, männlichen WT-Mäusen wurden die Milzen und Tumoren isoliert und daraus jeweils Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aus der Tumor-Einzelzellsuspension wurden DC als Zellfraktion isoliert, wobei ein Teil davon mit dem B7-H1 Antikörper behandelt wurde und der andere unbehandelt blieb. Die Milz-Einzelzellsuspension wurde mit dem CFSE-Proliferationsfarbstoff markiert, um das proliferative Verhalten der $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen nachvollziehen zu können. Daraufhin wurden die Splenozyten sowohl einzeln, als auch in Ko-Kultur mit den DC (+/- B7-H1 Antikörper) ausplatziert. Anschließend erfolgte bei der einen Hälfte der Ansätze eine Aktivierung der Zellen mit Hilfe der CD3/CD28 Antikörper. Daraus ergaben sich insgesamt 6 verschiedene Ansätze.

Eine Charakterisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe der FACS-Analyse. Als Negativkontrollen wurden die entsprechenden FMO-Proben herangezogen. Der Versuch wurde in 3 Durchläufen mit jeweils 16 tumortragenden, männlichen WT-Mäusen durchgeführt.

3.4.1.1 Proliferationsanalyse - Auswertungsstrategie der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC

Um die $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen zu analysieren, wurde folgende Auswertungsstrategie herangezogen: Die Leukozyten konnten mit Hilfe der Dotplot-Darstellung (FSC zu SSC) ermittelt werden (Abb. 3.4.1-1 Bild A). Daraus wurden alle $CD3^+$ T-Zellen festgelegt und im nächsten Schritt die $CD4^+/CD8^+$ Zellpopulationen identifiziert (Abb. 3.4.1-1 Bild B und C). Im Histogramm wurde dann sowohl auf den $CD4^+$ als auch auf den $CD8^+$ T-Zellen das proliferative Verhalten der Splenozyten mit Hilfe des CFSE-Farbstoffes untersucht (Abb. 3.4.1-1 Bild D-I).



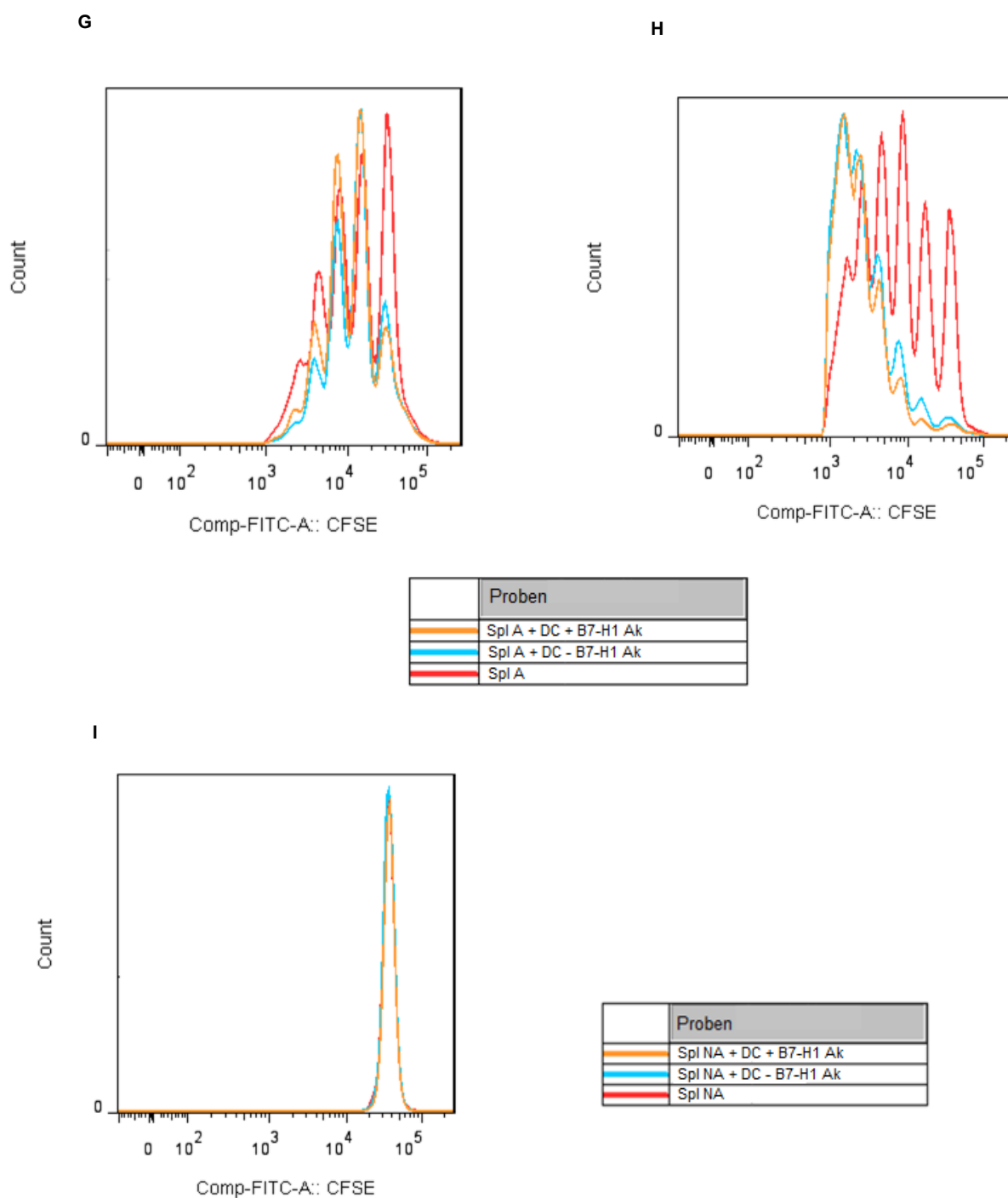


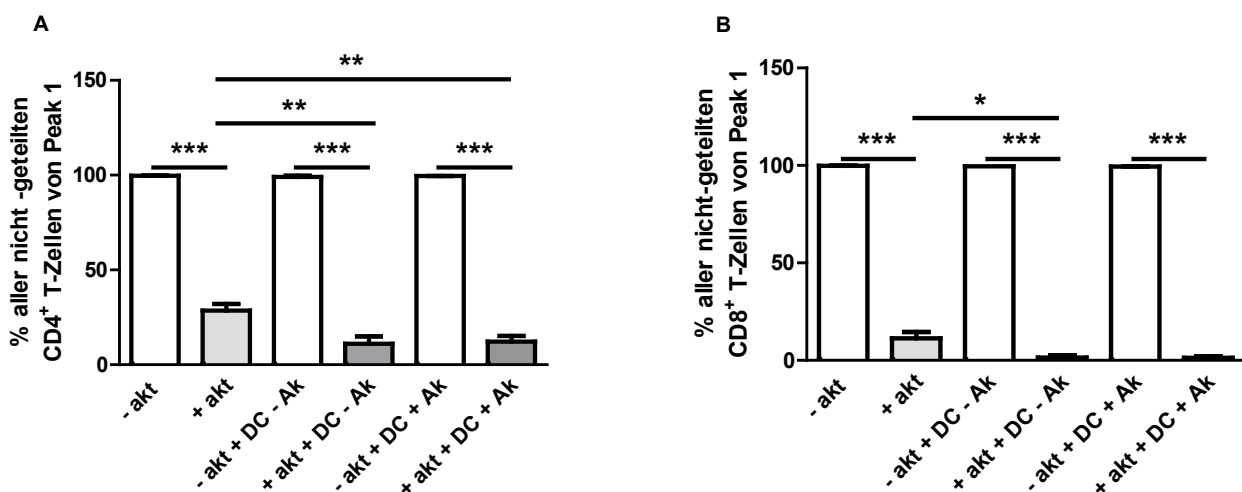
Abbildung 3.4.1-1 Auswertungsstrategie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und des proliferativen Verhaltens aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Leukozyten. **B:** CD3⁺ T-Zellen. **C:** CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. **D:** CFSE-Darstellung der aktivierten Splenozyten aus CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **E:** CFSE-Darstellung der aktivierten Splenozyten aus CD8⁺ T-Zellen im Histogramm. **F:** CFSE-Darstellung der nicht-aktivierten Splenozyten aus CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **G:** CFSE-Darstellung im overlay der aktivierten Zellfraktionen aus CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **H:** CFSE-Darstellung im overlay der aktivierten Zellfraktionen aus CD8⁺ T-Zellen im Histogramm. **I:** CFSE-Darstellung im overlay der nicht-aktivierten Zellfraktionen aus CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **G/H/I:** Spl A – aktivierte Splenozyten. DC – Dendritische Zellen. B7-H1 Ak – B7-H1 Antikörper. Spl NA – nicht-aktivierte Splenozyten.

Erwartungsgemäß konnte ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich des prozentualen Anteils aller nicht-geteilten Zellen (Peak 1) zwischen den aktivierten und den nicht-aktivierten Zellfraktionen nachgewiesen werden, sowohl bei den CD4⁺ T-Zellen, als auch bei den CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.4.1-2 Bild A und B). Während die nicht-aktivierten Zellpopulationen einen hohen Prozentsatz und damit eine geringe Teilungsaktivität aufwiesen, zeigten die aktivierten Zellpopulationen genau das Gegenteil - einen niedrigen Prozentsatz und damit eine hohe Teilungsbereitschaft.

Betrachtet man nur den letzten CFSE-Peak der CD4⁺ T-Zellen (Peak 5), so wird folglich ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied deutlich (Abb. 3.4.1-2 Bild C). Alle aktivierten Zellfraktionen waren hoch teilungsaktiv, während die nicht-aktivierten Zellen naturgemäß keine Bereitschaft mehr dazu zeigten. Betrachtet man die Teilungsaktivität der aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**ohne** B7-H1 Antikörper), so konnte eine deutlich höhere Rate gegenüber den aktivierten Splenozyten festgestellt werden. Durch die Zugabe der DC erfolgte damit eine deutliche Aktivierung der Proliferation. Im Hinblick auf die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**mit** B7-H1 Antikörper), wurde dieses aktivierende Verhalten nicht verstärkt.

Die Auswertung des letzten CFSE-Peaks der CD8⁺ T-Zellen (Peak 6) zeigte ein sehr ähnliches Bild. Alle aktivierten Zellfraktionen zeigten gegenüber den jeweiligen nicht-aktivierten Zellfraktionen eine signifikant höhere Teilungsaktivität (Abb. 3.4.1-2 Bild D).



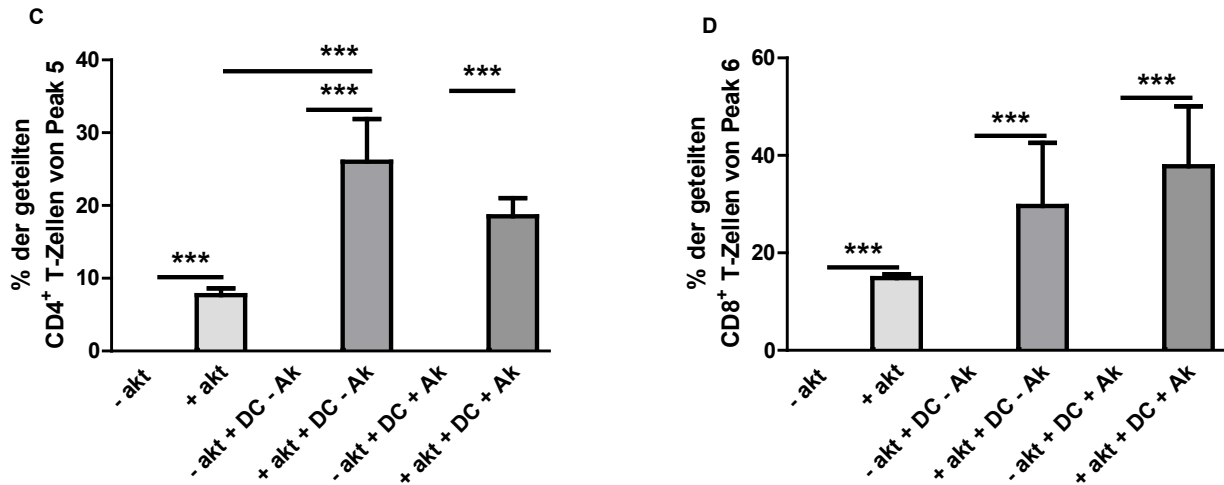


Abbildung 3.4.1-2 Quantifizierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und des proliferativen Verhaltens aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten CD4⁺ T-Zellen, Peak 1. **B:** Prozentualer Anteil aller nicht-geteilten CD8⁺ T-Zellen, Peak 1. **C:** Prozentualer Anteil aller zum vierten Mal geteilten CD4⁺ T-Zellen, Peak 5. **D:** Prozentualer Anteil aller zum fünften Mal geteilten CD4⁺ T-Zellen, Peak 6.

3.4.1.2 Weitere Auswertungen der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC

Im nächsten Schritt wurden im Histogramm sowohl auf den CD4⁺ als auch auf den CD8⁺ T-Zellen der Grad der Aktivierung mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 überprüft (Abb. 3.4.1-3 Bild A). Zusätzlich fand der Marker für CD25 seine Verwendung, was ebenfalls im Histogramm dargestellt wurde (Abb. 3.4.1-3 Bild B).

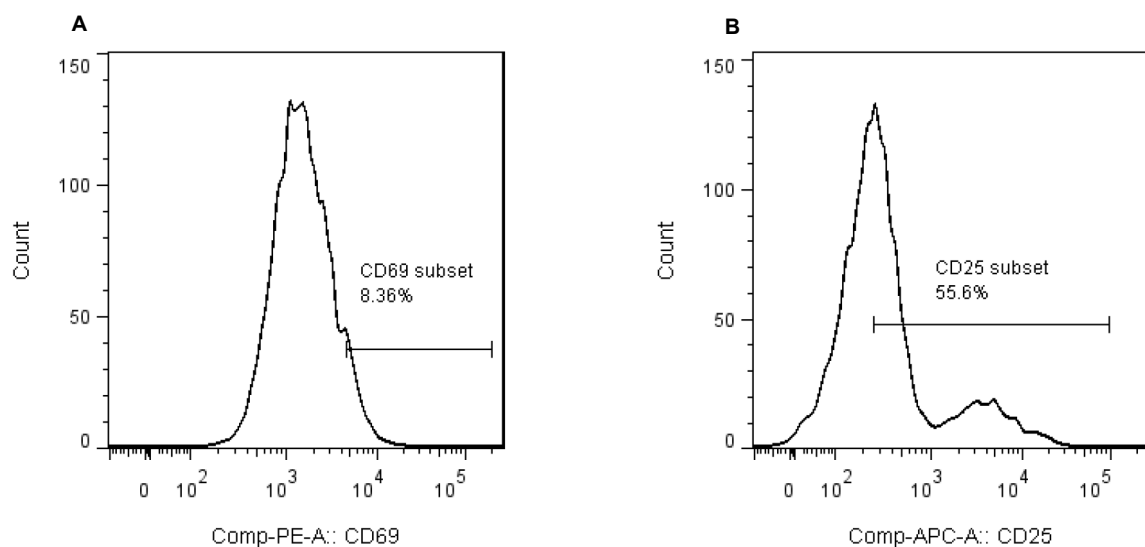


Abbildung 3.4.1-3 Weitere Auswertungsstrategie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Darstellung der CD4⁺CD69⁺ T-Zellen aus aktivierten Splenozyten im Histogramm. **B:** Darstellung der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus aktivierten Splenozyten im Histogramm.

Im Hinblick auf den Aktivierungsstatus der CD4⁺CD69⁺ T-Zellen, konnten einige hoch signifikante Unterschiede zwischen den 6 unterschiedlichen Ansätzen festgestellt werden (Abb. 3.4.1-4 Bild A). Erwartungsgemäß wiesen die durch die CD3/CD28 Antikörper aktivierten Splenozyten einen deutlichen Aktivierungsgrad gegenüber den nicht-aktivierten Splenozyten auf. Auch im Vergleich zu den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (+/- B7-H1 Antikörper) zeigten die aktivierten Splenozyten eine deutlich stärkere Aktivierung. Vergleicht man den prozentualen Anteil zwischen den nicht-aktivierten, ko-kultivierten und den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (+/- B7-H1 Antikörper), so konnte ebenfalls ein deutlicher Anstieg unter den aktivierten Populationen der CD4⁺CD69⁺ T-Zellen beobachtet werden. In Anbetracht der Auswertung der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen konnte jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen aktivierten und nicht-aktivierten Zellpopulationen nachgewiesen werden (Abb. 3.4.1-4 Bild B). Die aktivierten Fraktionen wiesen immer einen deutlich höheren Prozentsatz an CD25⁺ Zellen auf, als die nicht-aktivierten.

Bei der Untersuchung des Aktivierungsgrades der CD8⁺CD69⁺ T-Zellen wiesen nur die durch CD3/CD28 aktivierten Splenozyten gegenüber den nicht-aktivierten Splenozyten einen deutlich höheren Prozentsatz an CD69 auf (Abb. 3.4.1-4 Bild C). Abschließend wird die statistische Auswertung der CD8⁺CD25⁺ T-Zellen verdeutlicht (Abb. 3.4.1-4 Bild D). Hierbei ließ sich zwischen allen drei aktivierten Zellfraktionen jeweils ein hoch signifikanter Unterschied und damit eindeutig höherer prozentualer Anteil an CD25⁺ Zellen zu den nicht-aktivierten ermitteln.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass DC auch im Tumorgeschehen des PaCa eine aktivierende Funktion besitzen, was sich durch die Verstärkung der Proliferation der aktivierten Splenozyten zeigt. Die Ausschaltung des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche der DC hat jedoch keine Auswirkung auf die Stimulierung der Proliferation der T-Zellen gezeigt.

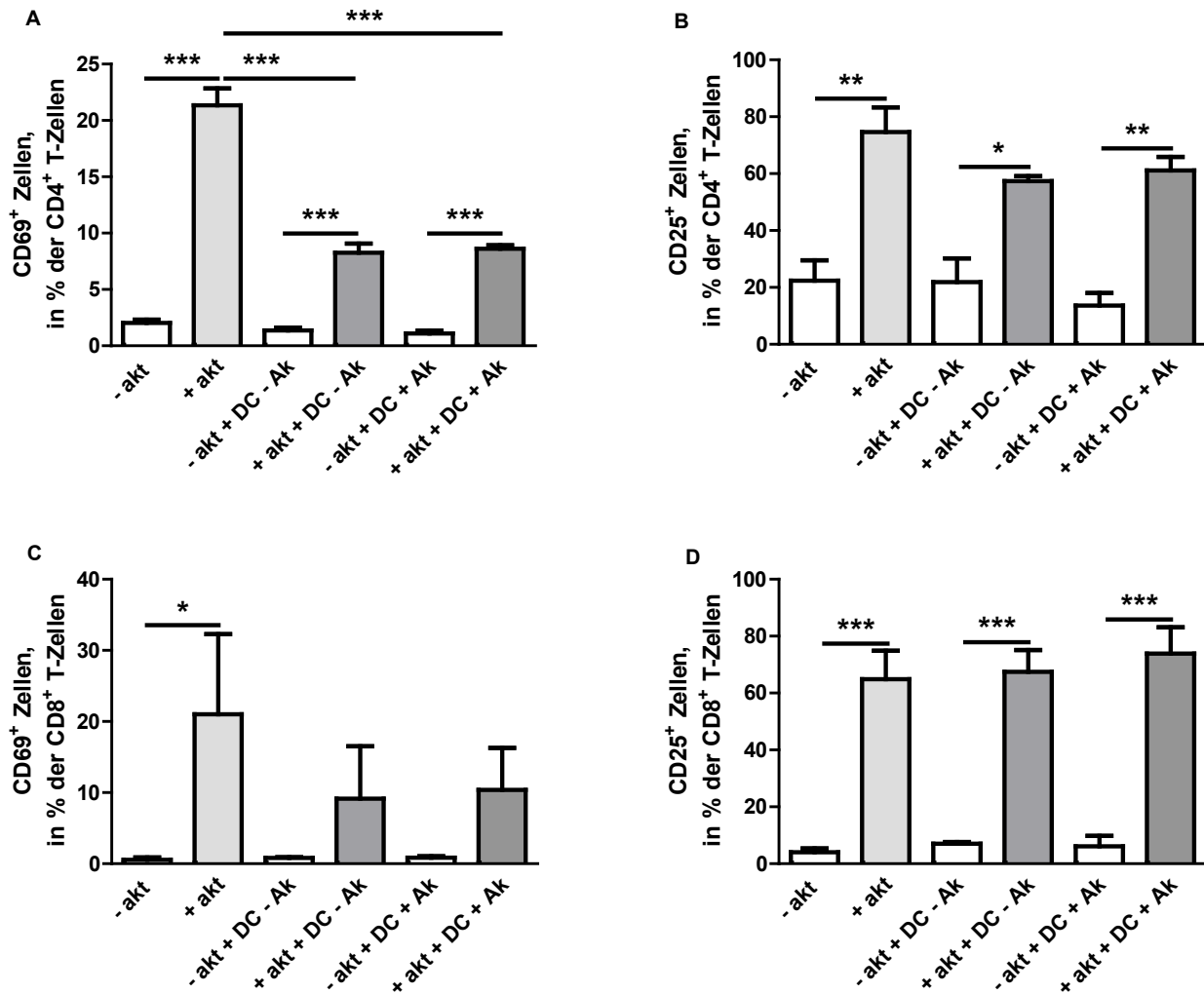


Abbildung 3.4.1-4 Quantifizierung und Charakterisierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

A: Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentualer Anteil der CD25⁺ Zellen in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. **C:** Prozentualer Anteil der CD69⁺ Zellen in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der CD25⁺ Zellen in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. *p≤0,05. **p≤0,01. ***p≤0,001.

3.5 Luminex-Analyse

Bei Zytokinen handelt es sich um körpereigene Proteine, welche an der Regulierung von verschiedenen immunologischen Prozessen beteiligt sind. Prinzipiell wird zwischen antiinflammatorischen (u.a. IL-10, TGFβ) und proinflammatorischen (u.a. IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6, TNFα) Zytokinen unterschieden.

Die Luminex-Analyse wurde herangezogen, um aus den Mediumüberständen der Ko-Kulturen von Splenozyten mit T_{reg}, MDSC und DC eine Zytokinbestimmung durchzuführen. Untersucht wurden folgende Zytokine und Chemokine: IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, TGFβ, IL-17, VEGF, TNFα und KC (CXCL1).

3.5.1 Bestimmung der Zytokine aus den Mediumüberständen der Proliferations-/Suppressionsanalyse aus Ko-Kulturen mit T_{reg}

Im Folgenden wurden die Mediumüberstände aus den Ko-Kulturen mit T_{reg} von insgesamt 3 Durchläufen mit Hilfe der Luminex-Analyse auf bestimmte Zytokine bzw. Chemokine untersucht. Diese Mediumüberstände aus den sechs verschiedenen Ansätzen wurden miteinander verglichen: aktivierte und nicht-aktivierte Splenozyten, aktivierte und nicht-aktivierte, ko-kultivierte Splenozyten mit T_{reg} (+/- B7-H1 Antikörper). Hierfür wurden eine magnetische TGFβ Platte und eine magnetische 7 Plex Platte verwendet.

3.5.1.1 IFN γ

Wie in der Abbildung der statistischen Auswertung zu sehen ist, konnten hoch signifikante Unterschiede in der Produktion von IFN γ nachgewiesen werden. Den höchsten Wert an IFN γ zeigten die aktivierten Splenozyten, wo hingegen alle anderen Zellpopulationen einen sehr geringen Anteil aufwiesen.

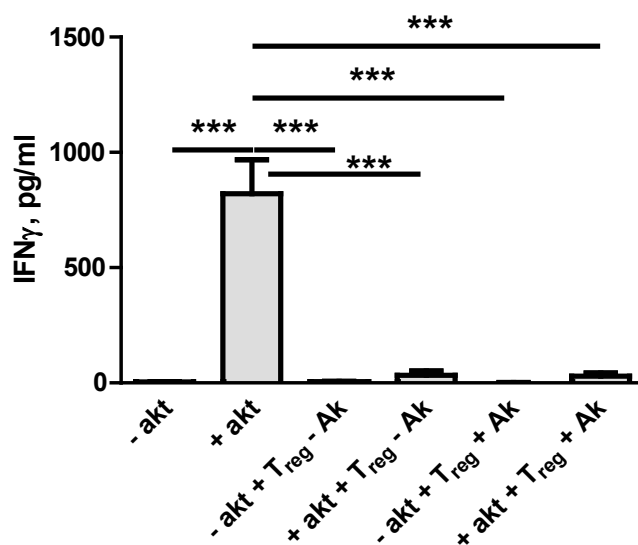


Abbildung 3.5.1-1 Quantifizierung der Produktion von IFN γ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

***p ≤ 0,001.

3.5.1.2 IL-1β

Betrachtet man folgende Abbildung, so wurde zwischen den einzelnen Ansätzen in der Produktion von IL-1β kein deutlicher Unterschied erkennbar. Alle wiesen ein ähnlich hohes prozentuales Niveau auf.

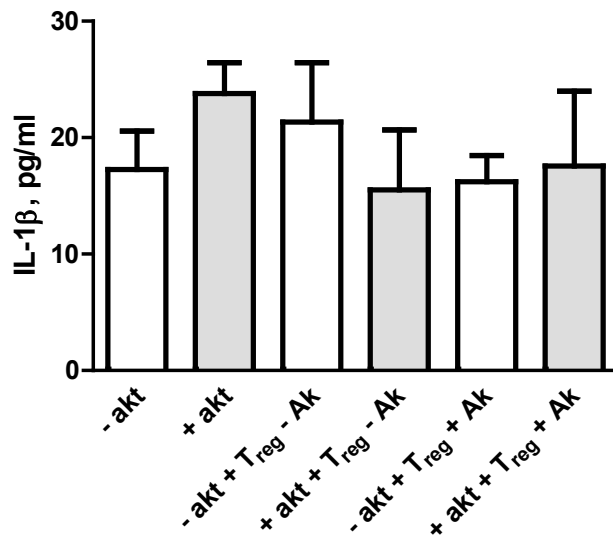


Abbildung 3.5.1-2 Quantifizierung der Produktion von IL-1 β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

3.5.1.3 IL-2

Vergleicht man die einzelnen Ansätze im Hinblick auf die Produktion von IL-2, so zeigten sich einige sehr deutliche Unterschiede. Die aktivierten Splenozyten wiesen abermals gegenüber allen anderen Fraktionen einen sehr viel höheren Anteil an IL-2 auf. Zusätzlich konnte bei den Ko-Kulturen der aktivierten Splenozyten mit T_{reg} **ohne** B7-H1 Antikörper ein hoch signifikanter Unterschied, d.h. ein höherer Wert in der IL-2 Produktion gegenüber der Ko-Kultur der aktivierten Splenozyten mit T_{reg} **mit** B7-H1 Antikörper festgestellt werden.

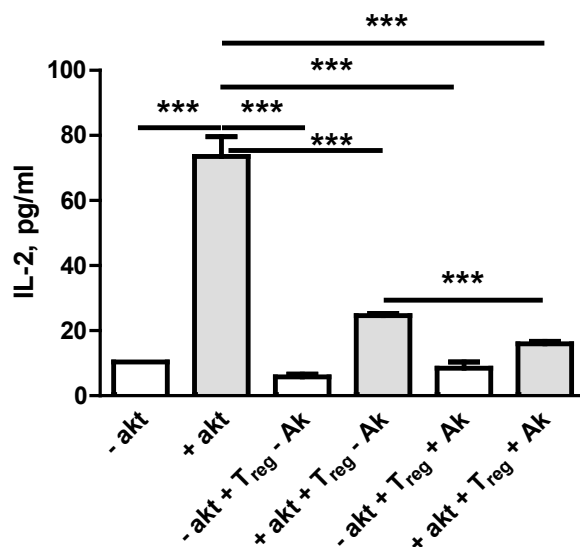


Abbildung 3.5.1-3 Quantifizierung der Produktion von IL-2 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit Treg gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

***p \leq 0,001.

3.5.1.4 IL-6

Bei der Analyse der Produktion von IL-6, hat sich ein signifikanter Unterschied der aktivierten Splenozyten gegenüber allen anderen Zellpopulationen herausgestellt. Sie wiesen einen deutlich höheren Wert an IL-6 auf, wohingegen alle anderen Ansätze eine sehr geringe Produktion zeigten.

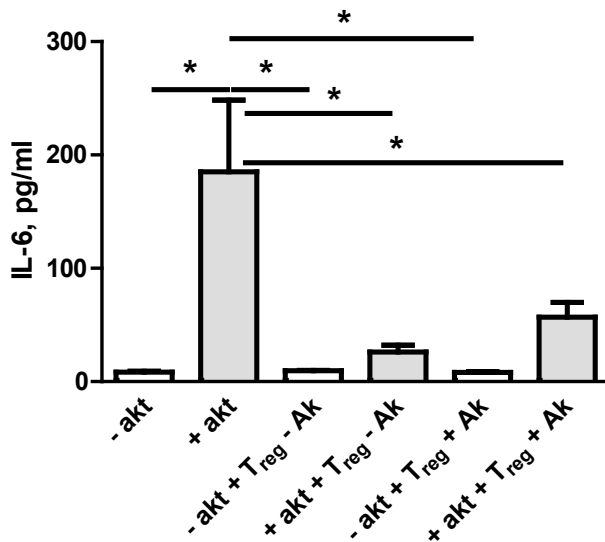


Abbildung 3.5.1-4 Quantifizierung der Produktion von IL-6 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05.

3.5.1.5 IL-10

Im Hinblick auf die statistische Auswertung der IL-10 Produktion der unterschiedlichen Zellpopulationen, zeigte sich zwischen den aktivierten und den nicht-aktivierten Splenozyten, sowie zwischen den aktivierten Splenozyten und den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit T_{reg} **ohne** B7-H1 Antikörper ein signifikanter Unterschied. Die aktivierten Splenozyten wiesen jeweils einen höheren Wert an IL-10 auf.

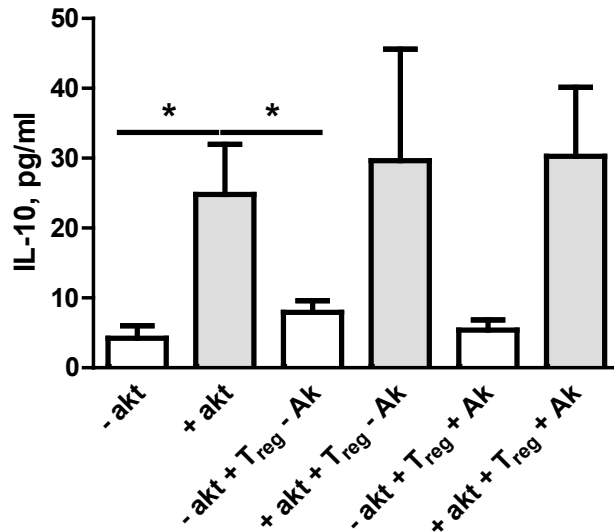


Abbildung 3.5.1-5 Quantifizierung der Produktion von IL-10 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05.

3.5.1.6 TGFβ

Wie man der Abbildung entnehmen kann, wurde in der TGFβ Produktion vergleichend zwischen den einzelnen Ansätzen keine deutliche Differenz ermittelt. Sie befanden sich alle auf einem ähnlichen Niveau.

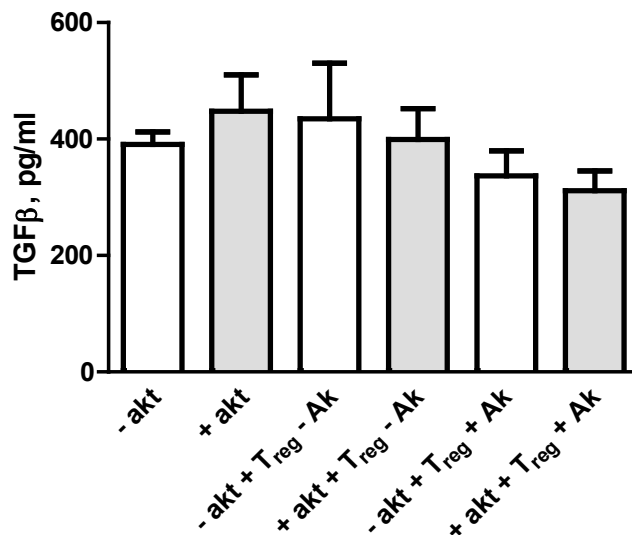


Abbildung 3.5.1-6 Quantifizierung der Produktion von TGFβ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

3.5.1.7 IL-17

In der Abbildung wird deutlich, dass es hoch signifikante Unterschiede in der Produktion von IL-17 gegeben hat. Die Produktion von IL-17 der aktivierten Splenozyten lag deutlich über dem der nicht-aktivierten und dem der nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit T_{reg} (+/- B7-H1 Antikörper). Zusätzlich lag der Wert der aktivierten Splenozyten eindeutig über dem der aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit T_{reg} (+/- B7-H1 Antikörper).

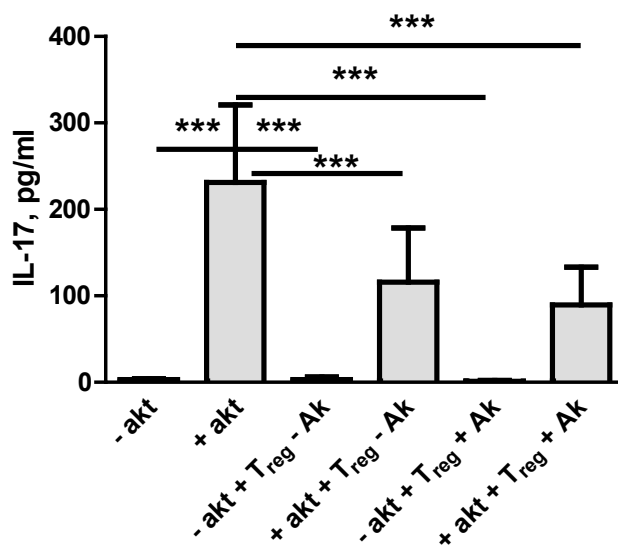


Abbildung 3.5.1-7 Quantifizierung der Produktion von IL-17 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

***p≤0,001.

3.5.1.8 VEGF

Die statistische Auswertung der Luminex-Analyse der Produktion von VEGF zeigte einen signifikanten Unterschied im Bereich der aktivierten Splenozyten zu allen drei nicht-aktivierten Zellfraktionen, im Sinne eines deutlich höheren Wertes an VEGF der aktivierten Splenozyten, auf.

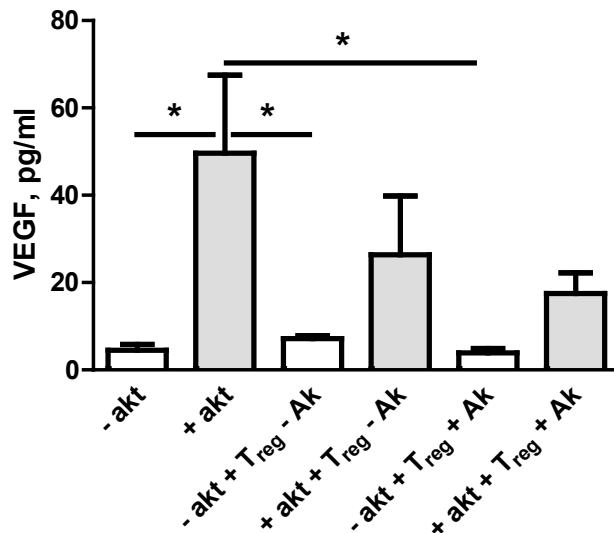


Abbildung 3.5.1-8 Quantifizierung der Produktion von VEGF aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T_{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05.

3.5.2 Bestimmung der Zytokine aus den Mediumüberständen der Proliferations-/Suppressionsanalyse aus Ko-Kulturen mit MDSC

Im Folgenden wurden die Mediumüberstände der Ko-Kulturen mit den MDSC von insgesamt 4 Durchläufen mit Hilfe der Luminex-Analyse auf bestimmte Zytokine bzw. Chemokine untersucht. Dafür wurden die Mediumüberstände folgender 6 Ansätze verwendet: aktivierte und nicht-aktivierte Splenozyten, aktivierte und nicht-aktivierte, ko-kultivierte Splenozyten mit MDSC (+/- B7-H1 Antikörper). Zu diesem Zweck wurden eine magnetische TGFβ Platte und eine magnetische 12 Plex Platte verwendet.

3.5.2.1 IFN γ

Bei Betrachtung der statistischen Auswertung von IFN γ , wurden einige Unterschiede in der Produktion von IFN γ nachgewiesen. Die aktivierten Zellfraktionen wiesen zu ihren jeweiligen nicht-aktivierten Gegenspieler einen signifikant höheren Wert auf. Zusätzlich wurde eine sehr deutliche Differenz zwischen den beiden aktivierten, ko-kultivierten Fraktionen festgestellt, wobei die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC **mit** B7-H1 Antikörper einen deutlich höheren Wert zeigten, als die **ohne** B7-H1 Antikörper.

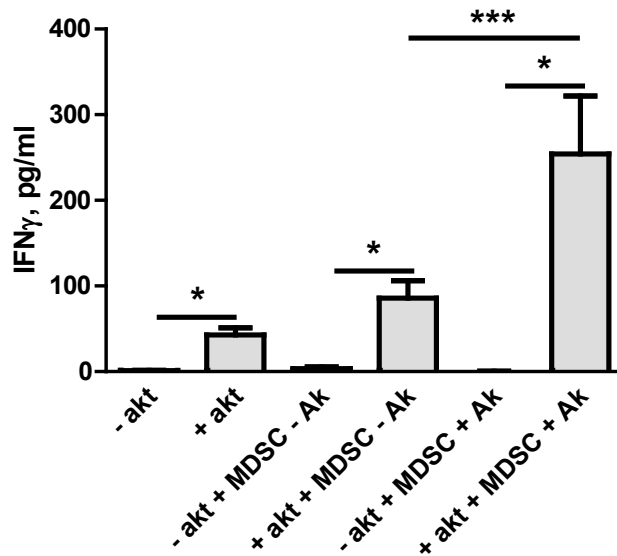


Abbildung 3.5.2-1 Quantifizierung der Produktion von IFN γ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

* $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$.

3.5.2.2 IL-1 β

Im Hinblick auf die Auswertung von IL-1 β konnte zwar keine statistische Signifikanz aufgezeigt werden, jedoch wurde eine Tendenz sichtbar. Während die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**mit** B7-H1 Antikörper) den höchsten Wert aufwiesen, nahm dieser über die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten (**ohne** B7-H1 Antikörper), bis hin zu den aktivierten Splenozyten minimal ab.

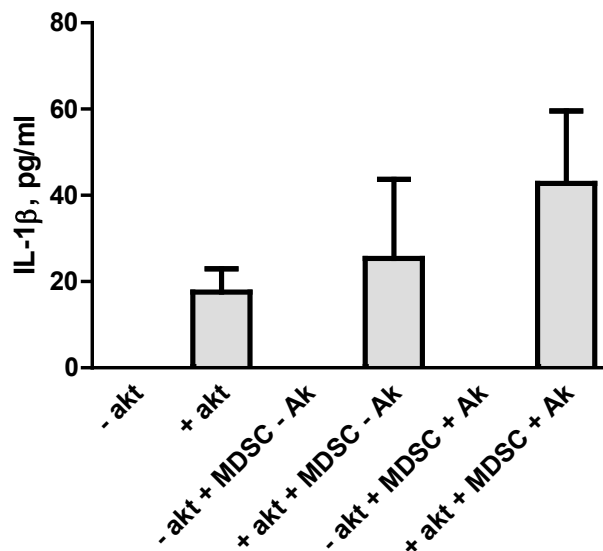


Abbildung 3.5.2-2 Quantifizierung der Produktion von IL-1 β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

3.5.2.3 IL-2

Die statistische Auswertung unter folgender Abbildung hat einige Differenzen in der Produktion von IL-2 ergeben. Während die aktivierten Splenozyten gegenüber den nicht-aktivierten einen signifikanten Unterschied und höheren Anteil an IL-2 aufwiesen, zeigten die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (+/- B7-H1 Ak) zu ihrem jeweiligen nicht-aktivierten Pendant einen signifikant höheren Wert.

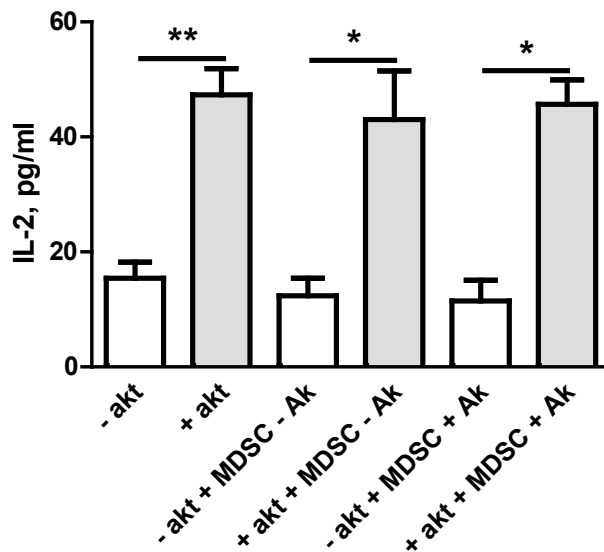


Abbildung 3.5.2-3 Quantifizierung der Produktion von IL-2 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05. **p≤0,01.

3.5.2.4 IL-6

Bei der Auswertung der Produktion von IL-6, wurde sowohl ein deutlich höherer Wert bei den aktivierten Splenozyten gegenüber den nicht-aktivierten festgestellt, als auch bei den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**ohne** B7-H1 Antikörper) gegenüber den nicht-aktivierten Splenozyten.

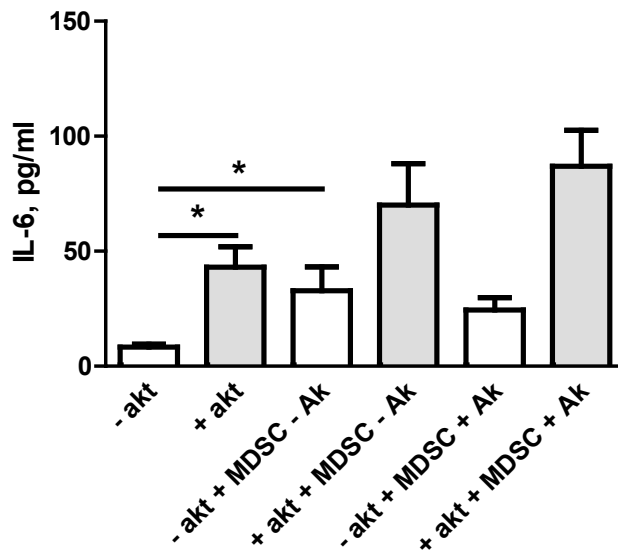


Abbildung 3.5.2-4 Quantifizierung der Produktion von IL-6 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

* $p \leq 0,05$.

3.5.2.5 IL-10

Die Produktion von IL-10 zeigte keine deutlichen Abweichungen zwischen den einzelnen Ansätzen.

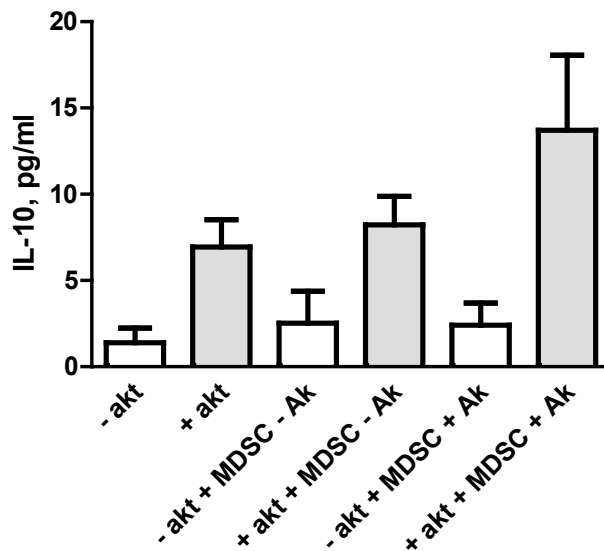


Abbildung 3.5.2-5 Quantifizierung der Produktion von IL-10 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

3.5.2.6 IL-17

Die höchste Produktion an IL-17 wiesen die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC **ohne** B7-H1 Antikörper auf. Damit lagen sie auch deutlich über dem Wert aller anderen Ansätze. Des Weiteren konnte ein Unterschied zwischen den aktivierten zu den nicht-aktivierten Splenozyten und zwischen den aktivierten zu den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC **mit** B7-H1 Antikörper nachgewiesen werden.

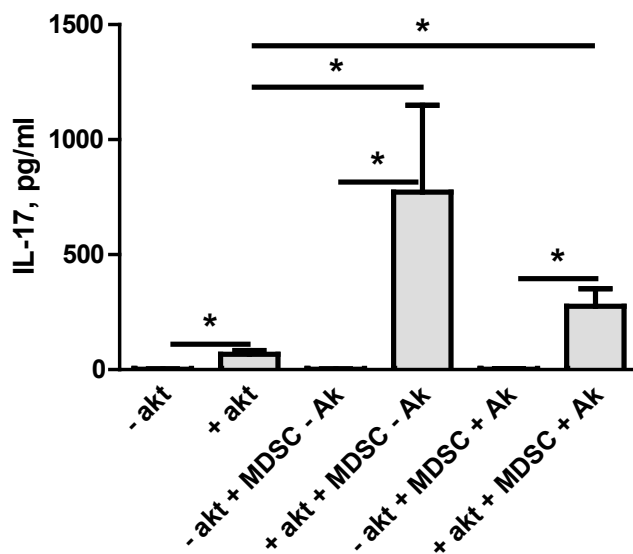


Abbildung 3.5.2-6 Quantifizierung der Produktion von IL-17 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

* $p \leq 0,05$.

3.5.2.7 VEGF

Bei nachstehender Abbildung wurde ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**ohne** B7-H1 Antikörper) im Vergleich zu den aktivierten Splenozyten nachgewiesen. Zusätzlich lag die Produktion der aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**ohne** B7-H1 Antikörper) deutlich über dem der nicht-aktivierten Zellfraktion. Die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**mit** B7-H1 Antikörper) zeigten im Vergleich zu ihrem nicht-aktivierten Gegenspieler ebenfalls eine höhere Rate an VEGF.

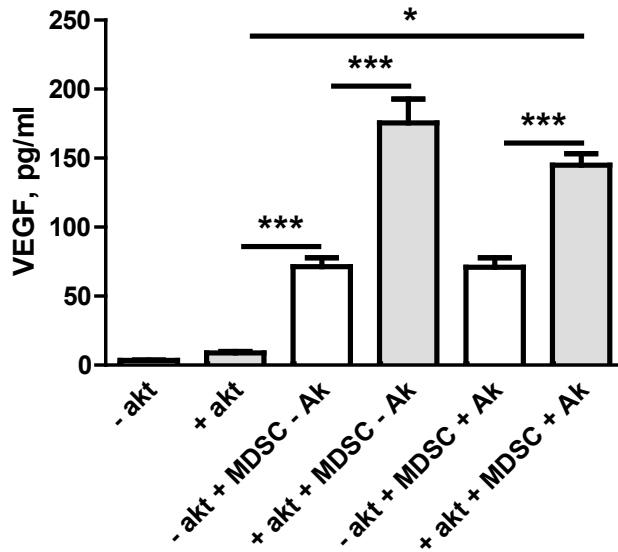


Abbildung 3.5.2-7 Quantifizierung der Produktion von VEGF aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

* $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$.

3.5.2.8 TGF β

Ein Blick auf die statistischen Auswertungen der Produktion von TGF β lässt keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Zellfraktionen erkennen.

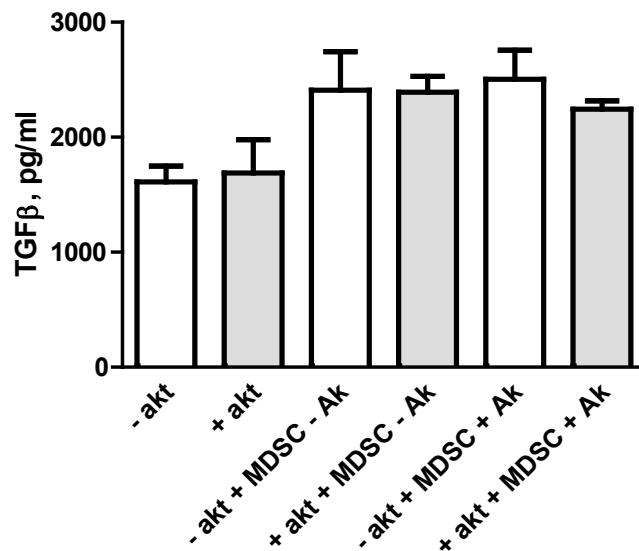


Abbildung 3.5.2-8 Quantifizierung der Produktion von TGF β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

3.5.2.9 KC (CXCL1)

Betrachtet man nachstehende Abbildung, so erkennt man deutlich einen signifikanten Unterschied und höheren Wert an KC der nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**ohne** B7-H1 Antikörper) gegenüber den nicht-aktivierten Splenozyten. Auch die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**ohne** B7-H1 Antikörper) wiesen eine größeren Produktion an KC gegenüber den aktivierten Splenozyten auf. Die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**mit** B7-H1 Antikörper) zeigten den größten Anteil an KC, wobei dieser Unterschied deutlich über den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**mit** B7-H1 Antikörper) und über den aktivierten Splenozyten lag.

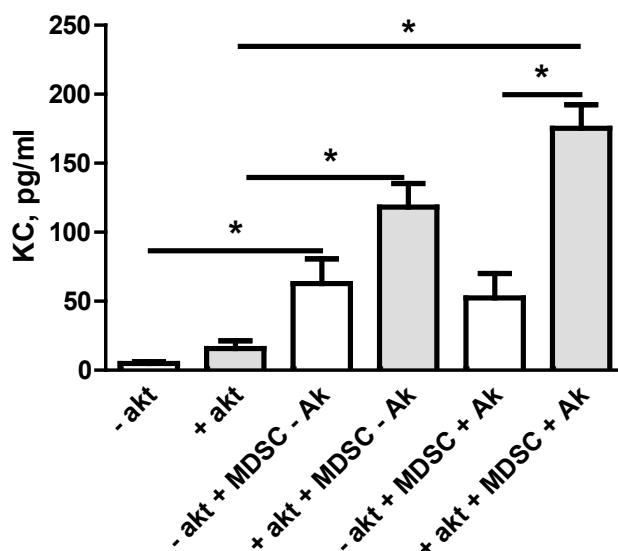


Abbildung 3.5.2-9 Quantifizierung der Produktion von KC (CXCL1) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05.

3.5.2.10 TNFα

Die letzte Luminex-Auswertung aus der Ko-Kultur der Splenozyten mit MDSC beschreibt die statistischen Unterschiede in der TNFα Produktion. Während die aktivierten Splenozyten einen signifikant höheren Wert gegenüber den nicht-aktivierten Splenozyten aufwiesen, ließen sie im Vergleich zu den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**ohne** B7-H1 Antikörper) einen deutlich geringeren Wert an TNFα erkennen. Bei den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC (**mit** B7-H1 Antikörper) konnte der größte Anteil an TNFα ausgemacht und gleichzeitig eine erkennbare Differenz bezüglich der nicht-aktivierten, ko-kultivierten

Splenozyten mit MDSC (**mit** B7-H1 Antikörper) und der aktivierten Splenozyten festgestellt werden.

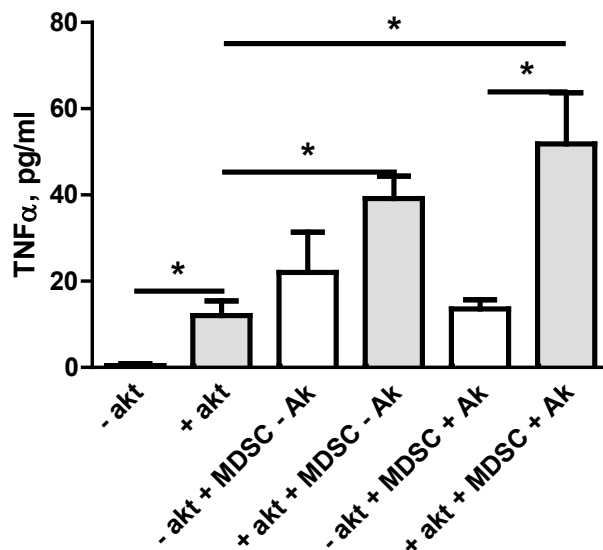


Abbildung 3.5.2-10 Quantifizierung der Produktion von TNFα aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05.

3.5.3 Bestimmung der Zytokine aus den Mediumüberständen der Proliferations-/Suppressionsanalyse aus Ko-Kulturen mit DC

Im Folgenden wurden die Mediumüberstände aus den Ko-Kulturen der Splenozyten mit DC von insgesamt 3 Durchläufen mit Hilfe der Luminex-Analyse auf bestimmte Zytokine bzw. Chemokine untersucht. Folgende 6 Ansätze wurden dabei miteinander verglichen: aktivierte und nicht-aktivierte Splenozyten, aktivierte und nicht-aktivierte ko-kultivierte Splenozyten mit DC (**+/-** B7-H1 Antikörper). Hierfür wurden eine magnetische TGFβ Platte und eine magnetische 7 Plex Platte verwendet.

3.5.3.1 IFNγ

Betrachtet man die statistische Auswertung des jeweiligen Anteils von IFNγ, so konnte eine deutliche Differenz und relativ geringe Produktion zwischen den aktivierten und den nicht-aktivierten Splenozyten nachgewiesen werden. Ebenso stellte man dies bei den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**ohne** B7-H1 Antikörper) im Vergleich zu den nicht-aktivierten Splenozyten fest, wobei erstere einen höheren Wert an IFNγ aufwiesen. Die höchste Produktion an IFNγ zeigten jedoch die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**ohne** B7-H1 Antikörper). Diese wiesen gleichzeitig einen signifikanten Unterschied zu den nicht-

aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**ohne** B7-H1 Antikörper), sowie zu den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**mit** B7-H1 Antikörper) auf. Abschließend konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC zu ihrem nicht-aktivierten Pendant gezeigt werden. Insgesamt wiesen die nicht-aktivierten Zellfraktionen gegenüber ihren jeweiligen aktivierten Zellfraktionen immer einen geringeren Wert an IFN γ auf.

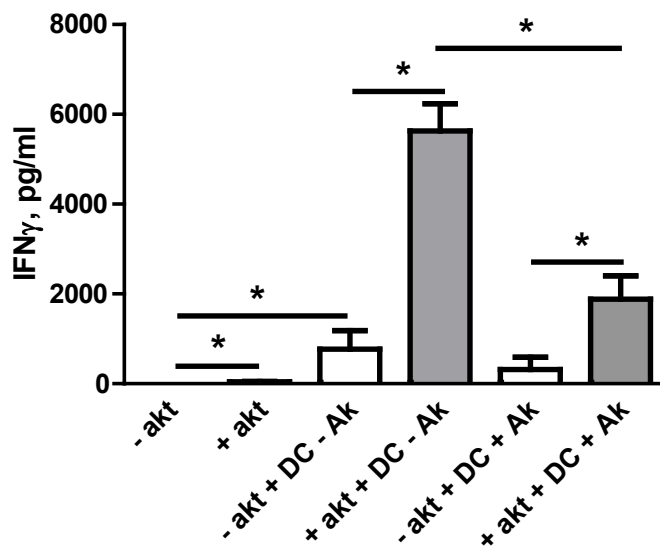


Abbildung 3.5.3-1 Quantifizierung der Produktion von IFN γ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05.

3.5.3.2 IL-2

Auffallend bei der statistischen Auswertung von IL-2 war, dass die aktivierten Splenozyten den höchsten Wert zeigten. Vor allem gegenüber den nicht-aktivierten Splenozyten ließ sich ein hoch signifikanter Unterschied erkennen, aber auch zu den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (+/- B7-H1 Antikörper) zeigten sie eine höhere Produktion an IL-2. Die Ko-Kulturen untereinander wiesen keine eindeutigen Abweichungen auf.

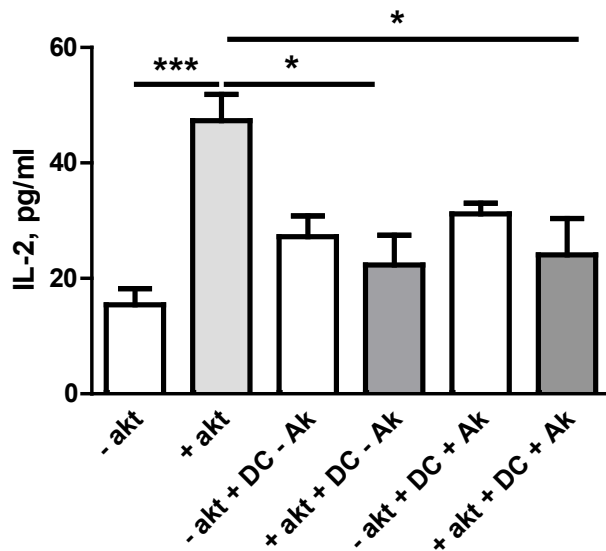


Abbildung 3.5.3-2 Quantifizierung der Produktion von IL-2 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

* $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$.

3.5.3.3 IL-10

Im Hinblick auf die nachfolgende Grafik konnten keine signifikanten Unterschiede in der Produktion von IL-10 zwischen den unterschiedlichen Ansätzen ausgemacht werden. Einzig und allein die Tendenz, dass die Ko-Kulturen einen gering höheren Anteil aufwiesen als die Splenozyten alleine, ist der Abbildung zu entnehmen.

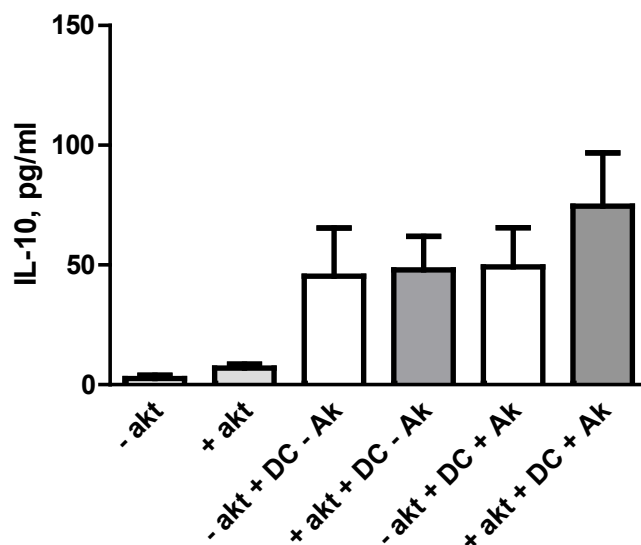


Abbildung 3.5.3-3 Quantifizierung der Produktion von IL-10 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

3.5.3.4 IL-17

Die Auswertung der Produktion von IL-17 ergab, dass die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (+/- B7-H1 Antikörper) einen deutlich höheren Wert an IL-17 aufwiesen als die restlichen Ansätze. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**mit** B7-H1 Antikörper) und den aktivierten Splenozyten, sowie den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**mit** B7-H1 Antikörper) festgestellt. Des Weiteren ergab sich eine deutliche Differenz in der Produktion von IL-17 zwischen den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**ohne** B7-H1 Antikörper) und den nicht-aktivierten Splenozyten. Zusätzlich zeigten die aktivierten Splenozyten gegenüber den nicht-aktivierten Splenozyten einen signifikant höheren Wert an.

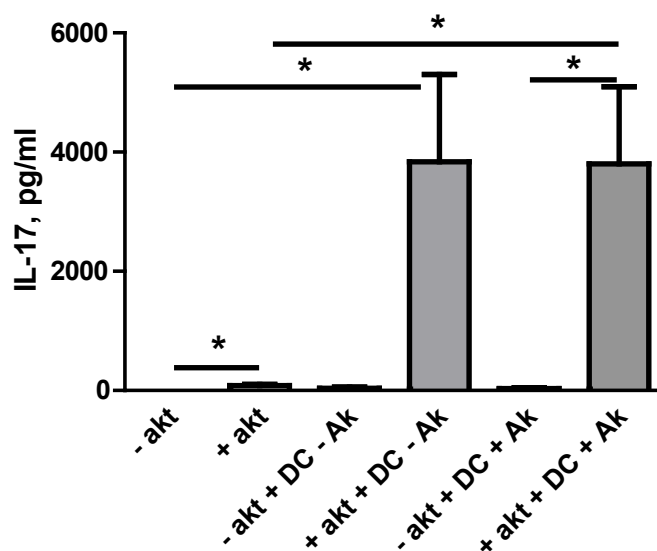


Abbildung 3.5.3-4 Quantifizierung der Produktion von IL-17 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p≤0,05.

3.5.3.5 IL-1β

Die Produktion von IL-1β zeigte keine deutlichen Abweichungen zwischen den einzelnen Zellpopulationen. Der höchste Wert wurde den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**mit** B7-H1 Antikörper) zugesprochen.

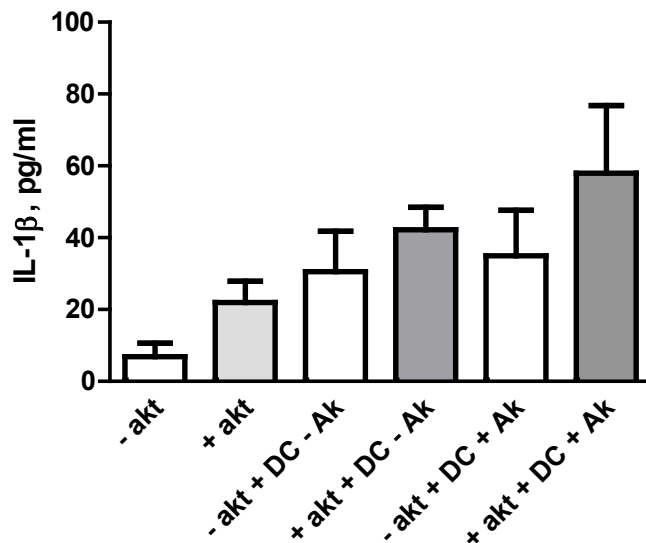


Abbildung 3.5.3-5 Quantifizierung der Produktion von IL-1 β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

3.5.3.6 IL-6

In dieser graphischen Darstellung zur Produktion von IL-6 fanden sich einige signifikante Unterschiede. Den geringsten Wert an IL-6 zeigten die nicht-aktivierten Splenozyten, gefolgt von den aktivierten Splenozyten. Hierbei wurde eine deutliche Abweichung der nicht-aktivierten bzw. aktivierten Splenozyten zu den nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**ohne** B7-H1 Antikörper) festgestellt. Des Weiteren konnte zwischen den aktivierten Splenozyten und den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**+/-** B7-H1 Antikörper) ein hoch signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Abschließend wurde der höchste Wert an IL-6 bei den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (**mit** B7-H1 Antikörper) nachgewiesen. Damit ist eine deutliche Differenz zu ihrem nicht-aktivierten Pendant erkennbar.

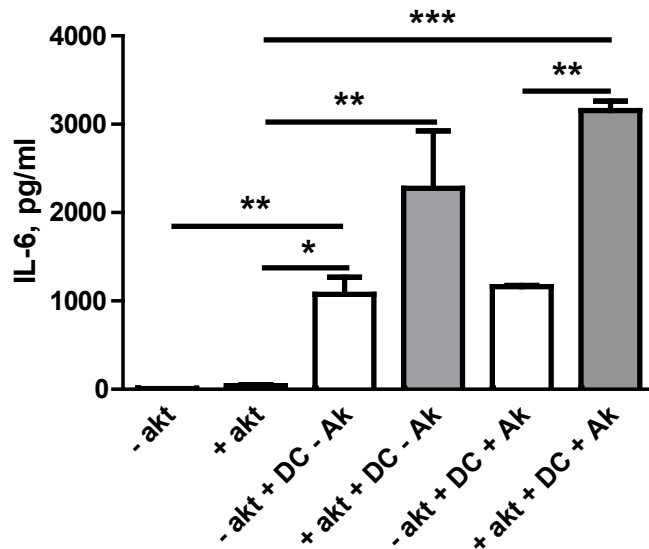


Abbildung 3.5.3-6 Quantifizierung der Produktion von IL-6 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p ≤ 0,05. **p ≤ 0,01. ***p ≤ 0,001.

3.5.3.7 TGFβ

Wie in der Abbildung zu sehen ist, befanden sich alle Ko-Kulturen und die nicht-aktivierten Splenozyten in Bezug auf ihre Produktion an TGFβ auf gleichem Niveau. Die aktivierten Splenozyten wiesen den geringsten Wert an TGFβ auf und es konnte eine Differenz zu den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (+/- B7-H1 Antikörper) nachgewiesen werden.

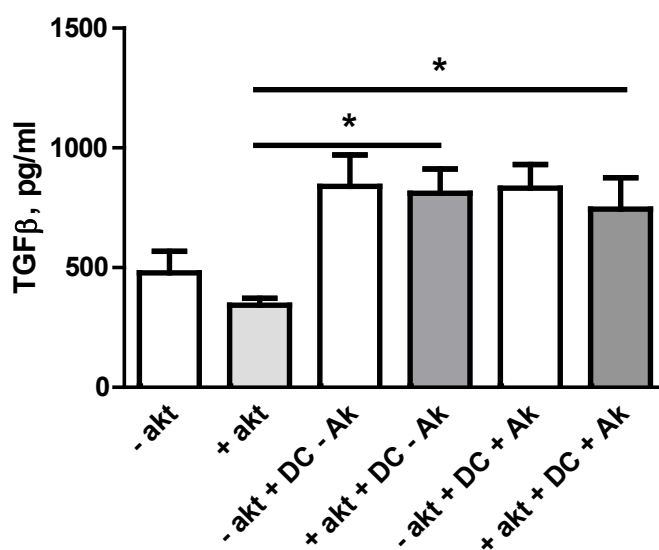


Abbildung 3.5.3-7 Quantifizierung der Produktion von TGFβ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

*p ≤ 0,05.

3.5.3.8 VEGF

In der letzten Luminex-Analyse über den prozentualen Anteil an VEGF der Mediumüberstände aus der Ko-Kultur der Splenozyten mit DC stellten sich einige signifikante Unterschiede heraus. Während die aktivierten und nicht-aktivierten Splenozyten eine relativ geringe Produktion an VEGF aufwiesen, zeigten die Ko-Kulturen der Splenozyten mit DC (+/- B7-H1 Antikörper) einen verhältnismäßig hohen Anteil, wobei der der nicht-aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC (+/- B7-H1 Antikörper) etwas darunter lag.

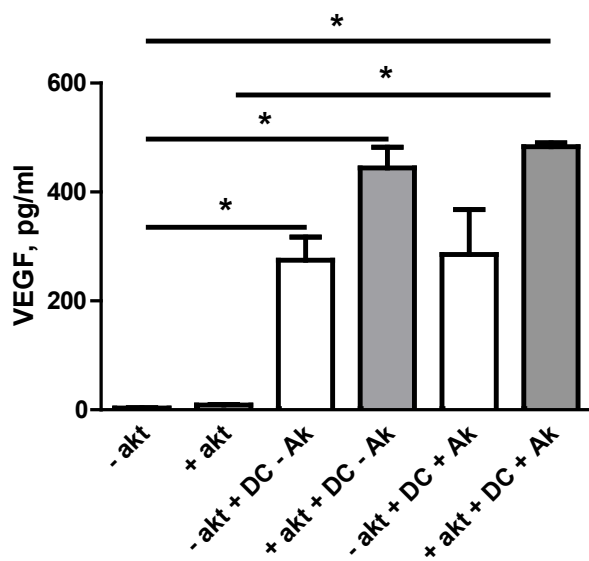


Abbildung 3.5.3-8 Quantifizierung der Produktion von VEGF aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)

* $p \leq 0,05$.

4 Diskussion

Aufgrund der schlechten Prognose, der hohen Mortalitätsrate und der geringen Chance auf Heilung durch oftmals zu spätes Erkennen, stellt das Pankreaskarzinom eine der gefürchtetsten Tumorerkrankungen dar. Deshalb ist es umso wichtiger, Behandlungsmethoden für diese Erkrankung zu verbessern und neue Therapien zu entwickeln. Das Ziel der Forschung an neuen Therapieansätzen, wie beispielsweise Immuntherapien, ist es, neue Methoden zur Behandlung des PaCa zu entwickeln und damit eine längere Überlebensrate der betroffenen Patienten zu ermöglichen. Um dieses Ziel zu erreichen, ist es wichtig das Immunsystem im Allgemeinen und das PaCa in seiner Anti-Tumor-Immunantwort zu verstehen. Dieses immunologische Verständnis bezieht sich sowohl auf die zelluläre, als auch auf die molekulare Ebene.

Die Eigenschaft des *Immun-Editings* ermöglicht es dem PaCa dem Immunsystem zu entkommen. Es kommt somit nicht nur zu einer Aktivierung des Immunsystems, wie unter anderem durch $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen bzw. DC, sondern das PaCa besitzt auch die Fähigkeit eine immunsuppressive Umgebung zu schaffen. Auf zellulärer Ebene handelt es sich bei diesen immunsuppressiven Mechanismen unter anderem um MDSC und T_{reg} , sowie auf molekularer Ebene um den PD-1 Rezeptor und seinen Liganden B7-H1 (oder auch PD-L1).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zusammenspiel dieser zellulären und molekularen Mechanismen sowohl an gesunden Mäusen, als auch im späteren Panc02 Modell genauer untersucht. Welche Rolle spielt das B7-H1 Molekül im gesunden Zustand und im Falle des PaCa? Hat eine Ausschaltung dieses Moleküls auf der Oberfläche von T_{reg} , MDSC oder DC eine Auswirkung auf das suppressive bzw. proliferative Verhalten dieser Zellpopulationen?

Das regulatorische Molekül B7-H1 (PD-L1) spielt eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Immunantwort, nicht nur im gesunden Zustand, sondern auch in pathologischen Geschehnissen, wie Autoimmunität, Infektionen oder Krebserkrankungen [84, 98]. B7-H1 KO-Mäuse stellen ein wichtiges Forschungsmodell zur Aufklärung von zellulären und molekularen Immunmechanismen dar, welche unter anderem an der Entwicklung und dem progressiven Verlauf des Tumorwachstums beteiligt sind [95].

Als ein bedeutender Teil des suppressiven Arms des Immunsystems wird der PD-1:PD-L1/PD-L2 Reaktionsweg beschrieben, der eine wesentliche Rolle in der

Regulierung der T-Zell-Aktivierung und –Toleranz übernimmt [84]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Wechselwirkungen –auch *immunological checkpoint* genannt- auf CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen zu einer Hemmung in ihrer Proliferation und ihrer Zytokinproduktion führten [88, 99, 100].

Es stellte sich die Frage, inwieweit eine B7-H1-Ausschaltung Auswirkungen auf den Phänotyp hat? Zeigen B7-H1 KO-Mäuse bereits im gesunden Zustand phänotypische Veränderungen?

Der Rezeptor CTLA-4 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell-Aktivierung und gilt als Gegenspieler der CD28-vermittelten Co-Stimulation. CTLA-4 KO-Mäuse zeigten akute und systemische Autoimmunerkrankungen, wie lymphoproliferative Erkrankungen mit multiorganlymphatischer Infiltration und Gewebszerstörung mit einer maximalen Lebenserwartung von 3-4 Wochen [101, 102]. Auch transgene Mäuse, bei denen der PD-1 Rezeptor ausgeschaltet wurde (PD-1 KO-Mäuse), entwickelten charakteristische lupus-ähnliche Autoimmunerkrankungen, wie proliferative Arthritis und Glomerulonephritis [86, 103]. Die Liganden B7-DC (PD-L1) und B7-H1 übernehmen mit der Bindung an ihren Rezeptor PD-1 eine wichtige Rolle in der Regulierung der Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase. B7-DC KO-Mäuse zeigten kaum augenscheinlich wahrnehmbare phänotypische Veränderungen, nur in einer Studie über ein bestimmtes murines Asthmakrankheitsmodell konnte eine stärkere Entzündung der Atemwege bei den B7-DC defizienten Mäusen nachgewiesen werden [104]. Obwohl sich zwischen den gesunden B7-H1 KO-Mäusen und den gesunden WT-Mäusen keine deutlichen phänotypischen Unterschiede ausmachen lassen, so konnten in unserer Studie eindeutige Differenzen in den immunologischen Parametern der beiden Mausstämmen aufgezeigt werden [105]. Es wurde unter anderem die Expression des Rezeptors PD-1 auf CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen, vergleichend zwischen den beiden Mausstämmen, untersucht. Dabei konnte erstmalig ein deutlicher Anstieg in der Zahl der PD-1⁺ Zellen der B7-H1 KO-Mäusen beobachtet werden. Auch einen signifikant höheren Wert in der Gesamtzahl der PD-1 Moleküle, welche über den MFI-Wert ermittelt wurden, konnten den B7-H1 KO-Mäusen zugeschrieben werden. Dieses Phänomen konnte außerdem bei den T_{reg} und den T_{con} festgestellt werden. Die NK-Zellen wiesen zwar einen Anstieg in der Expression von PD-1 auf, nicht aber in der Gesamtzahl der PD-1 Moleküle (MFI). Einzig bei den NKT-Zellen lag der prozentuale

Anteil von PD-1 auf ähnlich hohem Niveau verglichen mit den WT-Mäusen. Hier konnte jedoch eine deutlich höhere Intensität der PD-1 Expression, welche durch den MFI-Wert reflektiert wird, beobachtet werden. Diese Erkenntnisse über den PD-1 Rezeptor der B7-H1 KO-Mäuse lassen die Vermutung zu, dass der Organismus versucht, die Abwesenheit des Liganden PD-L1 zu kompensieren, indem es zu einer gesteigerten Expression von PD-1 kommt. Dadurch soll die Verfügbarkeit von PD-1 für die anderen Liganden, beispielsweise PD-L2 erhöht werden, um somit wieder den ursprünglichen Zustand der Immunregulation herzustellen, wie es bei den WT-Mäusen der Fall ist. Um diese Vermutung zu bestärken, sollte zukünftig in weiteren Studien über PD-L2 eingehender geforscht werden.

Des Weiteren konnte in meiner Studie ein deutlicher Rückgang in der Gesamtzellzahl der NK- und NKT-Zellen der B7-H1 KO-Mäuse beobachtet werden. Warum es dazu kommt, bleibt unklar. NK- und NKT-Zellen zählen auf der einen Seite zu dem aktivierenden Arm des Immunsystems und bekämpfen Tumorzellen und virusinfizierte Zellen. Sie besitzen jedoch auch regulatorische Funktionen [105]. Eine mögliche Erklärung für die Verminderung der Zellzahl könnte ein Anstieg der T_{reg} in B7-H1 KO-Mäusen sein. Wie bereits in einigen *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt wurde, können T_{reg} einen inhibierenden Einfluss auf NK-Zellen ausüben [106-108]. Ähnliches konnte auch für NKT-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus können NKT-Zellen auch eine Anhäufung von T_{reg} bewirken, was wiederum eine Hemmung dieser Zellen über einen erforderlichen Zell-Zell-Kontakt zur Folge hat [109, 110]. Zusätzlich konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass B7-H1 KO-Mäuse eine gesteigerte Anzahl an T_{reg} aufweisen, was ebenfalls für eine Reduzierung der Zellzahl der NK- und NKT-Zellen spricht [105]. Dieser Mechanismus der Immunregulation könnte somit als eine Art Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität fungieren.

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist der Aktivitätsstatus der unterschiedlichen Immunzellen im Vergleich beider Mausstämmen. Dieser wurde anhand der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 analysiert. Hierbei wiesen die WT-Mäuse im Vergleich zu den B7-H1 KO-Mäusen einen signifikant höheren Wert in der Expression von CD69 der NKT-Zellen auf. Dieses Resultat steht im Einklang mit folgender Erkenntnis, dass die $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen der B7-H1 KO-Mäuse eine

niedrigere Intensität –gemessen am MFI-Wert- in der Expression von CD69 aufwiesen.

All diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung des B7-H1 Moleküls und es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sich durch einen Mangel von B7-H1 *in vivo* einige immunologische Parameter deutlich verändern. Diese von uns festgestellten Veränderungen weisen darauf hin, dass verschiedene Mechanismen in den B7-H1 KO-Mäusen ablaufen, die darauf abzielen, durch kompensatorische Vorgänge die ursprüngliche Situation und das Gleichgewicht zwischen Immunstimulation und –suppression wieder herzustellen, so wie sie bei den WT-Mäusen vorzufinden ist [105].

Die vorliegenden *ex vivo*, an gesunden Mäusen erzielten Ergebnisse, zeigen die Wichtigkeit der Anwesenheit des B7-H1 Moleküls für die anderen immunologischen Parameter auf und verdeutlichen zudem die Notwendigkeit weiterer Forschungsarbeiten unter Berücksichtigung der Resultate bei der Übertragung auf das PaCa.

Die zelluläre und molekulare Ebene der immunsuppressiven Mechanismen und deren Zusammenspiel stellen einen weiteren wichtigen Aspekt dar, der genauer untersucht werden sollte, um ein Verständnis über die Komplexität der Tumorummunologie des PaCa zu entwickeln. Hierfür müssen die Zusammenhänge vorerst auf gesunden Mäusen untersucht werden, woraufhin sie dann auf das Tumormodell des PaCa übertragen werden können. Zu diesem Zweck wurde die Rolle des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche der T_{reg} genauer untersucht. Den T_{reg} wird ein immunsuppressives Potential zugeschrieben, wodurch sie die Selbsttoleranz des Immunsystems regulieren und folglich unter anderem das Entstehen von Autoimmunerkrankungen und Allergien verhindern. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich T_{reg} in der Umgebung von Tumoren, wie auch im PaCa, akkumulieren [69, 73, 74]. Könnte das B7-H1 Molekül im Zusammenspiel mit den T_{reg} eine wichtige Rolle bezüglich des Suppressionspotentials der T_{reg} übernehmen?

Um diese Frage zu beantworten wurde im nächsten Teil meiner Studie untersucht, inwieweit das B7-H1 Molekül an der Suppression der T-Zellen beteiligt ist. Dies erfolgte durch eine Ausschaltung des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche der T_{reg}. Zusammenfassend konnte das zu erwartende suppressive Verhalten der T_{reg} durch die Zugabe der T_{reg} zu den Splenozyten bestätigt werden, indem sowohl den CD4⁺

als auch den CD8⁺ T-Zellen eine deutlich geringere Teilungsaktivität nachgewiesen werden konnte. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied im Suppressionspotential bei einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche der T_{reg} festgestellt werden.

Zusätzlich wurde im selben Experiment der Aktivierungsgrad der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen anhand der Expression von CD69 untersucht. Zusammenfassend konnte hier erwartungsgemäß sowohl bei den CD4⁺ T-Zellen, als auch bei den CD8⁺ T-Zellen ein deutlicher Unterschied im Aktivierungsgrad festgestellt werden. Die durch CD3/CD28 aktivierten Zellfraktionen proliferierten deutlich gegenüber den jeweiligen nicht-aktivierten Fraktionen. Jedoch war kein abweichendes Ergebnis bei einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche der T_{reg} im Vergleich zu keiner Ausschaltung festzustellen.

Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil von CD25 der CD8⁺ T-Zellen untersucht. Der signifikante Unterschied und höhere Anteil der aktivierten Zellpopulationen gegenüber den nicht-aktivierten entsprach den Erwartungen. Abermals konnte kein Unterschied bei einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche der T_{reg} durch Verwendung des B7-H1 Antikörpers festgestellt werden.

Zusammenfassend wurde somit das suppressive Potential der T_{reg} bestätigt, jedoch konnte entgegen der Erwartungen keine Veränderung bei einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche der T_{reg} festgestellt werden. Folglich nimmt das B7-H1 Molekül keinen Einfluss auf das Suppressionspotential der T_{reg}. Kann dagegen eine B7-H1-Ausschaltung auf den T_{reg} einen Effekt auf die Zytokinproduktion ausüben?

Diese Frage wurde im Folgenden beantwortet. Mit Hilfe der Luminex-Analyse wurde die Produktion von Zytokinen bzw. Chemokinen und Wachstumsfaktoren aus den Mediumüberständen der Proliferations-/Suppressionsanalyse der Ko-Kulturen von Splenozyten mit T_{reg} untersucht. Sie sind für die Regulation von Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen verantwortlich, besitzen antiinflammatorische bzw. proinflammatorische Wirkungen und spielen somit eine wichtige Rolle in immunologischen Prozessen, weshalb ein Augenmerk in dieser Studie auf sie gerichtet war. Bei IFN γ handelt es sich um ein Zytokin mit proinflammatorischen Eigenschaften, welches v.a. von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen produziert wird [111]. Die Produktion von IFN γ wird wiederum durch die Zytokine IL-12 und IL-18 kontrolliert. Sie fungieren als eine Art Bindeglied, indem sie eine Infektion mit der

Produktion von IFN γ und damit dem angeborenen Immunsystem verknüpfen. Zu den negativen Regulatoren der IFN γ Produktion zählen unter anderem IL-4, IL-10 und TGF β [111]. In meinen Ergebnissen konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass die Produktion an IFN γ in den durch CD3/CD28 aktivierten Splenozyten deutlich gegenüber allen anderen Zellpopulationen erhöht war. Durch die Zugabe der T $_{reg}$ zu den Splenozyten konnte ein deutlicher Rückgang der Produktion von IFN γ verzeichnet werden. Eine solche Verminderung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch die Zugabe der T $_{reg}$ zu den Splenozyten eine Inhibierung der IFN γ Produktion hervorgerufen wurde. Dies konnte beispielsweise in einer Studie durch Sojka et al. bestätigt werden, in der ebenfalls T $_{reg}$ einen Rückgang der IFN γ Produktion induzierten [112]. Jedoch konnte kein Unterschied bei einer B7-H1-Ausschaltung bezüglich der IFN γ Produktion ausgemacht werden.

Im Jahre 1975 wurde das Zytokin IL-2 entdeckt und erstmals durch Morgan et al. als ein wachstumsstimulierender Faktor für T-Lymphozyten aus dem Knochenmark beschrieben [113]. Als eine der Hauptfunktionen dieses sog. T-Zell-Wachstumsfaktors („T cell growth factor“ - TCGF) gilt das Vorantreiben der Proliferation und Differenzierung der CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen [114]. Die in meiner Studie erarbeiteten Ergebnisse zeigten erwartungsgemäß, dass die durch CD3/CD28 aktivierten Splenozyten die höchste Produktion an IL-2 aufwiesen und diese damit auch deutlich über der der anderen Zellpopulationen lag. Dies lässt sich dadurch begründen, dass IL-2 v.a. von CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T-Zellen gebildet wird [114]. Des Weiteren konnte durch die Zugabe der T $_{reg}$ ein deutlicher Rückgang in der Produktion von IL-2 beobachtet werden. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass T $_{reg}$ die Fähigkeit besitzen die Sekretion von IL-2 zu hemmen [42]. Zusätzlich konnte den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit T $_{reg}$ (ohne B7-H1 Antikörper) eine deutlich höhere Konzentration an IL-2 gegenüber der Ko-Kultur mit B7-H1 Antikörper zugeschrieben werden. Dieses Resultat steht in Einklang mit der Studie aus dem Jahre 2010 durch Channappanavar R. und Suvas S., in der unter anderem beschrieben wird, dass eine Steigerung der Expression von PD-1 auf den T $_{reg}$ mit einer Reduzierung der Produktion von IL-2 einhergeht. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass IL-2 somit die Expression von PD-L1 auf den T $_{reg}$ hemmt [115]. Darüber hinaus kann das B7-H1 Molekül auch die Produktion von IL-2 kontrollieren [105].

IL-6 (alternativ auch Interferon- β_2 , B-Zell-stimulierender Faktor (BSF-2) oder Hybridoma-Plasmazytoma-Wachstumsfaktor (HPGF) genannt) ist ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Expression unter anderem durch Virusinfektionen hervorgerufen wird. Des Weiteren wird die Produktion von IL-6 durch verschiedene andere Zytokine, wie IL-1, IFN γ oder TNF α induziert. IL-6 verknüpft die angeborene mit der erworbenen Immunantwort, indem es an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist und spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Produktion von Antikörpern [116]. Die Analyse meiner Ergebnisse ergab, dass die durch CD3/CD28 aktivierten Splenozyten gegenüber allen anderen Zellfraktionen eine deutlich höhere Produktion an IL-6 gezeigt haben. Ein denkbarer Grund hierfür ist, dass IL-6 ferner an der T-Zell-Aktivierung und –Differenzierung beteiligt ist und es folglich durch die Aktivierung der Proliferation der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen zu einem Anstieg in der Produktion von IL-6 kam [116]. Meine Ergebnisse haben außerdem gezeigt, dass durch die Zugabe der T_{reg} zu den Splenozyten auch gleichzeitig eine Suppression der IL-6 Produktion hervorgerufen wurde. Jedoch konnte kein Unterschied bei einer B7-H1-Ausschaltung beobachtet werden.

Im Jahre 1993 wurde das Zytokin IL-17 entdeckt und zum ersten Mal beschrieben. Es wird von Th17-Zellen exprimiert und übernimmt damit auch eine zentrale Rolle im Th17-System. Es konnte gezeigt werden, dass es die Expression von IL-6, IL-8 und G-CSF in Zellen wie Fibroblasten und Epithelzellen induziert. Weiterhin ist IL-17 in die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen verwickelt [117].

Eine Studie über humane Th17-Zellen besagt, dass IL-17 unter anderem durch FoxP3-exprimierende T_{reg} produziert werden kann [118]. Die Ergebnisse meiner Studie hingegen zeigten nach Zugabe der T_{reg} zu den Splenozyten einen signifikanten Rückgang in der Produktion von IL-17 auf. Diese Erkenntnis wird durch folgende Studie belegt, in der beschrieben wird, dass Th17-Zellen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis durch T_{reg} kontrolliert bzw. gehemmt werden [119].

IL-17 wird vorwiegend von Th17-Zellen zusammen mit IFN γ produziert [118, 120]. Wie bereits zuvor beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die durch CD3/CD28 aktivierten Splenozyten die höchste Konzentration an IFN γ aufwiesen und es durch Zugabe der T_{reg} zu einer Suppression in der Produktion kam. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass IL-17 in Parallele zu IFN γ produziert wird und es somit ebenfalls zu einer Verringerung in seiner Produktion kommt.

Allerdings konnte entgegen aller Erwartungen –gleichermaßen wie bei der Untersuchung des proliferativen Verhaltens der mit T_{reg} ko-kultivierten $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen- kein Unterschied bei einer B7-H1-Ausschaltung auf T_{reg} nachgewiesen werden.

Auf zellulärer Ebene spielen darüber hinaus die MDSC mit ihrem immunsuppressiven Potential und die T-Zellen mit ihrer Empfänglichkeit gegenüber MDSC vermittelter Suppression eine wichtige Rolle in der Anti-Tumor-Immunantwort des PaCa. In einer weiteren Versuchsreihe meiner Studie wurde die Bedeutung des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche von MDSC genauer untersucht und anhand der Fragestellung, inwieweit dieses Oberflächenmolekül an dem Suppressionspotential der MDSC beteiligt ist, erarbeitet. Bei den MDSC handelt es sich ursprünglich um eine heterogene Gruppe von Zellen myeloiden Ursprungs, welche sich bei dem Einstellen eines pathologischen Zustandes (Sepsis, Krebs oder infektiöses Geschehen etc.) nicht zu reifen, spezialisierten Zellen differenzieren, sondern zu MDSC [79].

Das Suppressionspotential der MDSC wurde anhand der Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen nach Aktivierung mit Hilfe der CD3/CD28 Antikörper bestimmt. Im ersten Teil meiner Versuchsreihe erfolgte ein Vergleich zwischen dem suppressiven Verhalten der MDSC aus Tumoren und dem Knochenmark. In einer Studie aus dem Jahre 2012 und in unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit PaCa nicht nur auf Seiten des Tumors zu einem Anstieg der MDSC kam, sondern auch im Knochenmark und im peripheren Blut, welche ebenfalls das Tumorstadium begünstigen [121, 122]. Dies bestätigt das vorliegende Ergebnis, welches keinen signifikanten Unterschied im Suppressionspotential der MDSC aus Tumoren und Knochenmark, bezogen auf die $CD4^+$ T-Zellen, zeigte. Deshalb wurde aus versuchstechnischen Gründen in den folgenden Versuchen die MDSC aus den Tumoren isoliert.

In meinem nächsten Arbeitsschritt wurde das suppressive Verhalten der MDSC eingehender untersucht, indem das proliferative Verhalten der $CD4^+$ T-Zellen analysiert wurde. Dabei sollte ebenfalls eine eventuelle Beteiligung des B7-H1 Moleküls an diesem suppressiven Verhalten geprüft werden. Die Auswertung der einzelnen CFSE-Peaks bestätigte, dass die aktivierten Zellfraktionen im Gegensatz zu den nicht-aktivierten Zellen eine deutliche Teilungsaktivität aufwiesen. Zusätzlich wurde das proliferative Verhalten der $CD4^+$ T-Zellen durch die Zugabe der MDSC

deutlich supprimiert. Diese Erkenntnis wurde bereits in einigen Studien bestätigt, unter anderem indem die Suppression der antigenspezifischen, T-Zell-vermittelten Immunantwort nachgewiesen wurde [123]. Dass es zu keiner Veränderung in der Suppression der MDSC durch Blockade des B7-H1 Moleküls kam, stellt die Vermutung in Frage, dass dieses Oberflächenmolekül an der Suppression beteiligt ist.

Der Aktivierungsstatus der $CD4^+$ T-Zellen gilt als ein weiteres wichtiges Merkmal dieser Zellpopulation. Hierfür wurde der Aktivierungsgrad der $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 eingehend untersucht. Erwartungsgemäß zeigten die durch CD3/CD28 aktivierten Zellen gegenüber den nicht-aktivierten Zellen einen deutlich höheren Wert an. Sogar bei Betrachtung der nicht-aktivierten Zellpopulationen im Vergleich untereinander konnte ein deutlich geringerer Aktivierungsgrad nach Zugabe der MDSC zu den Splenozyten beobachtet werden. Jedoch war abermals kein Unterschied im suppressiven Verhalten nach Blockade des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche der MDSC zu beobachten.

Im anschließenden Abschnitt über MDSC wurden die Effekte der MDSC auf T_{reg} , T_{con} , aktivierte T_{con} und $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Zellen genauer untersucht. Eine Studie über das Melanom hat gezeigt, dass es durch eine Verringerung der T_{reg} zu einer Abnahme in der Expression unter anderem von B7-H1 auf MDSC gekommen ist [83]. Daher habe ich mir die Frage gestellt, inwieweit umgekehrt MDSC einen Einfluss auf T_{reg} nehmen können und welche Rolle dabei das B7-H1 Molekül spielt. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine Aktivierung der Zellen, wie es bei den T_{reg} und den aktivierten T_{con} der Fall ist, zu einer gesteigerten Expression von CD25 führte. Des Weiteren konnte bei den T_{reg} , den aktivierten T_{con} und den $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Zellen das vermutete suppressive Verhalten der MDSC bestätigt werden. Jedoch wurde wider Erwarten keinerlei Veränderung bei einer B7-H1-Ausschaltung beobachtet.

Abschließend wurden die Zytokine aus den Mediumüberständen der Ko-Kulturen mit MDSC mit Hilfe der Luminex-Analyse untersucht. Hierbei lag das Augenmerk auf den pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, welche oftmals in ein Tumorgeschehen involviert sind. VEGF (**V**ascular-**E**ndothelial-**G**rowth-**F**actor) gilt als ein wichtiges Signalmolekül in der Angiogenese und ist v.a. für die Stimulierung von Endothelzellen verantwortlich. Es konnte bereits im Jahre 1993 gezeigt werden, dass

es durch Verwendung von neutralisierenden Antikörpern bzw. von VEGF-Rezeptor-Blockern zu einer Blockade von VEGF in Endothelzellen von Tumor-assoziierten Blutgefäßen und damit zu einer Hemmung des Tumorwachstums gekommen ist. Das bedeutet, dass dadurch die Neubildung von Blutgefäßen in Tumoren inhibiert wurde, was sogar zu einer Rückbildung des Tumors führte [124]. Somit gilt VEGF als ein wichtiges Zytokin vor allem in der Tumorangiogenese. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass VEGF auf der einen Seite zu den Zytokinen gehört, welche die Expansion von MDSC induzieren und auf der anderen Seite aber auch von MDSC produziert werden [125, 126]. Dies steht im Einklang mit den gegenwärtigen Ergebnissen, bei denen durch die Anwesenheit der MDSC ein direkter Anstieg der VEGF Konzentration beobachtet wurde. Des Weiteren wurde ein deutlicher Anstieg an VEGF bei den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC mit B7-H1 Antikörper gegenüber der aktivierten Splenozyten beobachtet. Folglich könnte man daraus schließen, dass der B7-H1 Antikörper und damit die Anwesenheit von B7-H1, einen Einfluss auf die Regulation der Produktion von VEGF nimmt.

Chemokine zählen zu einer Gruppe der Zytokine und bestehen aus zwei großen Familien -die CXC oder α Chemokine und die CC oder β Chemokine- und aus zwei Unterfamilien -die C oder γ Chemokine und die CX3C oder δ Chemokine- [127]. In meiner Arbeit lag das Augenmerk auf den CXC Chemokinen, im Speziellen dem CXCL1 (auch KC genannt), da es eine wichtige Rolle unter anderem in entzündlichen Prozessen, in der Angiogenese und vor allem in der Tumorangiogenese und dem –wachstum übernimmt. In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Produktion von CXCL1 im Tumorgeschehen *in vivo* und *in vitro* deutlich anstieg, wie beispielsweise im Melanom, Harnblasenkarzinom und Brustkrebs [128-130]. Die vorliegenden Resultate bestätigen diese Befunde: Durch Zugabe der MDSC (aus PaCa-Tumoren isoliert) zu den Splenozyten konnte ein deutlicher Anstieg in der Produktion an CXCL1 nachgewiesen werden. Waren die Splenozyten zuvor durch CD3/CD28 aktiviert, so war der Anstieg an CXCL1 noch deutlicher. Der höchste Wert an CXCL1 war den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC mit B7-H1 Antikörper zuzuschreiben und lag deutlich über dem der aktivierten Splenozyten. Somit erhärtet sich auch bei CXCL1 die Vermutung, dass das B7-H1 Molekül an der Regulation verschiedener Zytokine beteiligt sein könnte.

Betrachtet man in der gleichen Serie dieses Experiments die proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und IL-17, so wurden bei allen dreien ähnliche Beobachtungen gemacht. Zusammenfassend wiesen alle mittels CD3/CD28 Antikörper aktivierten Zellfraktionen gegenüber ihren nicht-aktivierten Pendants einen signifikant höheren Wert auf. Zusätzlich zeigten die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC mit B7-H1 Antikörper bei der Auswertung der IFN γ Produktion die höchste Konzentration auf. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Daten der Studie aus dem Jahre 2009 über das murine Pankreastumormodell. Darin wurde bei der Blockade des B7-H1 Moleküls *in vivo* mit Hilfe von Antikörpern ein signifikanter Anstieg in der IFN γ Konzentration festgestellt [93]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das B7-H1 Molekül auch im PaCa eine wichtige Rolle in der IFN γ Produktion übernimmt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Neutralisierung von IL-17 durch Verwendung von Antikörpern das Tumorwachstum hemmt und im Gegensatz dazu eine Verabreichung von IL-17 dieses wiederum steigert. Darüber hinaus wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass IL-17 für die Entwicklung und die wachstumsfördernde und immunsuppressive Aktivität der MDSC auf Seiten des Tumors erforderlich ist [131]. Es erhärtet sich somit die Vermutung, dass es im Umkehrschluss durch die Zugabe der MDSC (aus Tumoren isoliert) zu den Splenozyten zu einem Anstieg der Konzentration von IL-17 kommt.

Zusammenfassend konnte bei meinen Untersuchungen festgestellt werden, dass es keinen Unterschied im Suppressionspotential der MDSC bei einer B7-H1-Ausschaltung gab. Zusätzlich zu den bereits bekannten Zytokinen, wie IFN γ und IL-2, erhärtet sich jedoch die Vermutung, dass das B7-H1 Molekül einen Einfluss auf die Regulation weiterer Zytokine nimmt, wie es beispielsweise erstmals bei VEGF oder CXCL1 nachgewiesen werden konnte.

Von großer Bedeutung für die Anti-Tumor-Immunantwort sind auf zellulärer Ebene die DC. Hierfür wurde das stimulierende Potential der aus Tumoren gewonnenen DC auf CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen eingehend untersucht. Um zu sehen, ob das B7-H1 Molekül einen Einfluss auf dieses Potential nimmt, erfolgte seine Ausschaltung auf der Oberfläche eines Teils der DC durch Verwendung des B7-H1 Antikörpers.

Die DC gelten als eine Art Bindeglied, da sie zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort vermitteln. Sie übernehmen eine Schlüsselrolle als antigenpräsentierende Zellen, aktivieren naive T-Zellen und sind imstande eine

primäre Immunantwort zu induzieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige Zytokine, wie beispielsweise $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder IL-6 , den Reifungsprozess der DC beeinflussen [132]. Obwohl die Rolle des B7-H1 Moleküls in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt wurde, ist seit einiger Zeit bekannt, dass es unter anderem auf der Oberfläche der DC exprimiert wird und ihre Stimulationsfähigkeit bezüglich der T-Zellen beeinflusst [99, 100, 133]. Des Weiteren konnte in Patienten mit PaCa bereits gezeigt werden, dass das stimulierende Potential der DC reduziert ist [134]. Aus diesem Grund beschäftigt sich der folgende Abschnitt der Studie zudem mit der Frage, welchen Einfluss das Oberflächenmolekül B7-H1 auf das aktivierende Verhalten der DC im speziellen Fall des PaCa nimmt.

Im ersten Teil meiner Proliferationsanalyse der Ko-Kultur mit Splenozyten und DC, konnte auf den CD4^+ T-Zellen eine deutliche Aktivierung der Proliferation durch die Zugabe der DC (ohne B7-H1 Antikörper) nachgewiesen werden. Somit wurde die Vermutung bestätigt, dass DC auch im Tumorgeschehen des PaCa ein stimulierendes Verhalten zeigen, auch wenn dieses nicht so stark ausgeprägt ist, wie im gesunden Zustand. Wie durch Freeman bereits gezeigt wurde, ist es durch die Bindung des B7-H1 Moleküls auf der Oberfläche der DC an seinem Rezeptor PD-1 möglich, auf die T-Zellen einen supprimierenden Effekt auszulösen [54, 99]. Überraschenderweise konnte dieses Verhalten in meiner Studie auf den CD4^+ T-Zellen nicht beobachtet werden. Ganz im Gegenteil kam es bei der Blockade des B7-H1 Moleküls zu keiner Verstärkung des aktivierenden Verhaltens der DC. Allem Anschein nach könnte die Ursache dafür die Isolierung der DC aus dem PaCa sein, da sie bereits unter dem Einfluss des Tumormilieus standen.

Als ein weiterer bedeutender Aspekt gilt der Aktivierungsstatus der $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T-Zellen, der mit Hilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 untersucht wurde. Hierbei wiesen die durch $\text{CD3}/\text{CD28}$ aktivierten Zellfraktionen einen signifikant höheren Wert als die nicht-aktivierten auf. Der stärkste Aktivierungsgrad war den aktivierten Splenozyten zuzuschreiben und lag deutlich über dem der aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC. Es bleibt unklar, weshalb es zu einer Reduktion der Expression von CD69 auf den CD4^+ T-Zellen durch die Ko-Kultivierung mit den DC gekommen ist. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass diese aufgrund ihrer Isolation aus den Tumoren von dem vorherrschenden, tumorsuppressiven Milieu beeinflusst wurden.

Zusätzlich lag ein Augenmerk auf der Expression von CD25 sowohl auf den CD4⁺ als auch auf den CD8⁺ T-Zellen. Hier konnte die Erwartung bestätigt werden, dass es durch die Aktivierung mittels der CD3/CD28 Antikörper auch zu einem Anstieg in der Expression von CD25 gekommen ist. Abermals konnte keine Abweichung im Stimulationspotential der DC bei einer B7-H1-Ausschaltung auf der Oberfläche der DC beobachtet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die DC auch im Tumorgeschehen des PaCa ein aktivierendes Verhalten zeigen, auch wenn dieses nicht so stark ausgeprägt ist wie im gesunden Zustand. Zusätzlich konnte weder bei der Untersuchung des proliferativen Verhaltens, noch beim Aktivierungsstatus der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen kein Unterschied bei einer B7-H1-Ausschaltung auf den DC festgestellt werden.

Zuletzt wurden die Mediumüberstände der Ko-Kultur der Splenozyten mit DC auf ihre Zytokine mit Hilfe der Luminex-Analyse untersucht. Nimmt das B7-H1 Molekül einen Einfluss auf die Regulation bestimmter Zytokine, sofern es auf aus Tumoren isolierten DC exprimiert wird?

Betrachtet man die Konzentration des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2, so ist erwartungsgemäß die Höchste den aktivierten Splenozyten zuzuschreiben. Durch die Aktivierung mittels der CD3/CD28 Antikörper stiegen die Proliferation und damit auch der Wert von IL-2. Es konnte in den letzten Jahren die Erkenntnis gewonnen werden, dass IL-2 vor allem für die T-Zell-Proliferation verantwortlich ist, aber auch von T-Zellen produziert werden kann. IL-2 kann aber auch von anderen Zelltypen produziert werden, wie unter anderem durch die DC. Welche Rolle IL-2 dabei spielt bleibt jedoch unklar [135]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC sowohl mit als auch ohne B7-H1 Antikörper eine deutlich geringere Produktion von IL-2 gegenüber den aktivierten Splenozyten aufwiesen. Dieses Resultat lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass IL-2 zwar von DC produziert werden kann, jedoch wurde die Expression von IL-2 in diesem Fall nicht in dem Umfang durch die DC verstärkt, wie es bei den CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen der Fall ist. Dies ist schätzungsweise davon anhängig, woraus die DC isoliert wurden, nämlich aus Tumoren.

IL-6 gilt als einer der Hauptregulatoren in der Differenzierung der DC. Der Reifungsprozess der DC steht im Zusammenhang mit einer Hochregulierung der

MHC II-Moleküle, kostimulatorischer Faktoren und nachfolgend der Sekretion von Zytokinen, wie unter anderem IL-6. Folglich wurde gezeigt, dass die reifen DC große Mengen dieses proinflammatorischen Zytokins produzieren [136, 137]. Dieser Befund steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen meiner Studie. Darin wurde ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Konzentration von IL-6 nach Zugabe der DC zu den Splenozyten festgestellt. Die durch die CD3/CD28 Antikörper aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC zeigten im Gegensatz zu den aktivierten Splenozyten die höchste Produktion von IL-6. Jedoch konnte kein Unterschied bei der Blockade von B7-H1 festgestellt werden.

Bei TGF β handelt es sich um ein Zytokin, welches die Proliferation von T-Zellen hemmt und eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz übernimmt [138]. In einer Studie über das Lungenkarzinom konnte gezeigt werden, dass humane DC zu einer Steigerung der TGF β Expression beitrugen, sofern sie Zellen des Lungenkarzinoms ausgesetzt wurden [139]. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen meiner Studie, in der eine deutlich höhere Konzentration an TGF β bei den aktivierten, ko-kultivierten Splenozyten mit DC –sowohl mit, als auch ohne B7-H1 Antikörper- im Vergleich zu den aktivierten Splenozyten alleine nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse meiner Studie zeigen, dass es zu einem starken Anstieg in der Produktion von VEGF bei den Ko-Kulturen der Splenozyten mit DC, im Gegensatz zu den aktivierten und nicht-aktivierten Splenozyten, kam. Eine mögliche Erklärung für die Steigerung der VEGF Konzentration könnte die Isolation der DC aus PaCa-Tumoren sein, wo VEGF bekanntlich sehr präsent ist und eine bedeutende Rolle spielt.

Betrachtet man alle zuvor beschriebenen und diskutierten Resultate dieser Studie über die Wechselwirkung, den sog. *immunological checkpoint*, des PD-1:PD-L1 Reaktionsweges, so wird deutlich, dass eine B7-H1-Ausschaltung sowohl im gesunden Zustand, als auch im Speziellen Fall des PaCa, einen gravierenden Einfluss auf einige immunologische Parameter nimmt. Dieser Einfluss konnte bei der B7-H1-Ausschaltung sowohl durch Verwendung von B7-H1 KO-Mäusen beobachtet werden aber auch durch Blockade dieses Moleküls mithilfe des B7-H1 Antikörpers.

Die Vermutung, dass das B7-H1 Molekül einen Einfluss auf das suppressive bzw. proliferative Verhalten der verschiedenen Immunzellen (T_{reg}, MDSC und DC) nimmt,

konnte jedoch nicht bestätigt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass es bei der Regulation der Zytokinproduktion von großer Bedeutung ist, da es Einfluss auf mehrere Zytokine nahm, als bisher vermutet. Des Weiteren wurde das suppressive Verhalten der MDSC im PaCa bestätigt und auch bei den DC wurde nachgewiesen, dass sie im PaCa ebenfalls ein stimulierendes Verhalten aufweisen können. All diese Erkenntnisse sind sehr wichtig für das PaCa und stellen die Forschung im Bereich Tumorimmunologie und Immuntherapie vor neue Fragestellungen und Ansatzpunkte.

5 Zusammenfassung

Das immunsuppressive B7-H1 Molekül bei regulatorischen T-Zellen, suppressiven Zellen myeloider Abstammung und dendritischen Zellen in antitumoraler Immunantwort beim Pankreasadenokarzinom

Das Pankreasadenokarzinom (PaCa) zeichnet sich durch eine sehr schlechte Prognose aus, die mit einer geringen Überlebensrate aufgrund der oftmals zu späten Diagnose einhergeht. Des Weiteren sind sein aggressives Wachstumsverhalten, die hohe Metastasierungsrate und das geringe Ansprechen auf eine Bestrahlungs- oder Chemotherapie charakteristisch für das PaCa.

Aus diesen Gründen wird dringend nach neuen Therapieansätzen gesucht, wobei die Immuntherapie eine neue Möglichkeit der Behandlung des PaCa darstellt. Um auf diesem Gebiet Fortschritte zu erzielen, müssen zuerst die immunologischen Zusammenhänge nicht nur im gesunden Zustand, sondern auch im Fall des PaCa verstanden werden. Das Immunsystem weist sowohl einen aktivierenden, als auch einen supprimierenden Arm auf, um über ihr Zusammenwirken ein Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Ein bekanntes Beispiel für den supprimierenden Arm des Immunsystems, stellt der PD-1:PD-L1 Reaktionsweg dar.

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Expression des Rezeptors PD-1 auf verschiedenen Immunzellen untersucht und der Einfluss, den das B7-H1 Molekül dabei nimmt. Dies geschah *in vivo* unter Verwendung gesunder B7-H1 KO-Mäuse im Vergleich zu gesunden WT-Mäusen. Insgesamt konnte eine deutlich höhere Expression von PD-1 den B7-H1 KO-Mäusen zugeschrieben werden. Auch in der Gesamtzahl der PD-1 Moleküle, welche über den MFI-Wert reflektiert werden, wiesen sie einen signifikant höheren Wert auf. Dies spricht dafür, dass in den B7-H1 KO-Mäusen kompensatorische Vorgänge ablaufen, um das Gleichgewicht zwischen Immunstimulation und –suppression, wie es bei den WT-Mäusen der Fall ist, wieder herzustellen. Darüber hinaus wurde *ex vivo* der Einfluss des B7-H1 Moleküls auf das suppressive bzw. proliferative Verhalten der T_{reg}, MDSC und DC durch Ausschaltung dieses Moleküls auf ihrer jeweiligen Oberfläche untersucht. Das suppressive Verhalten der MDSC und das stimulierende Potential der DC wurden bei PaCa-tumortragenden Mäusen bestätigt. Jedoch war kein direkter Einfluss des B7-H1 Moleküls auf diese Immunzellen festzustellen. Allerdings machte es den Anschein, dass es bei der Regulation der Zytokine v.a. bei den MDSC eine wichtige Rolle

übernimmt. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Wichtigkeit von B7-H1 im PaCa und verdeutlichen die Notwendigkeit weitere Forschungsarbeiten in diesem Bereich durchzuführen, besonders im Zusammenhang mit Immuntherapien.

6 Summary

The immunosuppressive molecule B7-H1 in regulatory T-cells, myeloid-derived suppressor cells and dendritic cells in antitumor immune response in pancreatic carcinoma

The pancreatic carcinoma (PaCa) is characterized by a very poor prognosis which is associated with a low survival rate due to an often very late diagnosis. Furthermore, its aggressive growth behavior, the high rate of metastasis and the low response to irradiation or chemotherapy are characteristic for the PaCa.

Therefore, new therapeutic approaches are urgently needed and immunotherapy represents a new way of treating PaCa. To progress in this field, the immunological relationships need to be understood not only by observing healthy people but also for PaCa. The immune system has both an activating and a suppressive arm ensuring the balance through their interaction. The PD-1:PD-L1 pathway is a well-known example for the suppressive arm of the immune system.

This doctoral thesis analyzes the expression of the PD-1 receptor and the resulting influence on the B7-H1 molecule for various immune cells. This was done *in vivo* comparing healthy B7-H1 KO mice to healthy WT mice. Overall, a significantly higher expression of PD-1 could be attributed to the B7-H1 KO mice. They also showed a greater amount of PD-1 molecules, which are reflected on the MFI value. This suggests that compensatory processes are taking place in the B7-H1 KO mice to achieve the same balance between immune stimulation and -suppression as observed on the WT mice. Additionally, effects of the B7-H1 molecule on the suppressive or proliferative behavior of T_{reg}, MDSC and DC were investigated *ex vivo* by elimination of this molecule on their surface. The suppressive behavior of MDSC and the stimulatory potential of DC could be confirmed with tumor-bearing mice in both mouse strains. However, no direct effect of B7-H1 on these immune cells was observed. Nevertheless, it seemed that this molecule plays an important role in the regulation of cytokines, especially in MDSC.

After all, this work emphasizes the importance of B7-H1 in PaCa and underlines the necessity for further research in this field, especially with respect of immunotherapy.

III. Literaturverzeichnis

1. Fritsch, H. and W. Kühnel, *Taschenatlas der Anatomie, Band 2: Innere Organe*. 2009, Georg Thieme Verlag KG: [s.l.].
2. Universitätsklinikum Heidelberg. 12.07.2014]; Die Lage der Bauchspeicheldrüse]. Available from: <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/index.php?id=104400&L=0>.
3. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
4. Robert Koch Institut. *Krebs gesamt*. 2010 04.06.2014]; Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html.
5. Robert Koch Institut. *Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom)*. 2010 04.06.2014]; Available from: http://www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/fileadmin/forschung/Klinische_Forschung/Promotionen/Dr_med/Internet-Zitate.pdf.
6. Olson, S.H. and R.C. Kurtz, *Epidemiology of pancreatic cancer and the role of family history*. J Surg Oncol, 2013. **107**(1): p. 1-7.
7. Jiao, L., et al., *Body mass index, effect modifiers, and risk of pancreatic cancer: a pooled study of seven prospective cohorts*. Cancer Causes Control, 2010. **21**(8): p. 1305-14.
8. Genkinger, J.M., et al., *A pooled analysis of 14 cohort studies of anthropometric factors and pancreatic cancer risk*. Int J Cancer, 2011. **129**(7): p. 1708-17.
9. Arslan, A.A., et al., *Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan)*. Arch Intern Med, 2010. **170**(9): p. 791-802.
10. Malka, D., et al., *Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis*. Gut, 2002. **51**(6): p. 849-52.
11. Roshani, R., F. McCarthy, and T. Hagemann, *Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2013.
12. Seufferlein, T., et al., *Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 7**: p. vii33-40.
13. Collins, M.A. and M. Pasca di Magliano, *Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 407.
14. Kolodecik, T., et al., *Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 415.
15. Canto, M.I., et al., *International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer*. Gut, 2013. **62**(3): p. 339-47.
16. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.
17. Michl, P. and T.M. Gress, *Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer*. Gut, 2013. **62**(2): p. 317-26.
18. Kelsen, D.P., et al., *Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma*. Surgery, 1997. **122**(1): p. 53-9.
19. Whipple, A.O., W.B. Parsons, and C.R. Mullins, *Treatment of Carcinoma of the Ampulla of Vater*. Ann Surg, 1935. **102**(4): p. 763-79.
20. Whipple, A.O., *Pancreaticoduodenectomy for Islet Carcinoma : A Five-Year Follow-Up*. Ann Surg, 1945. **121**(6): p. 847-52.

21. Tran, K.T., et al., *Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy versus standard Whipple procedure: a prospective, randomized, multicenter analysis of 170 patients with pancreatic and periampullary tumors*. Ann Surg, 2004. **240**(5): p. 738-45.
22. Seiler, C.A., et al., *Randomized clinical trial of pylorus-preserving duodenopancreatectomy versus classical Whipple resection-long term results*. Br J Surg, 2005. **92**(5): p. 547-56.
23. Lin, P.W. and Y.J. Lin, *Prospective randomized comparison between pylorus-preserving and standard pancreaticoduodenectomy*. Br J Surg, 1999. **86**(5): p. 603-7.
24. Pedrazzoli, S., et al., *A surgical and pathological based classification of resective treatment of pancreatic cancer. Summary of an international workshop on surgical procedures in pancreatic cancer*. Dig Surg, 1999. **16**(4): p. 337-45.
25. Lillemoe, K.D., et al., *Distal pancreatectomy: indications and outcomes in 235 patients*. Ann Surg, 1999. **229**(5): p. 693-8; discussion 698-700.
26. Strobel, O., et al., *Resection after neoadjuvant therapy for locally advanced, "unresectable" pancreatic cancer*. Surgery, 2012. **152**(3 Suppl 1): p. S33-42.
27. Neoptolemos, J.P., et al., *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(12): p. 1200-10.
28. Pliarchopoulou, K. and D. Pectasides, *Pancreatic cancer: current and future treatment strategies*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(5): p. 431-6.
29. Shi, S., et al., *Combinational therapy: new hope for pancreatic cancer?* Cancer Lett, 2012. **317**(2): p. 127-35.
30. Heinemann, V., et al., *Increased survival using platinum analog combined with gemcitabine as compared to single-agent gemcitabine in advanced pancreatic cancer: pooled analysis of two randomized trials, the GERCOR/GISCAD intergroup study and a German multicenter study*. Ann Oncol, 2007. **18**(10): p. 1652-9.
31. Burris, H.A., 3rd, et al., *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. J Clin Oncol, 1997. **15**(6): p. 2403-13.
32. Antoniou, G., et al., *Adjuvant therapy for resectable pancreatic adenocarcinoma: review of the current treatment approaches and future directions*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(1): p. 78-85.
33. Kessler, M., *Kleintieronkologie Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze*. 2012, Enke: [s.l.].
34. Kircher, C.H. and S.W. Nielsen, *Tumours of the pancreas*. Bull World Health Organ, 1976. **53**(2-3): p. 195-202.
35. Priester, W.A., *Data from eleven United States and Canadian colleges of veterinary medicine on pancreatic carcinoma in domestic animals*. Cancer Res, 1974. **34**(6): p. 1372-5.
36. Nelson, R.W. and C.G. Couto, *Innere Medizin der Kleintiere*. 1. Aufl. ed. 2006, München [u.a.]: Urban & Fischer. XIII, 1506 S.
37. Knell, S. and C. Venzin, *Partial pancreatectomy and splenectomy using a bipolar vessel sealing device in a cat with an anaplastic pancreatic carcinoma*. Schweiz Arch Tierheilkd, 2012. **154**(7): p. 298-301.
38. Murphy, K.M., et al., *Janeway immunologie*. 7. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XXVI, 1093 S.

39. Sun, J.C., S. Ugolini, and E. Vivier, *Immunological memory within the innate immune system*. EMBO J, 2014.
40. Deutsches Krebsforschungszentrum. 03.09.2014]; Entwicklung von Blut- und Immunzellen]. Available from: <http://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/immunsystem.php>.
41. Moretta, A., et al., *Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 619-48.
42. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
43. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 297-336.
44. Brigl, M. and M.B. Brenner, *CD1: antigen presentation and T cell function*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 817-90.
45. Lu, L., et al., *Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 593-604.
46. Sela, M., *Antigenicity: some molecular aspects*. Science, 1969. **166**(3911): p. 1365-74.
47. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
48. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. Cell, 2001. **106**(3): p. 259-62.
49. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
50. Mahnke, K., et al., *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(5): p. 477-83.
51. Vasaturo, A., et al., *Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 417.
52. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
53. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
54. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
55. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
56. Sakaguchi, S., et al., *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, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
57. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
58. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
59. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.

60. Tran, D.Q., et al., *Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2929-38.
61. Campbell, D.J. and M.A. Koch, *Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 119-30.
62. Taguchi, O. and Y. Nishizuka, *Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance*. J Exp Med, 1987. **165**(1): p. 146-56.
63. Hori, S., et al., *Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8213-8.
64. Piccirillo, C.A., et al., *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 237-46.
65. Toda, A. and C.A. Piccirillo, *Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(3): p. 458-70.
66. Roncarolo, M.G., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 28-50.
67. Adeegbe, D.O. and H. Nishikawa, *Natural and induced T regulatory cells in cancer*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 190.
68. Whiteside, T.L., *What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why?* Semin Cancer Biol, 2012. **22**(4): p. 327-34.
69. Cesana, G.C., et al., *Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(7): p. 1169-77.
70. Siddiqui, S.A., et al., *Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2075-81.
71. Diebold, S.S., *Determination of T-cell fate by dendritic cells*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(5): p. 389-97.
72. Chou, H.S., et al., *Myeloid-derived suppressor cells protect islet transplants by B7-H1 mediated enhancement of T regulatory cells*. Transplantation, 2012. **93**(3): p. 272-82.
73. Whiteside, T.L., *Immune responses to malignancies*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S272-83.
74. Shevchenko, I., et al., *Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2013. **133**(1): p. 98-107.
75. Viehl, C.T., et al., *Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(9): p. 1252-8.
76. Jacobs, C., et al., *An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma*. Int J Cancer, 2011. **128**(4): p. 897-907.
77. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
78. Yamaguchi, T., et al., *Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 145-59.
79. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.

80. Sherger, M., et al., *Identification of myeloid derived suppressor cells in the peripheral blood of tumor bearing dogs*. BMC Vet Res, 2012. **8**: p. 209.
81. Meyer, C., et al., *Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(41): p. 17111-6.
82. Zhao, F., et al., *Increase in frequency of myeloid-derived suppressor cells in mice with spontaneous pancreatic carcinoma*. Immunology, 2009. **128**(1): p. 141-9.
83. Fujimura, T., et al., *Regulatory T cells stimulate B7-H1 expression in myeloid-derived suppressor cells in ret melanomas*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(4): p. 1239-46.
84. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.
85. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.
86. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
87. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
88. Carter, L., et al., *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 634-43.
89. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
90. Loos, M., et al., *Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2008. **268**(1): p. 98-109.
91. Nomi, T., et al., *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2151-7.
92. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12293-7.
93. Okudaira, K., et al., *Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model*. Int J Oncol, 2009. **35**(4): p. 741-9.
94. Bazhin, A.V., et al., *Two immune faces of pancreatic adenocarcinoma: possible implication for immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2013.
95. Dong, H., et al., *B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 327-36.
96. Corbett, T.H., et al., *Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice*. Cancer Res, 1984. **44**(2): p. 717-26.
97. Yang, Y., et al., *In vivo immunoregulatory properties of the novel mitochondria-targeted antioxidant SkQ1*. Mol Immunol, 2012. **52**(1): p. 19-29.
98. Greaves, P. and J.G. Gribben, *The role of B7 family molecules in hematologic malignancy*. Blood, 2013. **121**(5): p. 734-44.
99. Karakhanova, S., et al., *IL-27 renders DC immunosuppressive by induction of B7-H1*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(6): p. 837-45.
100. Karakhanova, S., et al., *ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets*. Eur J Immunol, 2010. **40**(1): p. 254-66.

101. Tivol, E.A., et al., *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 541-7.
102. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4*. Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
103. Nishimura, H. and T. Honjo, *PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance*. Trends Immunol, 2001. **22**(5): p. 265-8.
104. Akbari, O., et al., *PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(1): p. 81-91.
105. Bazhin, A.V., et al., *Immunological in vivo effects of B7-H1 deficiency*. Immunol Lett, 2014. **162**(2 Pt B): p. 273-86.
106. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
107. Smyth, M.J., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1582-7.
108. Trzonkowski, P., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction*. Clin Immunol, 2004. **112**(3): p. 258-67.
109. Hua, J., et al., *The interaction between regulatory T cells and NKT cells in the liver: a CD1d bridge links innate and adaptive immunity*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27038.
110. Venken, K., et al., *Bacterial CD1d-restricted glycolipids induce IL-10 production by human regulatory T cells upon cross-talk with invariant NKT cells*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2174-83.
111. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
112. Sojka, D.K. and D.J. Fowell, *Regulatory T cells inhibit acute IFN-gamma synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(45): p. 18336-41.
113. Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. Science, 1976. **193**(4257): p. 1007-8.
114. Gaffen, S.L. and K.D. Liu, *Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications*. Cytokine, 2004. **28**(3): p. 109-23.
115. Channappanavar, R. and S. Suvas. *Interleukin-2 inhibits programmed death-1 receptor expression on CD4+Foxp3+ regulatory T cells* 2010 17.12.2014]; Available from: http://www.jimmunol.org/cgi/content/meeting_abstract/184/1_MeetingAbstracts/139.11.
116. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 253-78.
117. Gaffen, S.L., *An overview of IL-17 function and signaling*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 402-7.
118. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
119. McGovern, J.L., et al., *Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(10): p. 3129-38.

120. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
121. Porembka, M.R., et al., *Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(9): p. 1373-85.
122. Karakhanova, S. and C. Maier, *Characterization of myeloid leukocytes and soluble mediators in pancreatic cancer: Importance of myeloid-derived suppressor cells*. Oncoimmunology, 2015.
123. Solito, S., V. Bronte, and S. Mandruzzato, *Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(1): p. 31-6.
124. Kim, K.J., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 841-4.
125. Gabrilovich, D., et al., *Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4150-66.
126. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 618-31.
127. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 217-42.
128. Dhawan, P. and A. Richmond, *Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 9-18.
129. Miyake, M., et al., *Chemokine (C-X-C) ligand 1 (CXCL1) protein expression is increased in aggressive bladder cancers*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 322.
130. Vazquez-Martin, A., R. Colomer, and J.A. Menendez, *Protein array technology to detect HER2 (erbB-2)-induced 'cytokine signature' in breast cancer*. Eur J Cancer, 2007. **43**(7): p. 1117-24.
131. He, D., et al., *IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells*. J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2281-8.
132. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
133. Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe, *PD-1 and its ligands in T-cell immunity*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 309-14.
134. Bellone, G., et al., *Impact of surgery and chemotherapy on cellular immunity in pancreatic carcinoma patients in view of an integration of standard cancer treatment with immunotherapy*. Int J Oncol, 2009. **34**(6): p. 1701-15.
135. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 453-79.
136. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 445-9.
137. Menges, M., et al., *Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 15-21.
138. Yoshimura, A. and G. Muto, *TGF-beta function in immune suppression*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **350**: p. 127-47.

139. Dumitriu, I.E., et al., *Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2795-807.

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1-1 Anatomische Lage des Pankreas; modifizierte Abbildung aus: [2].....	2
Abbildung 1.3.2-1 Entwicklung von Blut- und Immunzellen [40].....	13
Abbildung 1.3.2-2 Schematische Darstellung der Signalkaskade der DC im Zusammenspiel mit den T-Zellen; modifizierte Abbildung aus: [51]	17
Abbildung 2.2.2-1 Sterile Entnahme der Milz (links) und des Primärtumors (rechts)	39
Abbildung 3.1.1-1 Auswertungsstrategie der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse	52
Abbildung 3.1.1-2 Quantifizierung und Charakterisierung der CD4 ⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse	53
Abbildung 3.1.1-3 Quantifizierung und Charakterisierung der CD8 ⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse	55
Abbildung 3.1.1-4 Auswertungsstrategie der regulatorischen T-Zellen und der konventionellen T-Zellen aus den Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse	57
Abbildung 3.1.1-5 Quantifizierung und Charakterisierung der T _{reg} (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen) aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse.....	58
Abbildung 3.1.1-6 Quantifizierung und Charakterisierung der T _{con} (CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁻ Zellen) aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse.....	60
Abbildung 3.1.1-7 Quantifizierung und Charakterisierung der CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁺ Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse.....	61
Abbildung 3.1.1-8 Quantifizierung und Charakterisierung der aktivierten T _{con} (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ Zellen) aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO Mäuse	63
Abbildung 3.1.1-9 Auswertungsstrategie der NK-Zellen und der NKT-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse	64
Abbildung 3.1.1-10 Quantifizierung und Charakterisierung der NK-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse	65
Abbildung 3.1.1-11 Quantifizierung und Charakterisierung der NKT-Zellen aus Splenozyten gesunder WT-Mäuse bzw. B7-H1 KO-Mäuse	66
Abbildung 3.2.1-1 Auswertungsstrategie der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen und ihres proliferativen Verhaltens aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse.....	70
Abbildung 3.2.1-2 Quantifizierung aller nicht-geteilten CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen (Peak 1) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse	71
Abbildung 3.2.1-3 Quantifizierung aller zum ersten Mal geteilten CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen (Peak 2) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse	71
Abbildung 3.2.1-4 Quantifizierung aller zum zweiten und dritten Mal geteilten CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen (Peak 3 und 4) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse	72
Abbildung 3.2.1-5 Auswertungsstrategie der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse	73
Abbildung 3.2.1-6 Quantifizierung und Charakterisierung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse	74
Abbildung 3.3.1-1 Auswertungsstrategie der CD4 ⁺ T-Zellen und des suppressiven Verhaltens der MDSC aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse.....	77
Abbildung 3.3.1-2 Quantifizierung der geteilten bzw. nicht-geteilten, ko-kultivierten Splenozyten mit MDSC in Gegenüberstellung der MDSC aus Tumoren und aus Knochenmark	78

Abbildung 3.3.2-1 Auswertungsstrategie der CD4 ⁺ T-Zellen und des proliferativen Verhaltens im Histogramm aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse.....	80
Abbildung 3.3.2-2 Quantifizierung der CD3 ⁺ T-Zellen aus den Leukozyten aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse	81
Abbildung 3.3.2-3 Quantifizierung der CD4 ⁺ T-Zellen aus den CD3 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse	82
Abbildung 3.3.2-4 Quantifizierung der CD69 ⁺ Zellen aus den CD4 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse	83
Abbildung 3.3.2-5 Auswertungsstrategie der T _{reg} , T _{con} , T _{con} aktiviert und der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur mit Splenozyten und MDSC tumortragender WT-Mäuse.....	85
Abbildung 3.3.2-6 Quantifizierung der T _{reg} aus den CD4 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC aus tumortragenden WT-Mäusen (+/- B7-H1 Antikörper).....	86
Abbildung 3.3.2-7 Quantifizierung der T _{con} aus den CD4 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC aus tumortragenden WT-Mäusen (+/- B7-H1 Antikörper).....	87
Abbildung 3.3.2-8 Quantifizierung der T _{con} aktiviert aus CD4 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur mit Splenozyten und MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	88
Abbildung 3.3.2-9 Quantifizierung der CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Zellen aus CD4 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur mit Splenozyten und MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	89
Abbildung 3.3.2-10 Quantifizierung aller nicht-geteilten (Peak 1) und zum ersten Mal geteilten (Peak 2) CD4 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	91
Abbildung 3.4.1-1 Auswertungsstrategie der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen und des proliferativen Verhaltens aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	94
Abbildung 3.4.1-2 Quantifizierung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen und des proliferativen Verhaltens aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper).....	96
Abbildung 3.4.1-3 Weitere Auswertungsstrategie der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	96
Abbildung 3.4.1-4 Quantifizierung und Charakterisierung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper).....	98
Abbildung 3.5.1-1 Quantifizierung der Produktion von IFN γ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	99
Abbildung 3.5.1-2 Quantifizierung der Produktion von IL-1 β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper).....	100
Abbildung 3.5.1-3 Quantifizierung der Produktion von IL-2 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit Treg gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper).....	100
Abbildung 3.5.1-4 Quantifizierung der Produktion von IL-6 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	101
Abbildung 3.5.1-5 Quantifizierung der Produktion von IL-10 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper).....	102
Abbildung 3.5.1-6 Quantifizierung der Produktion von TGF β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper).....	102
Abbildung 3.5.1-7 Quantifizierung der Produktion von IL-17 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper).....	103
Abbildung 3.5.1-8 Quantifizierung der Produktion von VEGF aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit T _{reg} gesunder WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	104

Abbildung 3.5.2-1 Quantifizierung der Produktion von IFN γ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	105
Abbildung 3.5.2-2 Quantifizierung der Produktion von IL-1 β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	105
Abbildung 3.5.2-3 Quantifizierung der Produktion von IL-2 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	106
Abbildung 3.5.2-4 Quantifizierung der Produktion von IL-6 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	107
Abbildung 3.5.2-5 Quantifizierung der Produktion von IL-10 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	107
Abbildung 3.5.2-6 Quantifizierung der Produktion von IL-17 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	108
Abbildung 3.5.2-7 Quantifizierung der Produktion von VEGF aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	109
Abbildung 3.5.2-8 Quantifizierung der Produktion von TGF β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	109
Abbildung 3.5.2-9 Quantifizierung der Produktion von KC (CXCL1) aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	110
Abbildung 3.5.2-10 Quantifizierung der Produktion von TNF α aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit MDSC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	111
Abbildung 3.5.3-1 Quantifizierung der Produktion von IFN γ aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	112
Abbildung 3.5.3-2 Quantifizierung der Produktion von IL-2 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	113
Abbildung 3.5.3-3 Quantifizierung der Produktion von IL-10 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	113
Abbildung 3.5.3-4 Quantifizierung der Produktion von IL-17 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	114
Abbildung 3.5.3-5 Quantifizierung der Produktion von IL-1 β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	115
Abbildung 3.5.3-6 Quantifizierung der Produktion von IL-6 aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	116
Abbildung 3.5.3-7 Quantifizierung der Produktion von TGF β aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	116
Abbildung 3.5.3-8 Quantifizierung der Produktion von VEGF aus der Ko-Kultur von Splenozyten mit DC tumortragender WT-Mäuse (+/- B7-H1 Antikörper)	117

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	25
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3: OP-Materialien.....	28
Tabelle 4: Pharmaka	29
Tabelle 5: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	30
Tabelle 6: Beads für die Kompensation.....	32
Tabelle 7: Beads für die magnetische Zellseparation (MACS).....	33
Tabelle 8: Lösungen, Medien und Puffer	34
Tabelle 9: Luminex.....	36
Tabelle 10: Software.....	36

VI. Danksagung

In erster Linie bin ich zu besonderem Dank meinem Professor und gleichzeitig Betreuer, Herrn Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin und meiner Betreuerin, Frau Dr. Svetlana Karakhanova verpflichtet, ohne die das Anfertigen meiner Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Ich verdanke ihnen jede hilfreiche Unterstützung, die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährten. Dankbar anerkennen möchte ich auch ihren kompetenten Umgang mit uns Doktoranden, sowie ihre stets freundliche Art und uneingeschränkte Geduld.

Des Weiteren möchte ich den pharmazeutisch technischen Assistenten, Tina Maxelon, Markus Herbst und Inna Schwarting für ihre Unterstützung und Organisation der Labortätigkeiten danken. Die Zusammenarbeit mit den Kollegen lehrte mich nicht nur viele neue Fertigkeiten, sondern bereitete mir auch sehr viel Freude.

Ebenso geht mein Dank an meinen Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel, der mir immer vollstes Vertrauen entgegen brachte und mich umfassend und zügig betreute.

Der gegenseitigen Unterstützung und außerordentlich guten Zusammenarbeit meiner Mitdoktoranden Jasmin Fritz, Katharina von Ahn und Andreas Mathes danke ich ganz besonders und freue mich sehr, auch außerhalb der Doktorarbeit neue Freunde gefunden zu haben.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium zur Veterinärmedizin und diese Arbeit ermöglicht haben. Sie gaben mir stets Rückhalt, sprachen mir Mut zu und bestärkten mich in meinen Entscheidungen. Auch meiner Schwester Ulrike danke ich für ihre Unterstützung und ihren Beistand.

Einen besonders herzlichen Dank widme ich meinem Partner Moritz, der mir mit seiner Ruhe, Ausdauer und Geduld stets zur Seite stand und Rückhalt gewährte.