

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Universität
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Expression der regulatorische-T-Zell- rekrutierenden Chemokine CCL22 und CCL28 im humanen Mammakarzinom



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

vorgelegt von
Sascha Haubner
aus Nürnberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. David Anz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat
Prof. Dr. Veit Hornung
Priv. Doz. Dr. Robert Kammerer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2017

Meinen Eltern,
meinen Brüdern
und Naomi

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Sascha Haubner, an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Expression der regulatorische-T-Zell-rekrutierenden Chemokine CCL22 und
CCL28 im humanen Mammakarzinom

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

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

München, den 01.11.2016

.....

Sascha Haubner

1. Einleitung	1
1.1. Hürden einer effizienten Tumor-spezifischen T-Zell-Immunantwort ...	3
1.1.1. Negative Selektion	3
1.1.2. Anergie	4
1.1.3. Erschöpfung	4
1.1.4. Tumor-vermittelte Faktoren	4
1.2. Regulatorische T-Zellen (Treg)	6
1.2.1. Natürliche und induzierte Treg wirken lokal immunsuppressiv.....	6
1.2.2. Treg werden in Tumoren und Tumor-assoziierten Geweben angereichert	8
1.2.3. Tumor-assoziierte Treg supprimieren eine Tumor-spezifische Immunantwort und fördern das Tumorwachstum	8
1.2.4. Tumor-assoziierte Treg-Anreicherung korreliert mit Prognose.....	9
1.3. Chemokin-vermittelte Treg-Anreicherung in malignen Tumoren	11
1.3.1. Chemokine und Chemokinrezeptoren	11
1.3.2. Das Chemokin CCL22.....	12
1.3.3. Das Chemokin CCL28.....	14
2. Zielsetzung und Fragestellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Geräte	17
3.1.2. Chemikalien und Reagenzien	18
3.1.3. Puffer	19
3.1.4. Materialien für die Histologie	19
3.1.5. Materialien, Reagenzien und Medien für die Zellkultur	20
3.1.6. Antikörper für die Durchflusszytometrie	22
3.1.7. Antikörper und Fluorochrome für die Immunhistologie.....	22
3.1.8. Kits	23
3.1.9. Software	23
3.2. Zellkultur	24
3.2.1. Bestimmung der Zellzahl.....	24
3.2.2. Einfrieren von Zellen	24
3.2.3. Auftauen von Zellen	25
3.2.4. Kultivierung von Tumorzellen	25
3.2.5. PBMC-Isolierung	25
3.3. ELISA	26

3.4. Durchflusszytometrie	27
3.4.1. Färbung von Antigenen auf der Zelloberfläche	27
3.4.2. Färbung von Antigenen im Zellinneren.....	28
3.4.3. Auswertung in der Durchflusszytometrie.....	28
3.5. Histologische Färbungen	29
3.5.1. Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten	29
3.5.2. Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte	29
3.5.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	30
3.5.4. Doppel-Immunfluoreszenzfärbung	30
3.5.5. Histologische Aufnahmen am Mikroskop	31
3.6. Tierversuche	32
3.6.1. Verwendete Tiere	32
3.6.2. Tumorexperimente	32
3.6.3. Herstellung von Organlysaten	32
3.7. Analyse von humanem Serum	33
3.8. Statistische Analyse	34
4. Ergebnisse	35
4.1. Expression des Chemokins CCL22 im Tumorgewebe	35
4.1.1. Einzelne humane Tumorzelllinien exprimieren CCL22.....	35
4.1.2. Interferon- γ induziert CCL22 in einzelnen Tumorzelllinien	37
4.1.3. Von mononukleären Leukozyten freigesetzte Faktoren induzieren CCL22-Sekretion durch Tumorzellen	39
4.1.4. CCL22-exprimierende Zellen im humanen Mammakarzinom	41
4.1.4.1. CCL22-exprimierende Zellen sind vor allem im Tumor- umgebenden Stroma lokalisiert	41
4.1.4.2. Monozyten und unpolarisierte Makrophagen exprimieren CCL22 im humanen Mammakarzinom	44
4.2. Expression des Chemokins CCL28 in gesundem Gewebe und im Mammakarzinom	53
4.2.1. Im murinen Modell wird CCL28 vor allem in lymphatischen Organen und im Gastrointestinaltrakt exprimiert.....	53
4.2.2. CCL28-exprimierende Zellen im humanen Mammakarzinom	54
4.2.2.1. Stromazellen und Tumorzellen im humanen Mammakarzinom exprimieren CCL28.....	56
4.2.2.2. CCL28-Expression im humanen Mammakarzinom in Abhängigkeit von Histologie und TumorgroÙe.....	58
4.2.2.3. Makrophagen exprimieren CCL28 im humanen Mammakarzinom	59

4.3. Systemische Expression der Chemokine CCL22 und CCL28	64
4.3.1. Monozyten im peripheren Blut exprimieren CCL22.....	64
4.3.2. Tumorpatienten weisen keine erhöhte CCL22- oder CCL28- Konzentration im Serum auf.....	67
5. Diskussion	73
5.1. Mononukleäre Zellen sezernieren lösliche Faktoren, die CCL22 in humanen Tumorzelllinien induzieren	73
5.2. CCL22 wird im humanen Mammakarzinom von Monozyten oder unpolarisierten Makrophagen exprimiert	75
5.3. CCL28 wird im humanen Mammakarzinom von Tumorzellen und M2- Makrophagen exprimiert	77
5.4. CD68+ Makrophagen im Tumorstroma sind mit schlechter Prognose assoziiert	78
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis	81
8. Abkürzungsverzeichnis	93
9. Publikationen	97
10. Danksagung	99
11. Lebenslauf	100

1 Einleitung

Jede einzelne unserer kernhaltigen Körperzellen ist der ständigen Gefahr ausgesetzt, DNA-Mutationen anzuhäufen und sich zu einer Tumorzelle zu entwickeln, die der Ursprung einer lebensbedrohlichen Krebserkrankung sein kann. Um dies zu verhindern, ist jede gesunde Körperzelle mit einem ausgefeilten System intrinsischer Kontroll- und Reparaturmechanismen ausgestattet, die schon bei der Entstehung von Mutationen die nötigen Gegenmaßnahmen einleiten. Für den Fall, dass sich eine Körperzelle tatsächlich zu einer Tumorzelle transformiert, dient unser Immunsystem dazu, die durch Mutationen veränderten Zellmerkmale zu erkennen und die entsprechende Zelle zu eliminieren. Manifeste Tumoren können sich jedoch gegen diesen extrinsischen Kontrollmechanismus zur Wehr setzen und unterdrücken eine effiziente Immunantwort. Nach einem ähnlichen, aber in der Wirkung genau entgegengesetzten Prinzip könnten wir durch äußeren Einfluss auf unser Immunsystem diese Tumor-vermittelte Immunsuppression aufheben.

Einen ersten solchen Ansatz verfolgte William Coley, als er Ende des 19. Jahrhunderts eine Mischung abgetöteter Bakterienkulturen in Tumoren seiner Patienten injizierte, um eine lokale Immunantwort gegen den Tumor zu erzeugen (Coley 1893). Jedoch erst die Formulierung der Immunosurveillance-Hypothese (Burnet et al. 1967) führte zu breiterer Zustimmung, dass Tumoren durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden können. Die erstmalige Identifikation eines humanen Gens, das in mutierter Form Krebs auslösen kann und daher als Protoonkogen bezeichnet wird (Shih und Weinberg 1982), war ein Durchbruch für das Verständnis der Tumorgenese und der Startschuss für die Suche nach tumorspezifischen Antigenen, die neue therapeutische Angriffspunkte wie den Her2neu-Rezeptor bieten. Für die Entwicklung der Tumor-Immuntherapie wegweisend ist der erfolgreiche Einsatz von

Immuncheckpoint-Inhibitoren wie dem CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab und dem PD-1-Inhibitor Nivolumab, die derzeit für die Therapie des fortgeschrittenen Melanoms und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zugelassen sind und teils in Kombination miteinander in zahlreichen klinischen Studien für die Therapie weiterer Tumorentitäten erprobt werden (Atkins und Larkin 2016).

Damit Tumorpatienten in Zukunft noch mehr von der Tumor-Immuntherapie profitieren, müssen weitere pharmakologische Angriffspunkte gefunden werden. Dafür ist es essentiell, die Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem besser zu verstehen. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten.

1.1 Hürden einer effizienten Tumor-spezifischen T-Zell-Immunantwort

Im Prinzip ist eine spezifische und erfolgreiche Abwehr von Tumorzellen durch das Immunsystem durchaus möglich. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen veränderte Antigene exprimieren und Teile davon auf der Zelloberfläche präsentieren. Diese Antigene können von zytotoxischen T-Zellen durch einen spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt werden. Dadurch wird die Tumorzelle als Fremdkörper erkannt und im Rahmen der Immunantwort schließlich neutralisiert (Boon et al. 1994).

Könnte diese Form der Immunantwort für alle Tumorzellen erfolgreich ablaufen, wäre jeder maligne Tumor nach Kontakt mit dem Immunsystem in Kürze eliminiert. Allerdings entwickeln Tumoren ausgefeilte Mechanismen zur Suppression unseres Immunsystems und stellen dadurch ihr Überleben und Wachstum sicher. Folgende Faktoren reduzieren die Effektivität der T-Zell-vermittelten Immunantwort im Kontext einer malignen Erkrankung: Negative Selektion, Anergie, Erschöpfung und Tumor-vermittelte Faktoren (Baitsch et al. 2012).

1.1.1 Negative Selektion

Schon bei der T-Zell-Reifung im Thymus und auch später in der Peripherie werden durch negative Selektion die T-Zellen eliminiert, deren T-Zell-Rezeptoren Autoantigene mit hoher Avidität binden. Da Tumorzellen jedoch größtenteils Autoantigene präsentieren, ist dies ein zweiseitiger Prozess. Was auf der einen Seite ein notwendiger Vorgang ist, um Autoimmunprozesse zu vermeiden, ist auf der anderen Seite eine erste Hürde für die Entwicklung Tumor-spezifischer T-Zellen. Übrig bleiben nur wenige Autoantigen-spezifische T-Zellen, mit niedriger T-Zell-Rezeptor-Avidität (De Visser et al. 2003).

1.1.2 Anergie

Reife, aber noch naive T-Zellen können sich erst durch erfolgreiches *Priming* in der Peripherie zu Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen entwickeln. Antigenpräsentierende Zellen (APC) stellen dabei den nötigen T-Zell-Kontakt zum jeweiligen spezifischen Antigen-Epitop her. Gleichzeitig ist eine T-Zell-Aktivierung durch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 erforderlich. Im Tumormilieu werden APC oft nicht ausreichend aktiviert und sind daher nicht zur Kostimulation in der Lage. Die über den T-Zell-Rezeptor aktivierten aber nicht kostimulierten T-Zellen verfallen folglich in einen anergen Zustand und sind bei Restimulation nicht zur IL-2-Sekretion fähig, die für eine adäquate Immunantwort essentiell wäre (Harimoto et al. 2013).

1.1.3 Erschöpfung

T-Zellen können im Tumormilieu durch inhibitorische Rezeptoren (iR) oder chronische Antigen-Exposition in einen Zustand der Erschöpfung (*exhaustion*) versetzt werden. Durch Aktivierung der iRs PD-1, TIM-3, LAG-3 und CTLA-4 werden T-Zellen inaktiviert und die Ausschüttung immunstimulierender Zytokine wie IL-2, TNF- α und Interferon- γ gedrosselt (Baitsch et al. 2012). Die deutliche Prognoseverbesserung durch den Einsatz von CTLA-4- und PD-1-Inhibitoren bei fortgeschrittenem Melanom und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom geben einen Eindruck von der klinischen Bedeutung dieser inhibitorischen Rezeptoren (Shin et al. 2015).

1.1.4 Tumor-vermittelte Faktoren

Neben den oben genannten intrinsischen Mechanismen der T-Zell-Hyporesponsivität sind auch Tumor-vermittelte Faktoren bekannt, die eine adäquate T-Zell-vermittelte Immunantwort verhindern. Tumorzellen verringern ihre immunologische Angriffsfläche durch die Reduktion von Oberflächen-Antigenen und MHC-Molekülen und erschweren eine effiziente Immunantwort

durch die Ausschüttung immunsuppressiver Faktoren wie IDO, PGE₂, TGF-β oder IL-10 (Whiteside 2006). Durch die Expression antiapoptotischer Moleküle wie BCL-2 verhindern sie ihren eigenen Zelltod (Igney et al. 2002) und durch Expression des Fas-Liganden induzieren sie Apoptose von Tumorspezifischen T-Zellen (Bergmann et al. 2009). Zusätzlich zu den Tumorzellen sind auch Tumor-assoziierte Zellen an einer lokalen Immunsuppression beteiligt. Zu erwähnen sind hier vor allem Fibroblasten, myeloide Suppressorzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen (Baitsch et al. 2012).

1.2 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind eine CD4⁺ T-Zell-Subpopulation, die maßgeblich an der Gewährleistung der Immunhomöostase beteiligt ist, indem sie überschießende Immunantworten und Autoimmunreaktionen verhindert. Treg-Defizienz im Mausmodell führt zu einem sich rasch entwickelnden schwerwiegenden Autoimmunphänotyp, der sogenannten „*scurfy-mouse*“ (Godfrey et al. 1991). Auch im Menschen hat eine Treg-Defizienz dramatische Folgen. Das sehr seltene X-chromosomal vererbte IPEX-Syndrom (*Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-Linked Syndrome*) ist ein Immundefizienzsyndrom, das durch schwerwiegende systemische Autoimmunerkrankungen charakterisiert ist (Powell et al. 1982), was die Bedeutung der Treg für eine ausbalancierte Immunsituation veranschaulicht.

1.2.1 Natürliche und induzierte Treg wirken lokal immunsuppressiv

Bis auf wenige Ausnahmen sind Treg durch den Oberflächen-Zellmarker CD25 und den für die Treg-Differenzierung und -Funktion essenziellen Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert. Abhängig vom Entstehungsort werden *natural* Treg und *induced* Treg unterschieden. Die *natural* Treg machen insgesamt 10 bis 15 % der im peripheren Blut zirkulierenden CD4-positiven Zellen im Menschen aus und sind außerdem vor allem in sekundär lymphatischen Organen wie Milz, peripheren und mesenterialen Lymphknoten, Peyer'schen Plaques, aber auch in nicht-lymphatischen Organen wie Haut, Lunge, Leber, Peritonealhöhle und intestinaler Mukosa lokalisiert (Sather et al. 2007). Sie exprimieren unter anderem den L-Selektin-Rezeptor CD62L und den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4. Im Thymus werden sie durch ihre hohe T-Zell-Rezeptor-Affinität zu MHC-Molekülen mit Autoantigen-Peptiden selektioniert. Treg können sich auch erst in der Peripherie als *induced* Treg aus naiven auto-reaktiven T-Zellen unter dem Einfluss von TGF- β entwickeln. Ihre

regulatorische Funktion üben Treg unter anderem durch folgende Mechanismen aus: Durch die inhibitorische Wirkung von CTLA-4 im Kontakt mit APC wird die Kostimulation naiver T-Zellen eingeschränkt. Außerdem sezernieren Treg die auf T-Zellen antiproliferativ wirkenden Zytokine IL-10 und TGF- β (Sakaguchi 2005). Daneben können Treg über die Fas/Fas-Liganden-Achse Apoptose von Tumor-spezifischen T-Zellen auslösen (Strauss et al. 2009). Außerdem wird durch die Expression der Interleukin-2-Rezeptor α -Kette (CD25) lokal vorhandenes IL-2 gebunden, welches dann nicht mehr für eine T-Zell-Aktivierung zur Verfügung steht (Thornton und Shevach 1998). Treg sind also sowohl durch direkten Zellkontakt als auch durch Sekretion löslicher Faktoren zu lokaler Immunsuppression fähig.

1.2.2 Treg werden in Tumoren und Tumor-assoziierten Geweben angereichert

Es konnte bereits für viele Tumorentitäten gezeigt werden, dass Treg im Tumor selbst und im Tumor-umgebenden Stroma angereichert werden (Tabelle 1). Auch in peripherem Blut (Sasada et al. 2003), Tumor-drainierenden Lymphknoten (Liyanage et al. 2002), malignem Pleuraerguss (Qin et al. 2009) und malignem Aszites (Curiel et al. 2004) konnte eine erhöhte Treg-Konzentration in Tumorpatienten gemessen werden. Zu dieser Treg-Anreicherung im Rahmen von Tumorerkrankungen können verschiedene Mechanismen beitragen. Treg werden zum einen Tumor-vermittelt und als Reaktion auf lokale Inflammation durch TGF- β und IL-10 zur Proliferation stimuliert (Tokuno et al. 2009). Daneben können naive und Gedächtnis-T-Zellen nach Kontakt mit unreifen APC oder *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) zu Treg differenzieren (Gantt et al. 2014). Außerdem sind Treg im Vergleich zu konventionellen T-Zellen möglicherweise resistenter gegenüber oxidativem Stress, was zu deren Selektion im Tumormilieu führt (Terme et al. 2013). Eine weitere Erklärung für eine spezifische Treg-Anreicherung liefert die durch verschiedene Chemokine getriggerte gerichtete Migration regulatorischer T-Zellen.

1.2.3 Tumor-assoziierte Treg supprimieren eine Tumor-spezifische Immunantwort und fördern das Tumorwachstum

Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass Tumor-assoziierte Treg durch ihre immunsuppressive Funktion das Tumorwachstum fördern: Aus Tumorgewebe isolierte Treg supprimierten *in vitro* die T-Zell-vermittelte Tumorantigen-spezifische Immunreaktion, u.a. durch Inhibition der IL-2- und Interferon- γ -Sekretion. Auch *in vivo* konnte der immunsuppressive Einfluss von Treg gezeigt werden: Hier führte ein adoptiver Transfer autologer Tumor-assoziiierter Treg zu erhöhtem Tumorwachstum (Curiel et al. 2004).

1.2.4 Tumor-assoziierte Treg-Anreicherung korreliert mit Prognose

Während Treg unter physiologischen Bedingungen für ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren und damit für eine Verhinderung von überschießenden Immunreaktionen essentiell sind, nehmen Treg im Tumorkontext eine ambivalente und daher kontrovers diskutierte Rolle ein. In der Publikation „*Hallmarks of cancer: the next generation*“ (Hanahan et al. 2011) wurde eine unkontrollierte Entzündungsreaktion als Tumorbegünstigender Faktor beschrieben. Treg könnten in diesem Zusammenhang also durch ihre immunregulierende Wirkung einerseits zu einer besseren Prognose beitragen. Andererseits wurde jedoch das Verhindern einer Tumor-gerichteten Immunantwort in die Liste der Hauptmerkmale maligner Tumoren aufgenommen (Hanahan et al. 2011). Hier könnte den Treg sogar eine Schlüsselrolle zukommen, die prognostische Bedeutung hat. Ob Tumor-assoziierte Treg letztendlich mit einer positiven oder negativen klinischen Prognose korrelieren, variiert zwischen den verschiedenen Tumorentitäten (Tabelle 1). Für viele der untersuchten Tumorentitäten besteht allerdings eine Korrelation von Treg-Infiltration des Tumorgewebes mit einem schlechteren klinischen Outcome, wie es zum Beispiel vielfach für das Mammakarzinom beschrieben ist.

Tumorentität	Einfluss der Treg auf Prognose	Publikation
Blasenkarzinom	negativ	Horn et al. 2015
DLBCL	negativ	Chang et al. 2015
	positiv	Tzankov et al. 2008
Endometriumkarzinom	negativ	De Jong et al. 2009
Follikuläres Lymphom	positiv	Carreras et al. 2006, Carreras et al. 2009, Tzankov et al. 2008
Gliom	neutral	Han et al. 2014
Glioblastom	neutral	Thomas et al. 2015
Hepatozelluläres Karzinom	negativ	Fu et al. 2007, Sasaki et al. 2008
HNO Plattenepithelkarzinom	neutral	Badoual et al. 2006
Hodgkin Lymphom	positiv	Tzankov et al. 2008
Kolorektales Karzinom	negativ	Deng et al. 2010, McCoy et al. 2015
	positiv	Frey et al. 2010, Salama et al. 2009
Magenkarzinom	negativ	Sasada et al. 2003, Perrone et al. 2008
Mammakarzinom	negativ	Liu et al. 2014, West et al. 2013
	positiv	
	positiv	Lee et al. 2013
	negativ	Huang et al. 2015, Bailur et al. 2015, Bates et al. 2006, Demir et al. 2013, Gobert et al. 2009, Li et al. 2013, Liu et al. 2012, Yan et al. 2011, Benevides et al. 2013, Maeda et al. 2014, Yan et al. 2011
NK-/T-Zell-Lymphom	positiv	Kim et al. 2009
NSCLC	negativ	Petersen et al. 2006, Lv et al. 2014
Ösophaguskarzinom	negativ	Vacchelli et al. 2015
Ovarialkarzinom	negativ	Curiel et al. 2004, Sato et al. 2005, Wolf et al. 2005, Knutson et al. 2015
Pankreaskarzinom	negativ	Hiraoka et al. 2006

Tabelle 1: Korrelation von Treg-Anreicherung im Tumormilieu und Prognose

Aufgelistet sind Publikationen, die für verschiedene Tumorentitäten die Korrelation von Treg-Konzentration im Tumorgewebe und der Prognose angeben. Als Parameter für die Prognose wurden Studiendaten zum rezidivfreien Überleben oder Gesamtüberleben herangezogen. Es wurde unterschieden zwischen fehlender Korrelation (neutral), Korrelation mit schlechterer Prognose (negativ) und Korrelation mit besserer Prognose (positiv).

1.3 Chemokin-vermittelte Treg-Anreicherung in malignen Tumoren

1.3.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die Migration von Treg und vielen anderen Zellen erfolgt im menschlichen Körper entlang von Chemokingradienten. Chemokine gehören zur Gruppe der Zytokine und werden eingeteilt nach der Sequenz konservierter Cystein-Aminosäuren, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden (Fernandez et al. 2002). Dementsprechend wird unterschieden zwischen Chemokinen mit einem CXC-, CC-, C- und CX₃C-Motiv. Nach Sekretion binden diese Chemokine an G-Protein-gekoppelte zellmembranständige Chemokinrezeptoren (Murphy et al. 2012, Seite 102). Spezifische, zielgerichtete Migration von Zellen wird zum einen dadurch gewährleistet, dass Chemokine gewebespezifisch sezerniert werden, zum anderen dadurch, dass die entsprechenden Chemokinrezeptoren nur auf bestimmten Zellen exprimiert werden. Zum Beispiel erfolgt die Treg-Migration in die Haut durch lokal sezerniertes CCL22, welches den auf Treg exprimierten Chemokinrezeptor CCR4 bindet. Die Migration in die Verdauungsorgane erfolgt hingegen über CCR9, und in die sekundären lymphatischen Organe über CCR7 (Campbell, 2015).

1.3.2 Das Chemokin CCL22

CCL22 wurde erstmals im Jahr 1997 als CC-Chemokin beschrieben, damals unter der Bezeichnung *macrophage-derived chemokine* (MDC) (Godiska et al. 1997). Es wird von Makrophagen und myeloiden dendritischen Zellen (Godiska et al. 1997, Tang et al. 1999, Penna et al. 2002) sowie von epithelialen Zellen des Thymus konstitutiv exprimiert (Chantry et al. 1999). CCL22 wurde in zahlreichen Organen nachgewiesen, darunter in Thymus, Milz, Lymphknoten, Dünndarm und Haut. Neben der konstitutiven Expression wird CCL22 auch durch verschiedene Stimuli in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, pro-B-Zellen und T-Zellen induziert. Dazu gehören u.a. die Interleukine IL-1, IL-4 und IL-13, LPS und TNF (Mantovani et al. 2000). Eine verstärkte CCL22-Expression wurde im Rahmen von Th2-Reaktionen beschrieben (Galli et al. 2000). CCL22 bindet den Chemokinrezeptor CCR4, der von Treg exprimiert wird und deren spezifische Migration ermöglicht (Iellem et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass CCL22 als Ligand von CCR4 die Treg-Migration in Lymphknoten, Haut, Lunge und Intestinum vermittelt und damit zur physiologischen Immunregulation beiträgt (Sather et al. 2007, Yuan et al. 2007).

CCL22 wird allerdings auch in zahlreichen malignen Tumoren exprimiert, darunter dem Ovarialkarzinom. Hier konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass die Treg-Anreicherung im Tumorgewebe von lokaler CCL22-Sekretion abhängig ist (Curiel et al. 2004). Auch für andere Tumorentitäten wurde erhöhte CCL22-Expression im Tumorgewebe beschrieben (siehe Tabelle 2). Für das Lungenkarzinom mit malignem Pleuraerguss wurden intrapleurale erhöhte CCL22- und Treg-Konzentrationen festgestellt. Intrapleurale Injektion von rekombinantem CCL22 führte im Menschen zu einer entsprechenden intrapleuralen Treg-Anreicherung (Qin et al. 2009). Damit ist belegt, dass CCL22 auch im Menschen für die tumorassoziierte Treg-Anreicherung verantwortlich ist. Für das humane Mammakarzinom wurde CCL22 sogar als

unabhängiger Risikofaktor für eine schlechte Prognose beschrieben (Li et al. 2013). Daher ist es von großer klinischer Relevanz, den Zelltyp zu identifizieren, der im Tumorpatienten für eine vermehrte CCL22-Expression verantwortlich ist.

Tumorentität	CCL22	Treg	Publikation
Basalzellkarzinom	↑	↑	Kaporis et al. 2007
DLBCL	↑	↑	Yang et al. 2006
Hodgkin-Lymphom	↑	N/A	Maggio et al. 2002
Magenkarzinom	↑	↑	Mizukami et al. 2008
Mammakarzinom	↑	↑	Li et al. 2013, Benevides et al. 2013, Gobert et al. 2009
Ösophaguskarzinom	↑	↑	Maruyama et al. 2010
Ovarialkarzinom	↑	↑	Curiel et al. 2004
Prostatakarzinom	↑	↑	Miller et al. 2006
Lungenkarzinom, maligner Pleuraerguss	↑	↑	Qin et al. 2009

Tabelle 2: Korrelation zwischen CCL22-Expression und Treg-Anreicherung im Tumormilieu

Aufgelistet sind Publikationen, die für verschiedene Tumorentitäten CCL22-Expression und Treg-Konzentration im Tumorgewebe oder im umgebenden Stroma im Vergleich zum entsprechenden gesunden Gewebe angeben (↑ = erhöhte Konzentration).

1.3.3 Das Chemokin CCL28

CCL28, auch unter der Bezeichnung *mucosae-associated epithelial chemokine* (MEC) bekannt, ist ein CC-Chemokin, das erstmals im Jahr 2000 beschrieben wurde (Wang et al. 2000). CCL28 wird von Mukosa-assoziierten Epithelien exprimiert, darunter besonders von Epithelzellen des Colons und der Gallenwege, aber auch der Lunge, Speichel- und Brustdrüse (Pan et al. 2000, Eksteen et al. 2006). Daneben ist auch eine CCL28-Expression in Prostata, Milz und Leukozyten im peripheren Blut beschrieben (Wang et al. 2000). CCL28 bindet die Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR10 (Pan et al. 2000). CCR3 wird von CD4-positiven T-Zellen exprimiert, die in die Mukosa der oberen Atemwege migrieren (Danilova et al. 2015). CCR10 wird von einem weiten Zellspektrum exprimiert, zu dem bestimmte B- und T-Zell-Subtypen und Monozyten, aber auch Colonepithelzellen gehören (Wang et al. 2000). Unter den CCR10-exprimierenden Zellen sind auch Treg, die sich über CCL28 vermittelt in der Mukosa anreichern (Eksteen et al. 2006). CCL28 wird durch die proinflammatorischen Stimuli IL-1, LPS, bakterielles Flagellin und n-Butyrat induziert. Eine hierdurch gesteigerte CCL28-Expression konnte im Colonepithel bei entzündlichen Darmerkrankungen und in Cholangiozyten bei entzündlichen Lebererkrankungen bestätigt werden (Ogawa et al. 2004, Eksteen et al. 2006). Neben der chemotaktischen Funktion besitzt CCL28 außerdem antimikrobielle Aktivität (Hieshima et al. 2003). Zusammenfassend wird das Chemokin CCL28 im Mukosa-assoziierten Epithel zahlreicher Organe exprimiert und könnte durch selektive Treg-Rekrutierung einen Beitrag zur lokalen Immunhomöostase leisten.

2011 wurde erstmals gezeigt, dass CCL28 auch von Tumorzellen exprimiert wird. Hypoxie führt in Tumorzellen des Ovarialkarzinoms zu Expression von *hypoxia inducible factor 1 α* (HIF1 α), welches CCL28 induziert. CCL28 wiederum rekrutiert CCR10-positive Treg ins Tumorgewebe, wo sie durch lokale

Immunsuppression und zusätzlich durch Stimulierung der Angiogenese über VEGF-Sekretion das Tumorwachstum fördern. Entsprechend ist das Überleben von Patienten mit Ovarialkarzinom bei erhöhter CCL28-Expression signifikant reduziert (Facciabene et al. 2011). Das Chemokin CCL28 ist damit ein weiterer potentieller Angriffspunkt für neuartige Immuntherapien.

2 Zielsetzung und Fragestellung

Für zahlreiche Tumorerkrankungen wurde bereits eine Anreicherung regulatorischer T-Zellen beschrieben, die eine tumorgerichtete Immunantwort unterdrücken und somit oft mit verkürztem Überleben verbunden sind (Tabelle 1). Ebenso wurde gezeigt, dass die Chemokine CCL22 und CCL28 für die Treg-Migration in verschiedene Tumoren essentiell sind (Curiel et al. 2004, Facciabene et al. 2011). CCL22 und CCL28 sind damit potentielle Angriffspunkte für neuartige Tumorthérapien. Beide Chemokine leisten jedoch auch einen Beitrag zur Immunhomöostase und damit zur Vermeidung von Autoimmunerkrankungen (Bischoff et al. 2015, Eksteen et al. 2006). Eine spezifische Tumor-Immuntherapie müsste daher auf Tumor-assoziiertes CCL22 und CCL28 limitiert sein. Die genaue Identifikation der Zellen, die CCL22 und CCL28 im Tumormilieu freisetzen, könnte folglich die Grundlage für innovative Ansätze der Tumorummuntherapie schaffen. Daneben könnte durch den Tumor freigesetztes CCL22 und CCL28 als prognostischer Biomarker dienen und damit zur Therapieoptimierung beitragen. In der vorliegenden Arbeit sollten diese genannten Aspekte untersucht werden.

Zunächst sollte *in vitro* die CCL22-Expression durch verschiedene humane Tumorzelllinien analysiert werden. Dabei wurde insbesondere Interferon- γ als potentieller Stimulus für eine CCL22-Induktion in Tumorzellen überprüft. Anschließend wurde durch immunhistologische Analyse von humanem Mammakarzinom-Gewebe der CCL22-exprimierende Zelltyp bestimmt. Für das bisher noch wenig beschriebene Chemokin CCL28 sollte die Tumor-assoziierte Expression in humanem Mammakarzinom-Gewebe untersucht und der exprimierende Zelltyp identifiziert werden. Durch Serumanalyse von Tumorpatienten und gesunden Probanden sollte ein potentieller Einfluss des Tumors auf systemisch vorhandenes CCL22 und CCL28 überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Brutschrank (BD 6220)	Heraeus, Hanau, D
FACSCanto II	Becton Dickinson, San Jose, USA
Gewebeeinbettautomat Citadel 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator Memmert U30	Memmert, Schwabach, D
Konfokalmikroskop Leica TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Kühlschränke (4°C, -20°C, -80°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Microtom Microm HM340E	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, D
Mikrowellengerät	Miele, Gütersloh, D
Mithras LB940 multilabel plate reader	Berthold, Bad Wildbad, D
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, D
Neubauer Zählkammer	Neubauer, Marienfeld, D
Omnifuge 2 ORS	Heraeus, Hanau, D
Paraffin-Ausgießstation Microm EC350	Thermo Scientific, Waltham, USA
Schüttler	NeoLab, Heidelberg, D
Sterilbank	Heraeus, Hanau, D
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Staufen, D
Waage (LP 6209)	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad Leica HI 1210	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, D

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Bio-Plex Lyse-Puffer	Biorad, München, D
Biocoll-Trennlösung 1,077g/ml	Biochrom, Berlin, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dako Antibody Diluent	Dako, Hamburg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca und Mg	PAA, Pasching, D
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Merck, Darmstadt, D
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
FACSFlow, FACSSafe	Becton Dickinson, San Jose, USA
Formalin (Formal-Fixx Concentrate)	Thermo Scientific, Waltham, USA
HCl	Apotheke Innenstadt Uni München, D
Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml	Braun AG, Melsungen, D
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, D
Immersionsöl für Konfokal-Objektiv	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Isofluran (Forene®)	Abbott, Zug, CH
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Target Retrieval Solution pH 6,0	Dako, Hamburg, D
Trizma Base	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trizma Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, A
Vectashield Mounting Medium	Vector Labs, Burlingame, USA
Vectamount Permanent Mounting Med.	Vector Labs, Burlingame, USA
Xylol	Apotheke Innenstadt Uni München, D

3.1.3 Puffer

Zell-Fixationspuffer	1% PFA in PBS
ELISA Coating-Puffer	Dulbecco's PBS (1x) mit Ca und Mg
ELISA Reagent diluent-Puffer:	
- Human CCL28 ELISA	0,1% BSA in PBS
- Mouse CCL28, Human CCL22 ELISA	1% BSA in PBS
ELISA Wasch-Puffer	0,05% Tween 20 in PBS
TRIS pH 7,5	H ₂ O destilliert
	NaCl
	Trizma Hydrochlorid
	Trizma Base

3.1.4 Materialien für die Histologie

Deckgläser	VWR International, Darmstadt, D
Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe, D
Färbekästen	Carl Roth, Karlsruhe, D
Menzel-Gläser Superfrost Ultra Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA

3.1.5 Materialien, Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Zelllinie	Zellart	Spezies
A-375	Malignes Melanom	Human
A-431	Epidermoid-Karzinom	Human
A-549	Lungen-Adenokarzinom	Human
B16	Melanom	Murin
C26	Colorektales Adenokarzinom	Murin
CAMA-1	Mamma-Adenokarzinom	Human
IMIM	Pankreas-Adenokarzinom	Human
Jurkat	T-Zell-Lymphom	Human
Karpas	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	Human
MC38	Colon-Adenokarzinom	Murin
MDA-MB-231	Mamma-Adenokarzinom	Human
MDA-MB-435s	Mamma-Adenokarzinom	Human
MCF-7	Mamma-Adenokarzinom	Human
Panc01	Pankreas-Adenokarzinom	Human
Panc02	Pankreas-Adenokarzinom	Murin
SK-MEL23	Malignes Melanom	Human
SKBR-3	Mamma-Adenokarzinom	Human
SW480	Colorektales Adenokarzinom	Human

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Tumorzelllinien

Verwendete Zellmedien:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High glucose ohne L-Glutamin	PAA, Pasching, A
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Karlsruhe, D
L-Glutamin 200 mM	PAA, Pasching, A
MEM-NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren)	GibcoBRL, Karlsruhe, D
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, A
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, A
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, A
Very Low Endotoxin Roswell Park Memorial Institute (VLE-RPMI) 1640 Medium ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin, D
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

VLE-RPMI Komplett-Medium	10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 1% nicht-essenzielle Aminosäuren (MEM-NEAA) 50 µM β-Mercaptoethanol in RPMI 1640
DMEM Komplett-Medium	10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin
Kryo-Medium	50% DMEM Komplett-Medium 40% FCS 10% DMSO

Immunstimulatoische Substanzen:

Rekombinantes humanes Interferon-γ (IFN-γ) aus E.coli	Peprotech, Hamburg, D
Ionomycin	InvivoGen, San Diego, USA
PMA	InvivoGen, San Diego, USA

Einweg-Plastikmaterialien für Zellkultur-Experimente wurden erworben von Becton Dickinson (Heidelberg, D), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), Greiner (Frickenhausen, D), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, D), Nunc (Rochester, USA) oder Sarstedt (Nümbrecht, D).

3.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Reaktivität	Klon	Hersteller	Markierung
CCL22	Human	57203	R&D	PE
CD14	Human	HCD14	Biologend	FITC
CD86	Human	IT2.2	Biologend	Pacific Blue
PE Mouse IgG2b, κ Isotype		27-35	BD Pharmingen	PE

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie

3.1.7 Antikörper und Fluorochrome für die Immunhistologie

Primärantikörper:

Spezifität	Reaktivität	Spezies	Katalog-Nr.	Hersteller	Verdünnung
CCL22	Anti-Human	Kaninchen	500-p107	Peprtech	1:100
CCL28	Anti-Human	Kaninchen	GTX108432	GeneTex	1:100
CD14	Anti-Human	Murin	NCL-CD14-223	Novocastra	1:50
CD45	Anti-Human	Murin	M070129	Dako	1:50
CD64	Anti-Human	Murin	ab140779	Abcam	1:100
CD68	Anti-Human	Murin	M081401	Dako	1:50
CD163	Anti-Human	Murin	ab111250	Abcam	1:25
CD206	Anti-Human	Murin	ab117644	Abcam	1:100
DC-LAMP	Anti-Human	Ratte	DDX0191	Dendritics	1:20
DC-SIGN	Anti-Human	Murin	ab59192	Abcam	1:30

Tabelle 5: Primärantikörper für die Immunhistologie

Sekundärantikörper:

Reaktivität	Spezies	Konjugat	Katalog-Nr.	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen	Ziege	Biotin	BA-1000	Vector	1:150
Anti-Maus	Esel	Alexa Fluor 488	715-546-150	Jackson Immunoresearch	1:100
Anti-Ratte	Ziege	Cy2	112-225-062	Jackson Immunoresearch	1:50

Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Immunhistologie

Fluorochrome:

Fluorochrom	Katalog-Nr.	Hersteller	Verdünnung
Rhodamine-Red-X-konj. Streptavidin	016-290-084	Jackson Immunoresearch	1:100
DAPI	D1306	Invitrogen	1:25.000

Tabelle 7: Fluorochrome für die Immunhistologie

3.1.8 Kits

Bradford Protein-Assay	Biorad, München, D
CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach, D
Human CCL22/MDC DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human CCL28 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse CCL28 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Foxp3 Staining Set	BD Bioscience, San Diego, USA
Zell-Lyse-Kit	Biorad, München, D

3.1.9 Software

Adobe Illustrator CS6	Adobe System, San Jose, USA
Adobe InDesign CS6	Adobe System, San Jose, USA
Adobe Photoshop CS6	Adobe System, San Jose, USA
AxioVision V4.8	Zeiss, Jena, D
FlowJo	Tree Star, Ashland, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla, USA
Leica LAS AF (Version 2.6.0)	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Microsoft Office 2011	Microsoft, Redmond, USA

3.2 Zellkultur

Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom zum Schutz vor Kontaminationen durch Mikroorganismen durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, 5% CO₂-Luft-Gemisch und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zentrifugation wurde stets 7 Minuten lang bei 400 g und 4°C durchgeführt, soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt.

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Zellzahl und Viabilität wurden mit Trypanblau bestimmt, das ausschließlich von Zellen mit geringer Membranintegrität intrazellulär aufgenommen wird und diese Zellen unter dem Lichtmikroskop dunkler als vitale Zellen erscheinen lässt. Ein Teil der Einzelzellsuspension wurde in einem festgelegten Verhältnis mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Anschließend wurde mit dem Lichtmikroskop die Anzahl der vitalen Zellen pro Großquadrat bestimmt und nach folgender Formel die Zellkonzentration in der Einzelzellsuspension abgeleitet: $\text{Zellen/ml} = \text{mittlere Zellzahl im Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor mit Trypanblau} \times 10^4$

3.2.2 Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff gegeben. Um zu verhindern, dass sich beim Einfrieren der Zellen Eiskristalle bilden, die die Zellen zerstören, wurde 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) in DMEM (50% FCS) verwendet: Nach 7 Minuten Zentrifugation bei 400 g wurde das Zellpellet in FCS resuspendiert. Danach wurde das gleiche Volumen an DMEM mit 20% DMSO hinzugegeben. Davon wurde jeweils 1 ml in 1,8 ml Einfrierröhrchen gegeben, die 3 Tage bei -80°C im Gefrierschrank zwischengelagert wurden, bevor sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

3.2.3 Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden in DMEM Komplett-Medium aufgetaut und anschließend bei 400 g 7 Minuten zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im gewünschten Medium resuspendiert.

3.2.4 Kultivierung von Tumorzellen

Die adhärent wachsenden Tumorzellen wurden in Kulturflaschen mit DMEM Komplett-Medium kultiviert. Waren die Kulturflaschen konfluent bewachsen, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 x Trypsin/EDTA in PBS behandelt. Die hierdurch abgelösten Zellen wurden in DMEM Komplett-Medium resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in DMEM Komplett-Medium gelöst und ein Teil davon zur weiteren Kultur in eine Kulturflasche gegeben.

3.2.5 PBMC-Isolierung

Um mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) anzureichern, wurde heparinisiertes Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation in Fraktionen von verschiedenen Zelltypen aufgetrennt. Dazu wurde das Vollblut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und in einem 50 ml-Bluecap auf 15 ml Biocoll-Trennlösung aufgeschichtet. Anschließend wurde bei 1.000 g 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die zwischen Biocoll-Trennlösung und Blutplasma befindlichen PBMC wurden isoliert und in ein neues Bluecap gegeben. Dieses wurde auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 520 g 10 Minuten zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS. Dabei wurde jeweils bei 300 g 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

3.3 ELISA

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein antikörpervermitteltes Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Antigenen. Enzymgekoppelte Antikörper binden spezifisch an das untersuchte Antigen und erzeugen nach Zugabe eines farblosen Substrats einen Farbumschlag, der photometrisch quantifiziert wird. Daraus lässt sich letztendlich die Konzentration des Antigens ableiten. In dieser Arbeit wurden im sogenannten Sandwich-ELISA die Chemokine CCL22 und CCL28 in humanen und murinen Zellkulturüberständen, Organlysaten und Serum bestimmt. Hierzu wurden ELISA-Detektionsplatten mit Coating-Antikörpern beschichtet, die das zu messende Antigen spezifisch binden. Das gebundene Antigen wird von einem zweiten, biotinkoppelten Antikörper detektiert, an den wiederum das Streptavidin-gekoppelte Enzym Peroxidase bindet. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid zu einem blauen Farbstoff. Die Konzentrationsbestimmung der genannten Chemokine wurde mit handelsüblichen Detektionssystemen nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Serum und Zellkulturüberstände wurden unverdünnt untersucht, Organlysate wurden zur Angleichung der Gesamtproteinkonzentration entsprechend verdünnt.

3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie – auch als FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) bezeichnet – ist eine Methode zum Zählen und Untersuchen von Zellen oder anderen mikroskopischen Partikeln. Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst in Einzelzellsuspension gebracht. Danach werden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern Antigene der Zellen spezifisch gebunden. Die zu untersuchenden Zellen werden durch eine Kapillare angesaugt und im Sensormodul des Durchflusszytometers einzeln von einem Laser bestrahlt. Bei der Passage einer Zelle durch das Sensormodul wird ein Teil des Laserlichts gestreut und von verschiedenen Photodetektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist abhängig vom Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel. Dieses hängt von der Granularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zelle ab. Durch Detektion dieser beiden Streuungsparameter können verschiedene Zellpopulationen nach Größe, Form und intrazellulärer Struktur unterschieden werden. Das absorbierte Licht wird wieder in einem spezifischen Wellenlängen-Spektrum emittiert, wenn die Zelle autofluoreszierendes Material enthält oder Strukturen von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gebunden sind. Die Intensität des detektierten Lichts steht hierbei im direkten Verhältnis zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Menge der markierten Antigene.

3.4.1 Färbung von Antigenen auf der Zelloberfläche

Zur FACS-Analyse wurden Einzelzellsuspensionen von 50.000 bis 200.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte zentrifugiert und in 50 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe der jeweiligen Antikörper gegen Oberflächenantigene wurde der Ansatz 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl PBS pro Well resuspendiert und bis

zur Analyse bei 4°C gelagert. Zur Auswertung wurden je 100 µl pro Well in ein FACS-Röhrchen gefüllt und ins Durchflusszytometer eingegeben.

3.4.2 Färbung von Antigenen im Zellinneren

Da der Transkriptionsfaktor Foxp3 und das Chemokin CCL22 nicht membrangebunden, sondern intrazellulär vorliegen, mussten diese beiden Antigene für die durchflusszytometrische Darstellung intrazellulär detektiert werden. Für das Erreichen des jeweiligen Epitops mussten die Antikörper also die Zellmembran überwinden, was deren Permeabilisierung erforderlich machte. Hierzu wurden die Zellen nach Zentrifugation in 100 µl FOX KIT Fix-Perm Reagent resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zweimal in je 200 µl FOX KIT Perm-Buffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl FOX KIT Perm-Buffer resuspendiert und mit 0,5 µl anti-Foxp3-Antikörper bzw. anti-CCL22-Antikörper 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in FOX KIT Perm-Buffer wurden die Zellen zur Membranfixierung in 1 % PFA in PBS resuspendiert und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Hiernach wurden die Zellen zentrifugiert, in 200 µl PBS pro Well resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

3.4.3 Auswertung in der Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Daten bezüglich eines Antigens wurden entweder als Prozentsatz positiv durch den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper angefärbter Zellen oder als mediane Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die MFI ist ein direkt vom Durchflusszytometer errechneter dimensionsloser Wert für die Fluoreszenzintensität der Zellen. Sie ist daher ein Maß für die Expression des untersuchten Antigens.

3.5 Histologische Färbungen

3.5.1 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten

Murines Gewebe wurde nach Organentnahme mit PBS gewaschen und in Formalin 24 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das fixierte Gewebe 2 bis 6 h in Leitungswasser gespült. Danach folgte die Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Jeweils 45 bis 60 min wurde das Gewebe bei folgenden Isopropanol-Konzentrationen entwässert: 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, zweimal 100%. Danach wurde das Gewebe 8 bis 16 h erneut in 100% Isopropanol gegeben, daraufhin dreimal jeweils 1 h in Xylol. Schließlich wurde das Gewebe bei 55 bis 65°C in flüssiges Paraffin gegeben. Das Gewebe wurde danach in geeignete Formen gegeben, um diese anschließend mit flüssigem Paraffin aufzufüllen. Auf einer Kühlplatte wurde das Paraffin abgekühlt und in feste Form gebracht. Von den fertigen Paraffinblöcken wurden anschließend mit einem Mikrotom Gewebeschnitte von 2 µm Dicke erstellt und auf Objektträger gebracht. Im Inkubator wurden die Gewebeschnitte anschließend auf den Objektträgern 12 h bei 50°C fixiert. Humanes Gewebe wurde als ungefärbtes Schnittpräparat freundlicherweise vom Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München bereitgestellt.

3.5.2 Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte

Aus Konservierungszwecken war das Gewebe mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Vor histologischen Färbungen wurde das Material 30 min in Xylol deparaffiniert. Anschließend wurde das Gewebe jeweils 3 min nacheinander in 100%, 96%, 70% Ethanol behandelt, um es danach 5 min in destilliertem Wasser zu rehydrieren.

3.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden diese 2 sec in Leitungswasser gegeben und anschließend 3 min in Hämalaun-Lösung nach Mayer inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2 sec in eine 0,1% HCl-Lösung gegeben und 3 bis 5 min bei fließendem Leitungswasser gewaschen. Daraufhin wurde 3 min in 0,5% wässriger Eosin G-Lösung gefärbt und 30 sec wiederum bei fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach Dehydrierung des Gewebes durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 3 min in 70%, 95% und 100% Ethanol) und zweimal 5 min Xylol wurden die Schnitte mit Hilfe von Vectamount Permanent Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckelt.

3.5.4 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung

Um Antigene für nachfolgende immunhistologische Färbungen zu demaskieren, wurden die Gewebeschnitte in Target Retrieval Solution (pH 6,0) gegeben und darin 30 min in einer Mikrowelle bei 750W hitzebehandelt. Anschließend wurde das Gewebe in der Lösung 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt und in TRIS pH 7,5 überführt. Um zwei verschiedene Antigene auf einem Gewebeschnitt für die Auswertung am Konfokalmikroskop sichtbar zu machen, wurde nach folgendem Färbeprotokoll verfahren:

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Inkubationen von Antikörpern etc. fanden in einer feuchten Kammer statt. Alle verwendeten Antikörper wurden in Dako Antibody Diluent passend verdünnt. Vor und nach Inkubation wurden die Gewebeschnitte jeweils 2 x 5 min in TRIS pH 7,5 gewaschen.

60 min Inkubation des 1. Primärantikörpers

30 min Inkubation des 1. Sekundärantikörpers (biotinyliert)

30 min Inkubation des 1. Fluorochroms (Streptavidin-gekoppelt)

120 min Inkubation des 2. Primärantikörpers

60 min Inkubation des 2. Sekundärantikörpers (gekoppelt mit 2. Fluorochrom)

5 min Inkubation in DAPI-Kernfärbelösung

Eindecken in Vectashield-Einbettungsmedium mit Deckgläschen

3.5.5 Histologische Aufnahmen am Mikroskop

H.E.- und immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte wurden im Durchlichtmikroskop Zeiss Axiovert 25 untersucht. Aufnahmen wurden hier mit Hilfe der Software Axiovision V4.8 angefertigt.

Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 erstellt. Blaue Signale wurden durch einen Laser im UV-Bereich erzeugt und in einem Wellenlängenbereich von 440 nm bis 480 nm detektiert. Grüne Signale wurden durch einen Laser der Wellenlängen 488 nm und 496 nm erzeugt und in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 530 nm erfasst. Rote Signale wurden durch einen Laser der Wellenlänge 543 nm erzeugt und in einem Wellenlängenbereich von 570 nm bis 610 nm detektiert. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden mit Hilfe der Software Leica LAS AF (Version 2.6.0) als Bilddateien gespeichert. Quantifizierung der Kollokationen erfolgte durch *Overlay* der Aufnahmen in verschiedenen Farbkanälen mit Hilfe der Software Photoshop CS6.

3.6 Tierversuche

3.6.1 Verwendete Tiere

Für Tierversuche wurden weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6 von Harlan-Winkelmann (Borchen, D) erworben. Die Mäuse waren bei Versuchsbeginn 8 bis 16 Wochen alt. Die Tierversuche wurden durch die örtlich zuständige Behörde genehmigt (Regierung von Oberbayern, München, D). Nach Ablauf der Experimente und zur Organentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet.

3.6.2 Tumorexperimente

Zur Untersuchung der CCL28-Expression im Tumorgewebe wurden C57BL/6-Mäusen Tumorzellen der Linie C26 (murines Colonkarzinom) s.c. injiziert. Nach Erreichen einer Tumorgöße von 125 mm² wurden die Mäuse getötet. Das Tumorgewebe wurde isoliert entnommen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff gefroren. Danach wurde das Tumorgewebe zur Lagerung bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.6.3 Herstellung von Organlysaten

Bei -80°C gelagerte Mausorgane wurden mit einem Mörser in ein feines Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Durch Zugabe von 20 bis 200 µl Lysepuffer und mehrmaligem Schütteln auf dem Vortex wurde ein dickflüssiges Lysat hergestellt. Danach wurde 15 min bei 12.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen, das bei -80°C im Gefrierschrank gelagert wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten wurde nach dem Herstellerprotokoll des Bradford Protein-Assays durchgeführt. Bei Messungen von Chemokinen in den Lysaten durch die ELISA-Methode wurde zuvor durch entsprechende Lysat-Verdünnung durch Lysepuffer eine einheitliche Proteinkonzentration von 10 bis 20 mg/ml hergestellt.

3.7 Analyse von humanem Serum

Zur Untersuchung von Chemokinen im Blut von Patienten wurde humanes Serum isoliert. Anschließend wurde im ELISA die Serumkonzentration von CCL22 und CCL28 bestimmt. Zudem wurden die zur jeweiligen Serumprobe gehörigen klinischen Daten untersucht. Es wurde Serum von Patienten einer hämatonkologischen Station (Station 22, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Ziemssenstraße 1, 80336 München), einer internistischen Station (Station 3, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Ziemssenstraße 1, 80336 München) und einer dermatoonkologischen Ambulanz (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Frauenlobstraße 9-11, 80337 München) untersucht. Die Patienten wurden über die Zielsetzung der Studie aufgeklärt. Persönliche Daten und Befunde wurden pseudonymisiert gespeichert. Die Patienten wurden darauf hingewiesen, dass im Falle eines Widerrufs ihrer Einwilligung die entsprechenden gespeicherten Daten vernichtet werden. Die Einwilligung der Patienten zur Blutentnahme wurde durch ihre Signatur schriftlich festgehalten. Die Blutentnahme wurde zwischen 8 und 10 Uhr morgens durchgeführt. Es wurden jeweils 5 ml venöses Blut in einem Serumröhrchen entnommen und bei 4°C zwischengelagert. Nach spätestens 2 Stunden wurde das Blut bei 1.500 g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Serum als Überstand abgenommen. Dieses wurde in ein steriles 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80°C gelagert. Zusätzlich wurde von gesunden Probanden aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie (Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Ziemssenstraße 1, 80336 München) nach deren Einwilligung Blut zur Serumanalyse nach oben beschriebenem Schema abgenommen und gelagert.

3.8 Statistische Analyse

In dieser Arbeit wurden für multiple Experimente alle Daten als arithmetische Mittelwerte angegeben. Die Varianz der Mittelwerte wurde als Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz verschiedener experimenteller Daten wurde durch den unabhängigen Zweistichproben-t-Test (doppelter t-Test) berechnet. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei p-Werten $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ und wurde entsprechend mit Asterisken (*, ** und ***) gekennzeichnet. Wenn nicht anders angegeben, steht ein Asterisk für einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe des Experiments. In einigen Abbildungen wurde die statistische Signifikanz zwischen verschiedenen experimentellen Gruppen berechnet und mit Asterisk-markierten Klammern dargestellt. Alle statistischen Berechnungen wurden durch die Software GraphPad Prism 7 durchgeführt. Für mathematische Analyse und graphisches Design wurden die Programme Microsoft Office 2011 und Adobe Illustrator CS6 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression des Chemokins CCL22 im Tumorgewebe

Es wurde bereits für zahlreiche Tumorentitäten gezeigt, dass sich regulatorische T-Zellen (Treg) im Tumormilieu anreichern. Durch ihre immunsuppressive Funktion verhindern sie eine effiziente Immunantwort gegen den Tumor und beeinflussen dadurch die Prognose von Tumorpatienten (Tabelle 1). Das Chemokin CCL22 vermittelt die Treg-Migration in das Tumorgewebe und das Tumor-umgebende Stroma und ist damit ein wesentlicher Faktor für die Erzeugung eines immunsuppressiven Milieus im Tumor und kürzeres Überleben von Tumorpatienten (Curiel et al. 2004, Qin et al. 2009). In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte die Expression des Chemokins CCL22 im Tumorgewebe genauer beschrieben werden. Unter anderem sollten Mechanismen der Tumor-vermittelten CCL22-Induktion untersucht werden. Außerdem sollte der CCL22-exprimierende Zelltyp identifiziert werden.

4.1.1 Einzelne humane Tumorzelllinien exprimieren CCL22

Es konnte bereits für mehrere Tumorentitäten gezeigt werden, dass im Tumorgewebe erhöhte CCL22-Konzentrationen vorliegen (Tabelle 2). Welche Zellen für die CCL22-Expression im Tumor verantwortlich sind, ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. *In vitro* wurde bereits für einzelne Mammakarzinom-Zelllinien CCL22-Expression beschrieben (Faget et al. 2011). Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob humane Tumorzellen selbst CCL22 exprimieren oder andere Zellen im Tumor-assoziierten Stroma wie Fibroblasten, Immunzellen oder Epithelzellen für die CCL22-Expression verantwortlich sind.

Neben Mammakarzinom-Zelllinien wurden auch Tumorzelllinien anderer Entitäten auf *in vitro* CCL22-Expression getestet. Dazu wurden 14 verschiedene

humane Tumorzelllinien (Tabelle 8) *in vitro* kultiviert und deren Überstände nach 24 h und 48 h abgenommen. Anschließend wurde die CCL22-Konzentration in den Überständen per ELISA gemessen.

Zelllinie	Tumorentität	Zelllinie	Tumorentität	Zelllinie	Tumorentität
A-375	Malignes Melanom	Jurkat	T-Zell Lymphom	Panc01	Pankreas-Adenokarzinom
A-431	Epidermoid-Karzinom	Karpas	B Non-Hodgkin-Lymphom	SK-MEL23	Malignes Melanom
A-549	Lungen-Adenokarzinom	MDA-MB-231	Mamma-Adenokarzinom	SKBR-3	Mamma-Adenokarzinom
CAMA-1	Mamma-Adenokarzinom	MDA-MB-435s	Mamma-Adenokarzinom	SW480	Colorektales Adenokarzinom
IMIM	Pankreas-Adenokarzinom	MCF-7	Mamma-Adenokarzinom		

Tabelle 8: Verwendete humane Tumorzelllinien

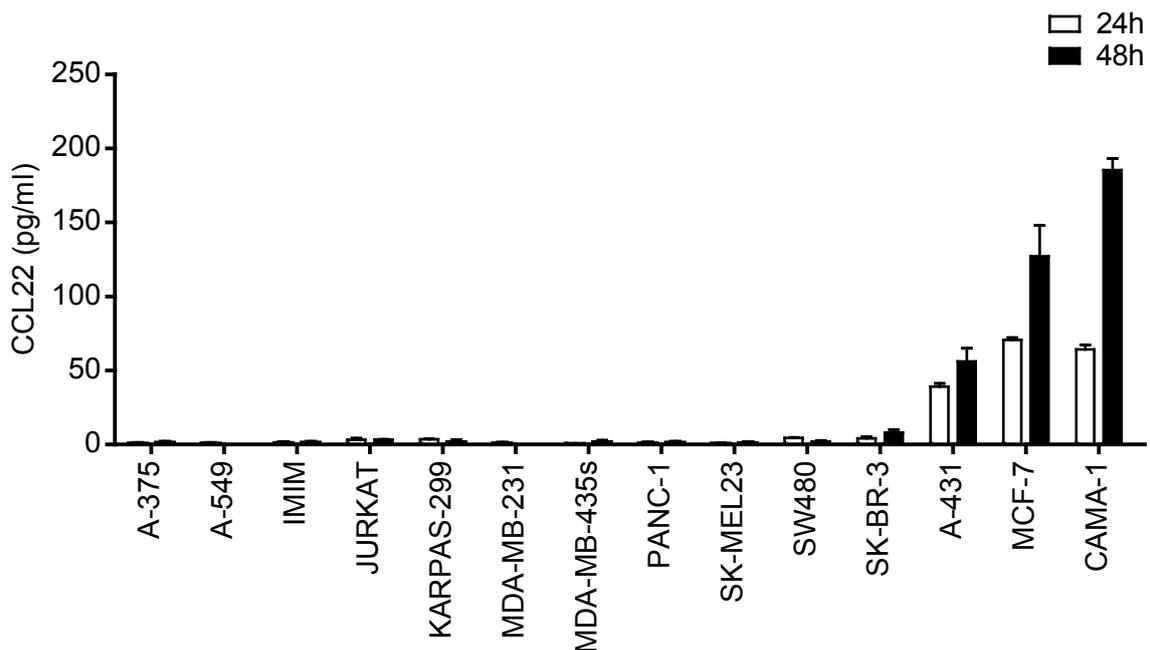


Abbildung 1: CCL22-Sekretion durch humane Tumorzelllinien

Verschiedene humane Tumorzelllinien wurden *in vitro* kultiviert und deren Überstände nach 24 h und 48 h abgenommen. Die per ELISA bestimmte CCL22-Konzentration in den Überständen ist dargestellt als Mittelwert + SEM.

Nach 24 h Zellkultur der Mammakarzinom-Zelllinien CAMA-1, MCF-7, SKBR-3 und der Epidermoidkarzinom-Zelllinie A-431 waren schon messbare CCL22-Konzentrationen in den Überständen vorhanden. Diese waren nach 48 h

nochmals signifikant höher. Alle anderen untersuchten Zelllinien zeigten allerdings keine messbare CCL22-Konzentration in den Überständen. Von 14 untersuchten Tumorzelllinien sezernierten nur die Mammakarzinom-Zelllinien CAMA-1, MCF-7 und SKBR-3 sowie die Epidermoidkarzinom-Zelllinie A-431 konstitutiv CCL22 (Abbildung 1).

4.1.2 Interferon- γ induziert CCL22 in einzelnen Tumorzelllinien

Es war bereits durch *in vitro*-Experimente beschrieben, dass das Zytokin Interferon- γ in Tumorzellen des humanen Mammakarzinoms die CCL22-Sekretion induziert (Faget et al. 2011). Ob die Interferon- γ -vermittelte Induktion von CCL22 einen allgemeinen Mechanismus von Tumorzellen darstellt, war hingegen noch nicht untersucht worden. Maligne Zellen könnten so auf die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine reagieren und durch CCL22-Sekretion ein immunsuppressives Milieu schaffen, um einer Immunantwort zu entkommen.

Es sollte untersucht werden, ob Interferon- γ auch in anderen Tumorentitäten die CCL22-Expression hochreguliert. Im folgenden Experiment wurden humane Tumorzellen 14 verschiedener Linien (Tabelle 8) *in vitro* kultiviert und unterschiedlich behandelt: Eine Gruppe wurde nur mit Standard-Zellmedium versorgt, die andere Gruppe wurde zusätzlich mit Interferon- γ (100 ng/ml) behandelt. Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen. Anschließend wurde per ELISA die CCL22-Konzentration bestimmt.

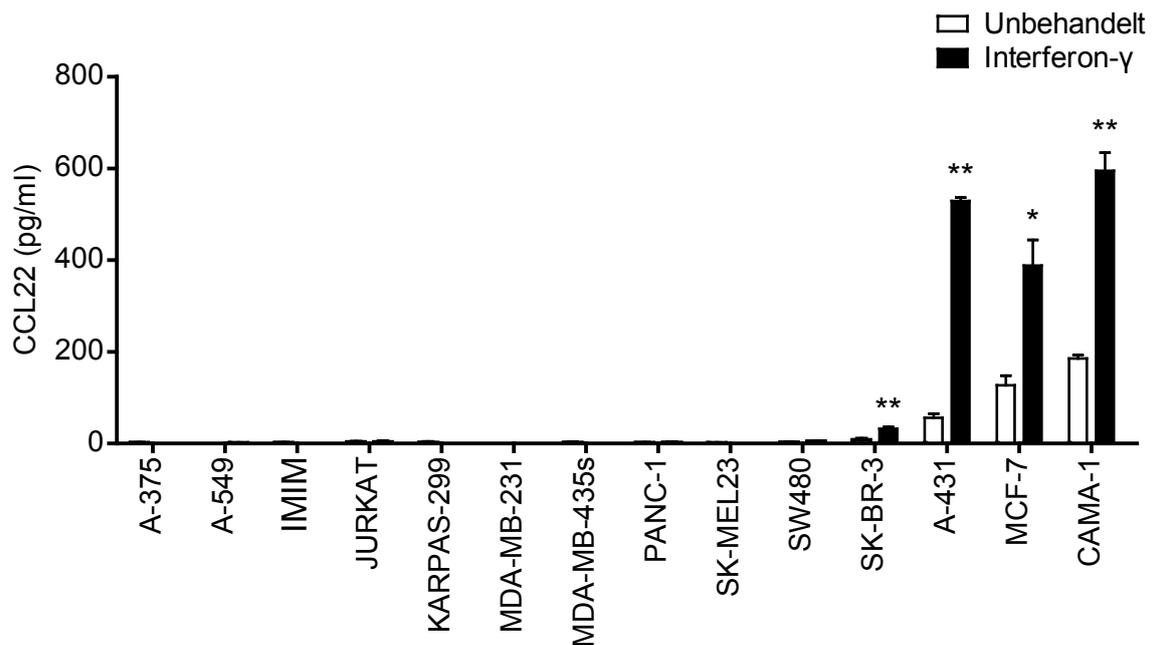


Abbildung 2: Stimulation der CCL22-Sekretion durch Interferon- γ

Diverse humane Tumorzelllinien wurden *in vitro* kultiviert. Eine Gruppe (unbehandelt) wurde nur mit Standard-Zellmedium versorgt, die andere Gruppe (Interferon- γ) wurde zusätzlich mit Interferon- γ (100 ng/ml) behandelt. Nach 48h wurden die Überstände abgenommen. Die per ELISA bestimmte CCL22-Konzentration in den Überständen ist dargestellt als Mittelwert + SEM. P-Werte wurden im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kondition berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Drei der untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien (CAMA-1, MCF-7 und SKBR-3) und die Epidermoidkarzinom-Zelllinie A-431 sezernierten nach Behandlung mit Interferon- γ signifikant mehr CCL22 als ohne Behandlung. 10 von 14 untersuchten Tumorzelllinien zeigten weder konstitutive noch durch Interferon- γ induzierbare CCL22-Expression (Abbildung 2). Damit konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Interferon- γ -vermittelte Hochregulation von CCL22 nur für die untersuchten Zelllinien des Mammakarzinoms und des Epidermoid-Karzinoms galt, die ohne Behandlung ohnehin schon konstitutiv CCL22 exprimierten.

4.1.3 Von mononukleären Leukozyten freigesetzte Faktoren induzieren CCL22-Sekretion durch Tumorzellen

In unseren Experimenten induzierte rekombinantes Interferon- γ CCL22 in einigen Tumorzelllinien (Abbildung 2). Interferon- γ wird vor allem von aktivierten Th1-Zellen und NK-Zellen exprimiert, die u.a. in mononukleären Leukozyten des peripheren Bluts (PBMC) enthalten sind. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob PBMC Faktoren sezernieren, die die CCL22-Sekretion in Tumorzellen induzieren.

Dafür wurden die humanen Tumorzelllinien MDA-MB-231 (Mammakarzinom), Panc01 (Pankreaskarzinom) und A-549 (Lungenkarzinom) *in vitro* kultiviert. Die Tumorzellen wurden entweder nur in VLE-RPMI-Komplett-Medium (Tumorzellen) oder in den zellfreien Überständen von PBMC (Tumorzellen + PBMC-Überstand) inkubiert. Anschließend wurden die zellfreien Überstände abgenommen und deren CCL22-Konzentration per ELISA bestimmt. Zur Gewinnung der PBMC-Überstände wurden zuvor PBMC in VLE-RPMI-Komplett-Medium (Konzentration $2,6 \times 10^6$ PBMC / ml Medium) *in vitro* kultiviert. Die Überstände hierfür wurden nach 72 h abgenommen.

Im Zellkulturmedium alleine sowie in den Überständen der unbehandelten Tumorzellen war CCL22 nicht nachweisbar. In den Überständen unbehandelter PBMC ließ sich eine CCL22-Konzentration von ca. 200 pg/ml nachweisen. Überstände von Tumorzellen, die in PBMC-Überständen kultiviert wurden, zeigten für alle untersuchten Tumorzelllinien eine signifikant höhere CCL22-Konzentration im Vergleich zu der schon in den PBMC-Überständen gegebenen CCL22-Konzentration (Abbildung 3).

PBMC setzten demzufolge Faktoren frei, die eine signifikante CCL22-Sekretion durch Tumorzellen induzierten. Dies galt auch für Tumorzelllinien, die keine

Interferon- γ -vermittelte CCL22-Induktion zeigten. Neben Interferon- γ waren demnach noch weitere von mononukleären Zellen freigesetzte Faktoren für die CCL22-Expression in Tumorzellen verantwortlich.

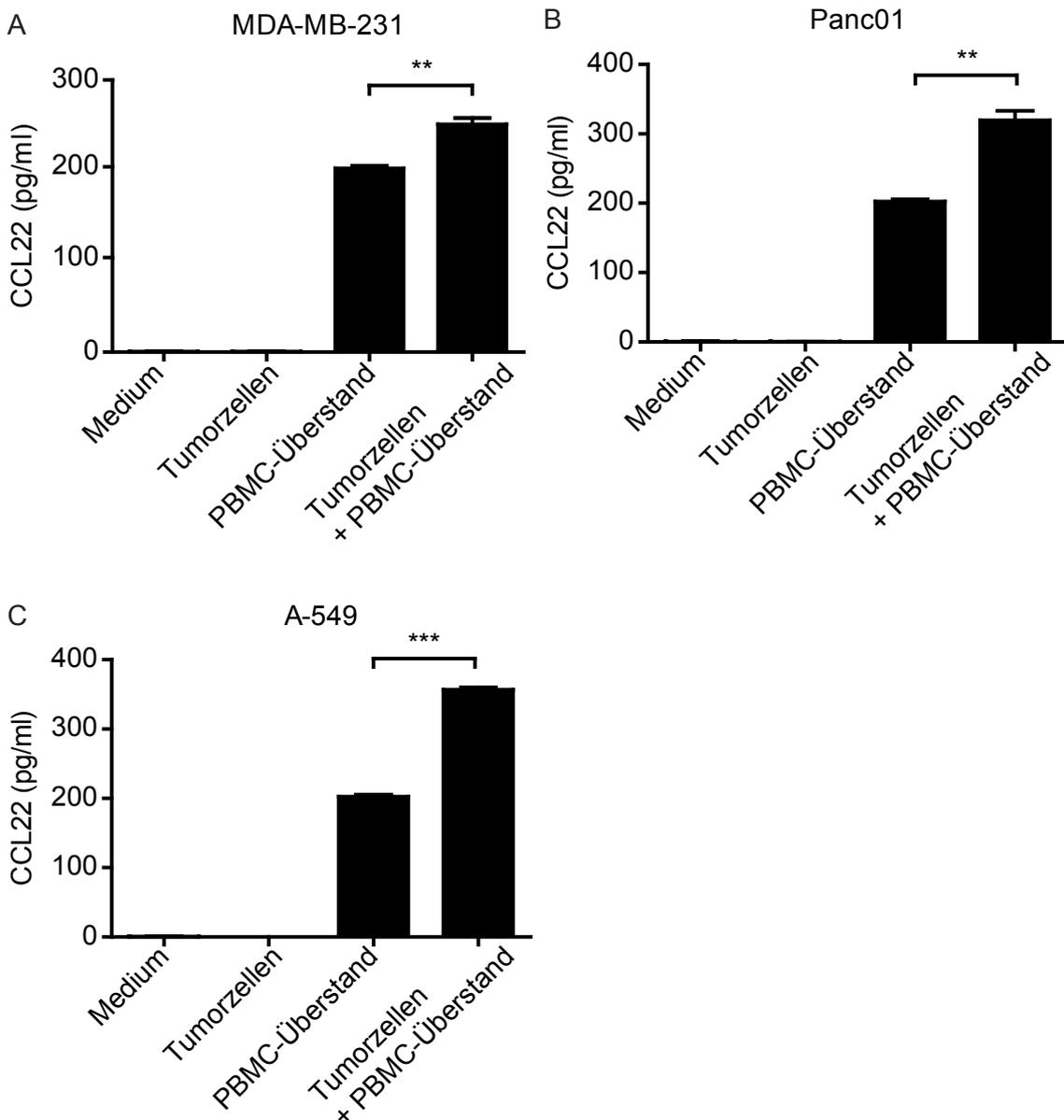


Abbildung 3: CCL22-Induktion in verschiedenen Tumorzelllinien durch von PBMC sezernierte Faktoren

Die humanen Tumorzelllinien **A** MDA-MB-231 (Mammakarzinom), **B** Panc01 (Pankreaskarzinom) und **C** A-549 (Lungenkarzinom) wurden *in vitro* kultiviert. Die Tumorzellen wurden entweder in unbehandeltem T-Zell-Medium oder im zellfreien Überstand zuvor *in vitro* kultivierter unbehandelter PBMC kultiviert. Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen. Die per ELISA bestimmte CCL22-Konzentration in den Überständen ist dargestellt als Mittelwert + SEM. P-Werte wurden zwischen den Konditionen „PBMC-Überstand“ und „Tumorzellen + PBMC-Überstand“ berechnet (**p < 0,01, ***p < 0,001).

4.1.4 CCL22-exprimierende Zellen im humanen Mammakarzinom

Unsere *in vitro* Experimente haben ergeben, dass Tumorzellen unter dem Einfluss von Faktoren aus mononukleären Zellen CCL22 exprimieren und sezernieren. Um zu klären, ob neben Tumorzellen noch weitere Zellen im Tumormilieu CCL22 freisetzen und damit zur Rekrutierung regulatorischer T-Zellen beitragen, wurden in nachfolgend beschriebenen Experimenten Mammakarzinom-Gewebeschnitte immunhistologisch untersucht. Dabei wurden zur übersichtlichen Darstellung der CCL22-exprimierenden Zellen immunhistochemische Färbungen von CCL22 im Tumorgewebe erstellt. Zur genaueren Charakterisierung der Zellen wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von CCL22 und verschiedenen Leukozyten-Markern erstellt und konfokalmikroskopisch ausgewertet.

4.1.4.1 CCL22-exprimierende Zellen sind vor allem im Tumor-umgebenden Stroma lokalisiert

Um die CCL22-Expression im Tumorgewebe darzustellen und um insbesondere die Lokalisation und Zellmorphologie der CCL22-exprimierenden Zellen zu beurteilen, wurden Gewebeschnitte von humanem Mammakarzinom immunhistologisch untersucht. Dabei wurde CCL22 durch einen anti-CCL22 Antikörper detektiert und sowohl immunhistochemisch als auch mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. In den immunhistochemischen Färbungen wurde CCL22 durch das chromogene Substrat DAB in braunem Farbton dargestellt. In den Immunfluoreszenzfärbungen wurde CCL22 durch RRX rot dargestellt. Es wurden Gewebeproben von insgesamt 40 Patientinnen mit nachgewiesenem Mammakarzinom untersucht, darunter Proben mit invasiv-duktalem, invasiv-lobulärem, medullärem und muzinöser Histologie.

Es ließen sich in allen Gewebeproben vereinzelte CCL22-positive Zellen im Tumor-umgebenden Stroma feststellen (Abbildung 4 A, D). In wenigen Proben wurde CCL22 nicht nur im Stroma, sondern auch von Tumorzellen lokal gehäuft exprimiert (Abbildung 4 C). Intrazellulär lag CCL22 im gesamten Zytoplasma verteilt in granulärer Form vor (Abbildung 4 B). Dies deutete auf eine Lokalisation von CCL22 in zytoplasmatischen Speichervesikeln hin. Die im Stroma vorliegenden CCL22-positiven Zellen lieferten morphologisch keinen Hinweis auf Malignität. Die mononukleären Zellen stellten sich bezüglich Größe, Form und Struktur einheitlich und unauffällig dar. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis war ebenfalls unauffällig, da das Zytoplasma einen großen Teil der Zelle einnahm.

Es konnte in Gewebeproben des humanen Mammakarzinoms nachgewiesen werden, dass sowohl Tumorzellen als auch myeloide Zellen das Chemokin CCL22 exprimierten. Dabei war der Großteil der CCL22-exprimierenden Zellen im Tumor-umgebenden Stroma lokalisiert.

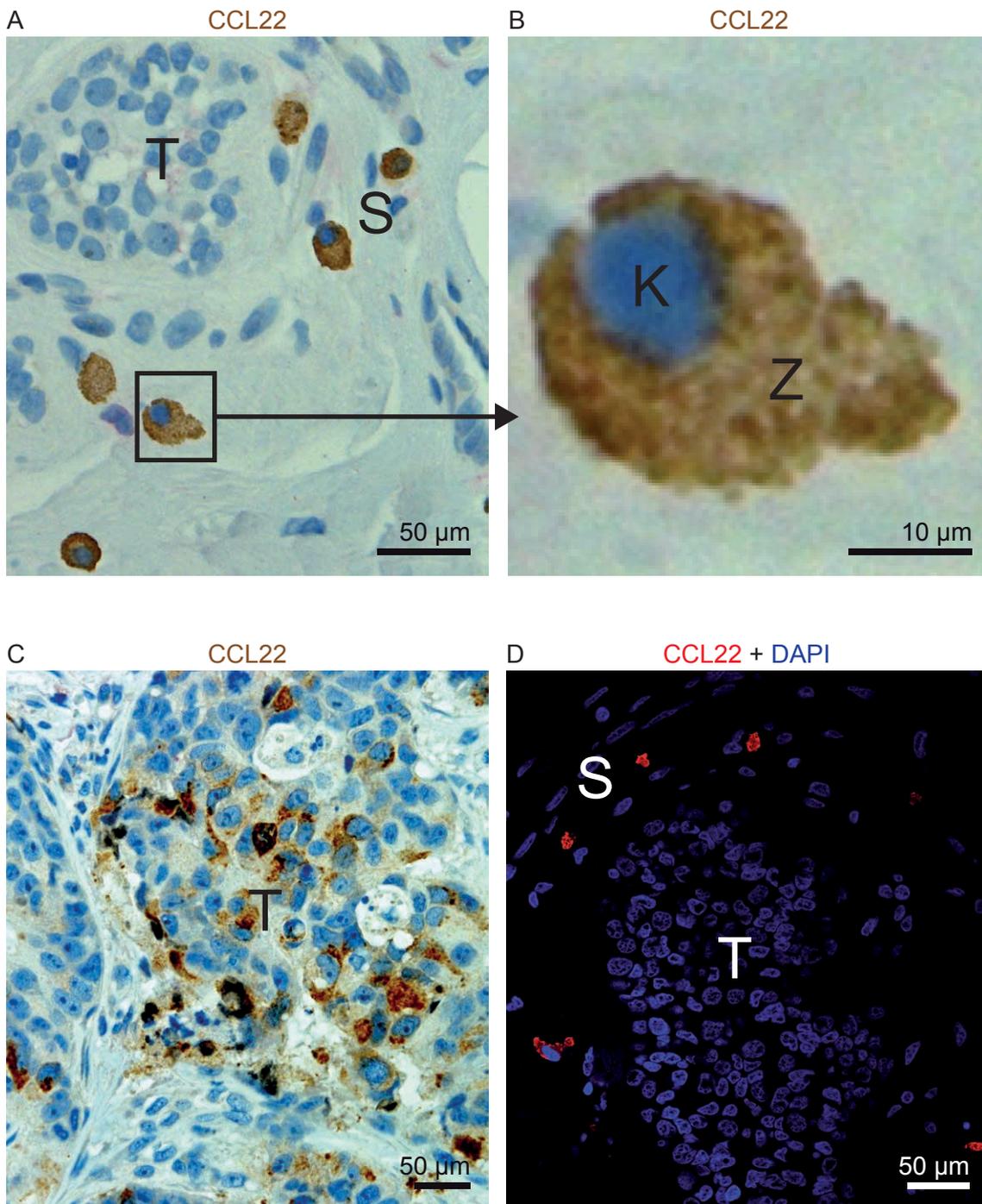


Abbildung 4: CCL22-exprimierende Zellen im humanen Mammakarzinom

Dargestellt sind immunhistologisch gefärbte Gewebeschnitte des humanen Mammakarzinoms. **A, B, C:** Immunhistochemie; CCL22 braun (DAB), Zellkerne blau (Hämatoxylin). **D:** Immunfluoreszenz; CCL22 rot (RRX), Zellkerne blau (DAPI). Mammakarzinom-Subtypen: **A, B, D:** invasiv-lobulär, **C:** invasiv-duktales
 Abkürzungen: T=Tumorgewebe, S=Stroma, K= Zellkern, Z=Zytoplasma

4.1.4.2 Monozyten und unpolarierte Makrophagen exprimieren CCL22 im humanen Mammakarzinom

Morphologie und Lokalisation der CCL22-exprimierenden Zellen deuteten auf einen myeloiden Zelltyp hin. Diese Annahme wurde in den folgenden Experimenten verifiziert.

Zur immunphänotypischen Identifikation der CCL22-exprimierenden Zellen im humanen Mammakarzinom wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von CCL22 und verschiedenen Zellmarkern angefertigt, um anschließend anhand eventueller Kolo-kalisationen Rückschlüsse auf den genauen Zelltyp zu ziehen. Als Kolo-kalisationen wurden positive Signale der beiden Immunfärbungen innerhalb einer betrachteten Zelle definiert. Dabei spielte die räumliche Kolo-kalisation innerhalb der Zelle jedoch keine Rolle. Zur Orientierung im Gewebe wurden außerdem Zellkerne mit Hilfe von DAPI dargestellt. Die nachfolgend gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen wurden in Tumorgewebe einer 33-jährigen Patientin mit medullärem Mammakarzinom (Präparat 1, Tabelle 9) durchgeführt und durch Konfokalmikroskopie untersucht. Ergänzend wurde Gewebe anderer Subtypen des Mammakarzinoms analysiert (Aufnahmen nicht gezeigt).

Um zu zeigen, dass es sich bei CCL22-produzierenden Zellen in humanem Mammakarzinom um Leukozyten handelt, wurden CCL22 und CD45 angefärbt und auf Kolo-kalisation untersucht. CD45 – auch bekannt als *leukocyte common antigen* – ist ein Typ I Transmembranprotein, das ausschließlich von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird und auf einem Großteil der Leukozyten vorhanden ist (Trowbridge et al. 1994). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um das oben beschriebene medulläre Mammakarzinom (Präparat 1, Tabelle 10).

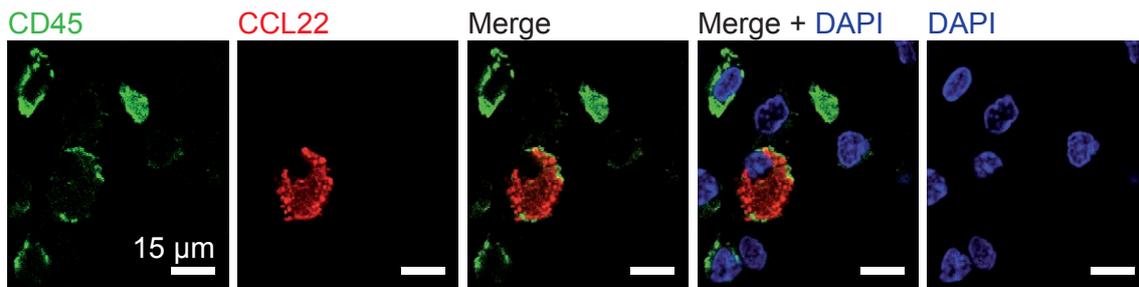


Abbildung 5: CD45/CCL22-Expression im medullären Mammakarzinom

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD45 und CCL22. Die Farbkanäle grün (CD45) und rot (CCL22) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In 33 Gesichtsfeldern konnten 156 CCL22-positive Zellen identifiziert werden, von denen 148 Zellen (95%) auch CD45 exprimierten (Tabelle 10). Die untersuchten CCL22-produzierenden Zellen waren zum Großteil CD45-positiv und somit Leukozyten.

Da die CCL22-Einzelfärbungen und die CD45/CCL22-Doppelfärbung schon zeigten, dass CCL22-produzierende Zellen im humanen Mammakarzinom größtenteils Leukozyten sind, sollte der Zelltyp genauer charakterisiert werden. Um zu untersuchen, ob CCL22-produzierende Zellen monozytären Ursprungs sind, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL22 und CD14 angefertigt. CD14 ist neben TLR-4 und MD-2 Teil des LPS-Rezeptors und dient primär als Marker für Monozyten und Makrophagen, kann jedoch auch von Granulozyten oder dendritischen Zellen monozytären Ursprungs exprimiert werden (Haziot et al. 1988, Spary et al. 2014). CD14 kommt sowohl in membranständiger Form als auch als lösliches Protein vor, das bei Zellaktivierung sezerniert wird (Bufler et al. 1995, Shive et al. 2015). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um medulläres, invasiv-duktales und invasiv-lobuläres Mammakarzinom (Präparate 1-5, Tabelle 10).

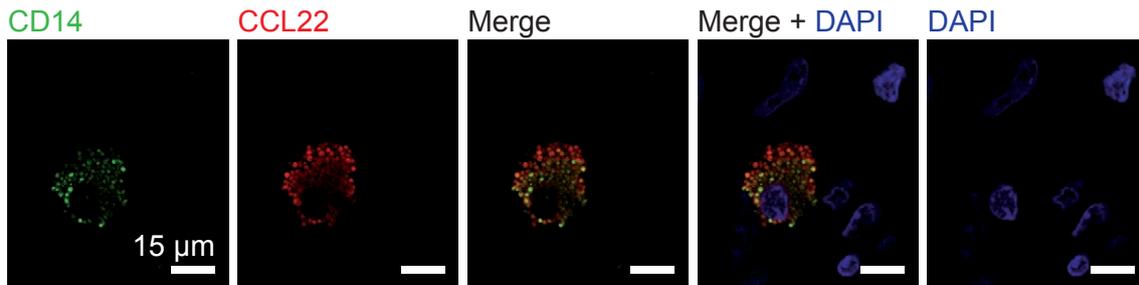


Abbildung 6: CD14/CCL22-Expression im medullären Mammakarzinom

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD14 und CCL22. Die Farbkanäle grün (CD14) und rot (CCL22) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 122 Gesichtsfeldern konnten 483 CCL22-positive Zellen identifiziert werden, von denen 458 (95%) auch CD14 exprimierten. Damit konnten die möglichen CCL22-produzierenden Zelltypen auf Monozyten, von Monozyten stammende dendritische Zellen und Makrophagen eingegrenzt werden. Granulozyten konnten aufgrund der nicht vorhandenen Kernpolymorphie ausgeschlossen werden.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die CCL22-exprimierenden Zellen Monozyten oder Makrophagen sind. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL22 und CD68 angefertigt. CD68 ist als intrazelluläres Glykoprotein beschrieben, das vor allem in Lysosomen und Endosomen von Monozyten und Makrophagen vorhanden ist. Ferner wurde eine CD68-Expression durch Neutrophile, Fibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen beschrieben (Saito et al. 1991, Gottfried et al. 2008). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um medulläres, invasiv-duktales und invasiv-lobuläres Mammakarzinom (Präparate 1-5, Tabelle 10).

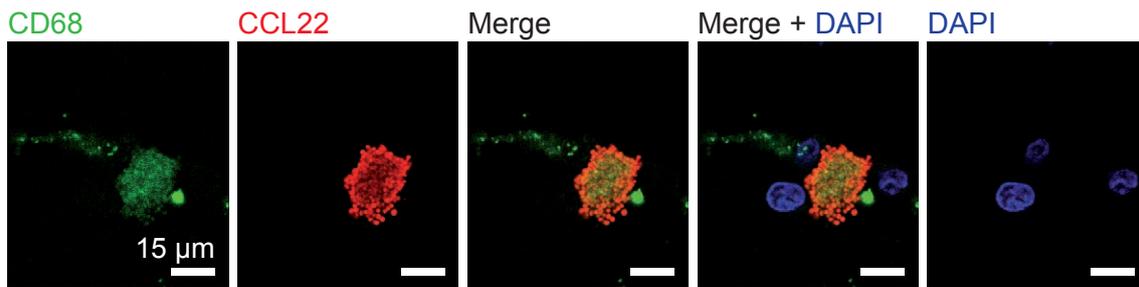


Abbildung 7: CD68/CCL22-Expression im medullären Mammakarzinom

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD68 und CCL22. Die Farbkanäle grün (CD68) und rot (CCL22) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 90 Gesichtsfeldern konnten 315 CCL22-positive Zellen identifiziert werden, von denen 280 (89%) auch CD68 exprimierten. Die möglichen CCL22-produzierenden Zelltypen konnten damit auf Monozyten und Makrophagen eingegrenzt werden.

Klassischerweise können Makrophagen in zwei verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt werden: M1- und M2-Makrophagen. Th1-Zytokine wie Interleukin-2, Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α fördern die Differenzierung zu M1-Makrophagen, welche anti-proliferativ und gewebeschädigend wirken. Th2-Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 verstärken dagegen die Differenzierung zu M2-Makrophagen, welche die Zellproliferation und Gewebereparatur fördern (Mantovani et al. 2010). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die CCL22-exprimierenden Zellen den M1-Makrophagen zuzuordnen sind. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL22 und CD64 angefertigt. CD64 ist ein membranständiger Fc γ -Rezeptor und gilt als Zellmarker für M1-Makrophagen (Martinez et al. 2014). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um medulläres und invasiv-duktales Mammakarzinom (Präparate 1-2, Tabelle 10).

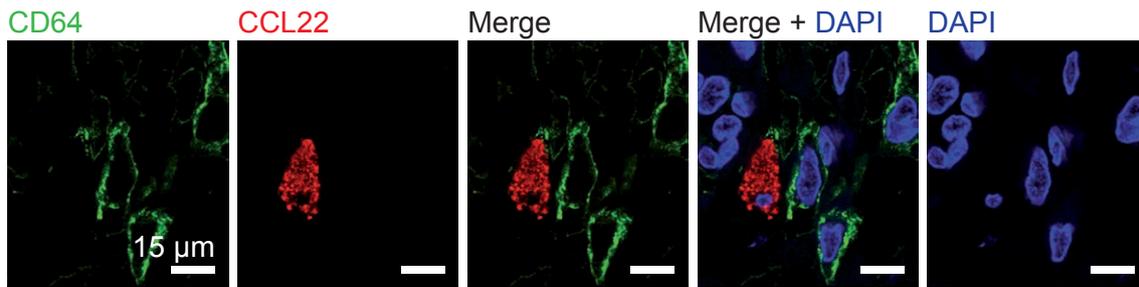


Abbildung 8: CD64/CCL22-Expression im medullären Mammakarzinom

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD64 und CCL22. Die Farbkanäle grün (CD64) und rot (CCL22) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 48 Gesichtsfeldern konnten 178 CCL22-positive Zellen identifiziert werden, von denen keine Zelle (0%) CD64 exprimierte. Die untersuchten CCL22-positiven Zellen waren demnach keine M1-Makrophagen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die CCL22-exprimierenden Zellen M2-Makrophagen sind. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL22 und CD206 angefertigt. CD206 gilt als Zellmarker für M2-Makrophagen (Mills et al. 2015). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um medulläres und invasiv-duktales Mammakarzinom (Präparate 1-2, Tabelle 10).

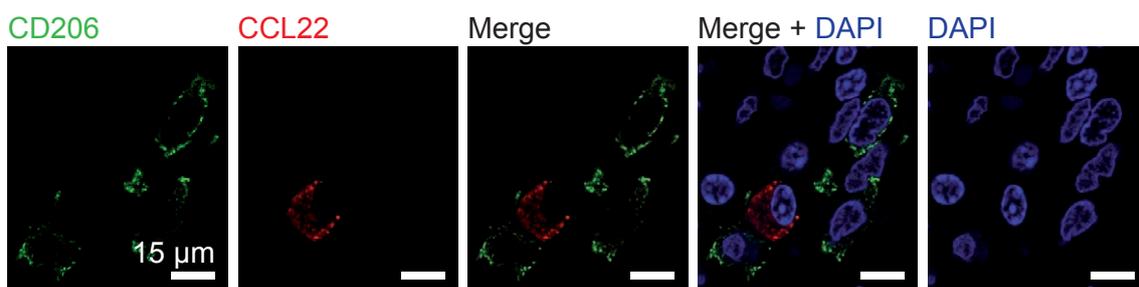


Abbildung 9: CD206/CCL22-Expression im medullären Mammakarzinom

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD206 und CCL22. Die Farbkanäle grün (CD206) und rot (CCL22) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 52 Gesichtsfeldern konnten 227 CCL22-positive Zellen identifiziert werden, von denen 2 Zellen (1%) CD206 exprimierten. Die hier untersuchten CCL22-produzierenden Zellen konnten damit nicht der M2-Subpopulation der Makrophagen zugeordnet werden.

In dieser Arbeit wurde außerdem die CD163-Expression durch CCL22-positive Zellen im Mammakarzinom untersucht. Neben CD206 ist auch CD163 als klassischer Marker für M2-Makrophagen beschrieben. CD163 kann jedoch auch von Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert werden (Maniecki et al. 2006). Immunfluoreszenz des invasiv-lobulären Mammakarzinoms zeigte keine Kollokalisierung von CD163 und CCL22 (Daten nicht gezeigt). Dies untermauerte unsere Beobachtung, dass die untersuchten Zellen nicht dem M2-Subtyp der Makrophagen zuzuordnen waren.

Damit entsprachen die untersuchten CCL22-exprimierenden Zellen am ehesten Monozyten oder unpolarisierten Makrophagen. In nachfolgenden Untersuchungen sollte sicher ausgeschlossen werden, dass es sich um CD68-positive dendritische Zellen handelte (Rasmussen et al. 2000). Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL22 und DC-SIGN angefertigt. DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) ist ein Typ II Transmembranprotein, das spezifisch von unreifen dendritischen Zellen und in geringerem Maße auch von reifen dendritischen Zellen exprimiert wird (Geijtenbeek et al. 2000). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um medulläres Mammakarzinom (Präparat 1, Tabelle 10).

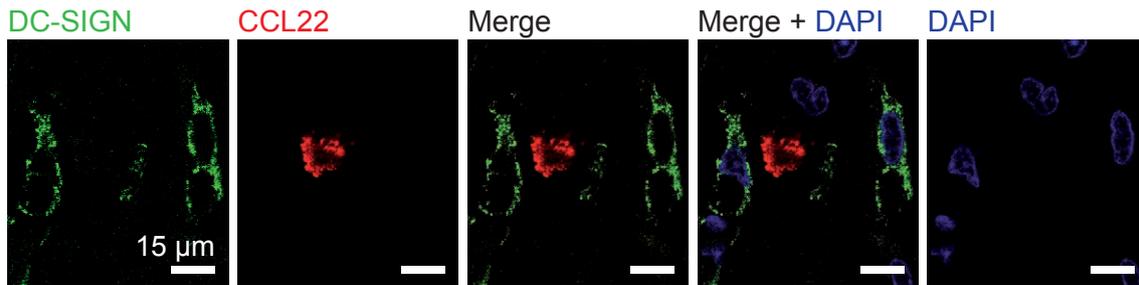


Abbildung 10: DC-SIGN/CCL22-Expression im medullären Mammakarzinom
 Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von DC-SIGN und CCL22. Die Farbkanäle grün (DC-SIGN) und rot (CCL22) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 10 Gesichtsfeldern konnten 31 CCL22-positive Zellen identifiziert werden, von denen keine Zelle (0%) DC-SIGN exprimierte. Die untersuchten CCL22-exprimierenden Zellen waren DC-SIGN-negativ und damit keine unreifen dendritischen Zellen.

Im Folgenden sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den CCL22-produzierenden Zellen im Mammakarzinom um reife dendritische Zellen handelte. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL22 und DC-LAMP angefertigt. DC-LAMP (*Dendritic Cell Lysosome-Associated Membrane glycoProtein*) ist ein membranständiges Glykoprotein und gilt als Zellmarker für reife dendritische Zellen (De Saint-Vis et al. 1998). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um medulläres, invasiv-duktales und invasiv-lobuläres Mammakarzinom (Präparate 1-5, Tabelle 10).

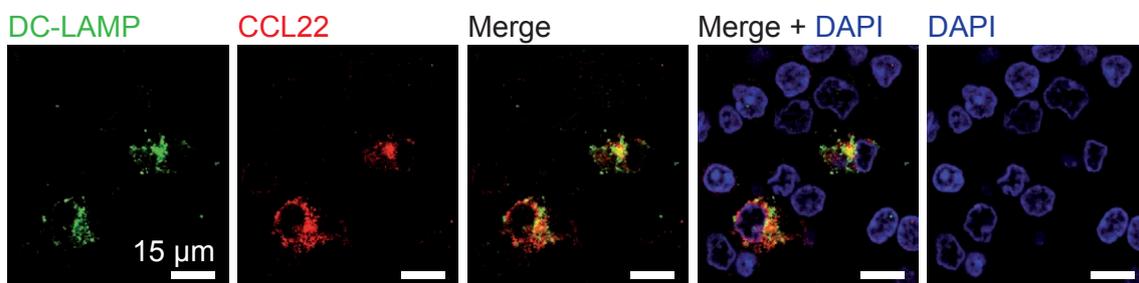


Abbildung 11: DC-LAMP/CCL22-Expression im medullären Mammakarzinom
 Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von DC-LAMP und CCL22. Die Farbkanäle grün (DC-LAMP) und rot (CCL22) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 79 Gesichtsfeldern konnten 290 CCL22-positive Zellen identifiziert werden, von denen 13 Zellen (4%) DC-LAMP exprimierten. Die hier untersuchten CCL22-exprimierenden Zellen waren somit weitestgehend DC-LAMP-negativ und damit keine reifen dendritischen Zellen.

Zusammenfassend waren die im humanen Mammakarzinom untersuchten CCL22-exprimierenden Zellen CD45+CD14+CD68+. Die weiteren untersuchten Zellmarker CD64, CD206, DC-SIGN und DC-LAMP wurden nicht in relevantem Ausmaß exprimiert (Abbildung 12). CCL22-exprimierende Zellen im humanen Mammakarzinom sind folglich am ehesten Monozyten und unpolarisierte Makrophagen.

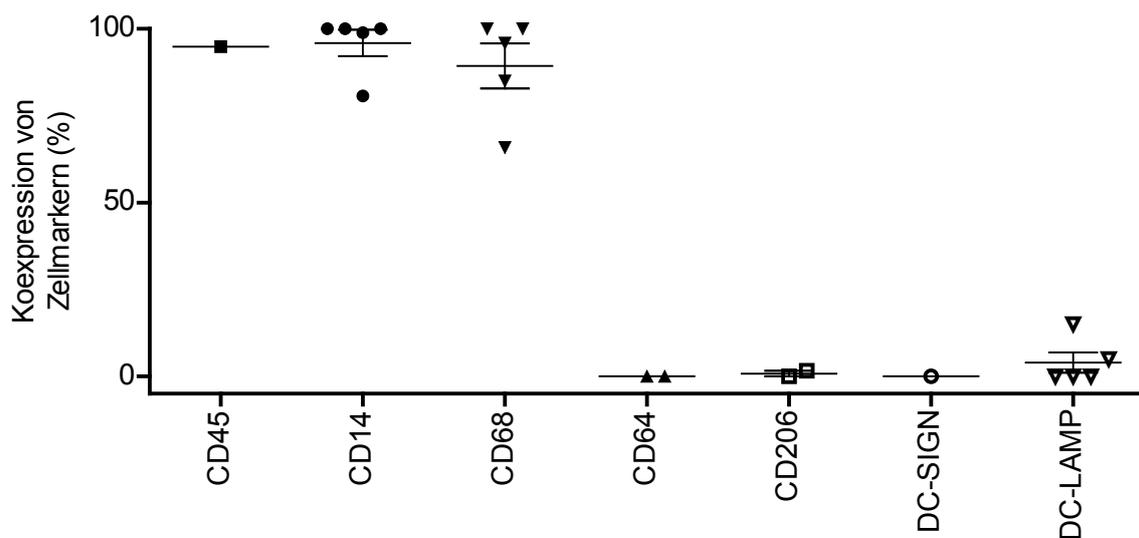


Abbildung 12: Koexpression verschiedener Zellmarker durch CCL22-positive Zellen im Mammakarzinom

Gezeigt ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von CCL22 und den verschiedenen Zellmarkern. Auf der x-Achse sind die verschiedenen untersuchten Zellmarker angegeben. Der über den Quotienten aus $\text{Zellmarker}^+ \text{CCL22}^+ / \text{CCL22}^+$ gebildete Wert wird als einzelner Punkt entlang der y-Achse im Diagramm dargestellt (Angaben in %). Dargestellt ist jeweils ein Wert pro Patient. Anzahl der verschiedenen untersuchten Mammakarzinom-Patienten: CD45 (n=1), CD14 (n=5), CD68 (n=5), CD64 (n=2), CD206 (n=2), DC-SIGN (n=1), DC-LAMP (n=5)

Präparat	1	2	3	4	5
Histologie	medullär	invasiv-dukta	invasiv-dukta	invasiv-lobulär	invasiv-dukta
Patientenalter (Jahre)	33	65	42	41	52
Grading	3	3	2	2	3
TNM	pT3N0Mx	pT2N1bM1	pT1bN1Mx	pT2N2aMx	pT2N0Mx
Rezeptor (ER/PR)	1xpos	neg	pos	3xpos	3xpositiv
Her2neu	3xpos	3xpos	neg	0	3xpos
CD8	3	1	N/A	1	1
CCL22	2	1	N/A	2	1
Foxp3	3	1	N/A	1	1

Tabelle 9: Klinische und histopathologische Daten zum untersuchten Mammakarzinom-Gewebe

Dargestellt sind ergänzende Daten zum untersuchten Mammakarzinom-Gewebe. Angegeben sind jeweils das Alter der Patienten bei der Probenentnahme, das Grading des Tumors, das TNM-Stadium, Östrogen-/Progesteron-Rezeptor-Expression, Her2neu-Expression, die Anzahl CD8-positiver Zellen (semiquantitativ), die Anzahl CCL22-positiver Zellen (semiquantitativ) und die Anzahl Foxp3-positiver Zellen (semiquantitativ); semiquantitative Angaben: 0=negativ, 1=wenige, 2=mäßig, 3=vielen

Präparat	Histologie	Zellmarker	%Zellmarker+ von CCL22+	%CCL22+ von Zellmarker+	Anzahl CCL22+	Anzahl Zellmarker+	Anzahl Gesichtsfelder
1	medullär	CD14	100	80	165	205	41
2	invasiv-dukta	CD14	81	97	124	103	19
3	invasiv-dukta	CD14	100	98	44	45	21
4	invasiv-lobulär	CD14	99	98	87	88	20
5	invasiv-dukta	CD14	100	97	63	65	21
1	medullär	CD45	95	-	156	-	33
1	medullär	CD64	0	0	96	553	31
2	invasiv-dukta	CD64	0	0	82	188	17
1	medullär	CD68	85	11	39	287	13
2	invasiv-dukta	CD68	66	34	79	151	16
3	invasiv-dukta	CD68	96	87	48	53	20
4	invasiv-lobulär	CD68	100	72	94	130	20
5	invasiv-dukta	CD68	100	39	55	142	21
1	medullär	CD206	2	1	127	293	34
2	invasiv-dukta	CD206	0	0	100	100	18
1	medullär	DC-LAMP	15	18	81	68	21
2	invasiv-dukta	DC-LAMP	0	0	72	68	24
3	invasiv-dukta	DC-LAMP	0	0	24	1	10
4	invasiv-lobulär	DC-LAMP	0	0	93	8	14
5	invasiv-dukta	DC-LAMP	5	100	20	1	10
1	medullär	DC-SIGN	0	0	31	70	10

Tabelle 10: Koexpression verschiedener Zellmarker durch CCL22-positive Zellen im Mammakarzinom

Dargestellt sind die aus der konfokalmikroskopischen Analyse der Mammakarzinom-Gewebeproben gewonnenen Daten zur Koexpression verschiedener Zellmarker durch CCL22-positive Zellen. Zu den einzelnen Präparaten und den jeweiligen untersuchten Zellmarkern sind die durch Auszählen ermittelten Daten angegeben.

4.2 Expression des Chemokins CCL28 in gesundem Gewebe und im Mammakarzinom

CCL28 wurde als Chemokin beschrieben, das unter hypoxischen Bedingungen im Tumorgewebe des Ovarialkarzinoms exprimiert wird und regulatorische T-Zellen rekrutiert, die im Tumormilieu einen immunsuppressiven Effekt ausüben, was zu verkürztem Überleben von Patienten führt (Facciabene et al. 2011). Bisher war jedoch nicht gezeigt, in welchen Zellen CCL28 exprimiert wird. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte ermittelt werden, in welchen Organen CCL28 exprimiert wird. Daneben sollte geklärt werden, welche Zellen im Tumormilieu für die CCL28-Expression verantwortlich sind.

4.2.1 Im murinen Modell wird CCL28 vor allem in lymphatischen Organen und im Gastrointestinaltrakt exprimiert

CCL28 wird im tumorfreien Organismus unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli vor allem von Colon- und Gallengangsepithel sezerniert (Ogawa et al. 2004, Eksteen et al. 2006). Genaue Daten zur Expression in anderen Organen lagen jedoch noch nicht vor. Im Folgenden sollte daher die CCL28-Expression in verschiedenen Organen untersucht werden. Dazu wurden folgende Organe aus vier unbehandelten Wildtyp C57BL/6-Mäusen entnommen und lysiert: Magen, Pankreas, Dünndarm, Colon, Milz, Thymus, Peyer-Plaques, mesenteriale und periphere Lymphknoten. Zusätzlich wurden Tumorzellen der Zelllinie C26 (murines Colonkarzinom) subkutan in sechs C57BL/6-Mäuse injiziert. Nach Anwachsen des Tumors zu einer Größe von 125 mm² wurde der Tumor entnommen und lysiert. Anschließend wurde die CCL28-Konzentration in den jeweiligen Organ- und Tumorlysaten per ELISA bestimmt und bezüglich der durch Bradford-Test ermittelten Gesamtproteinmasse normiert angegeben.

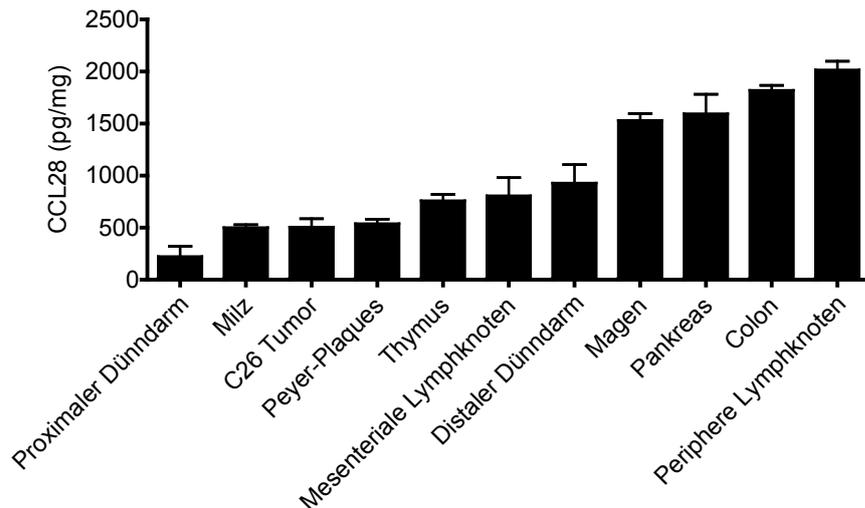


Abbildung 13: CCL28-Expression in murinen Organen

In murinen Organlysaten wurde die CCL28-Konzentration per ELISA bestimmt. Die abgebildeten Säulen im Diagramm geben die gemessene CCL28-Konzentration im jeweiligen Organ an. Die Werte sind bezüglich der durch Bradford-Test ermittelten Gesamtproteinmasse normiert und als Mittelwert + SEM angegeben.

Die höchste CCL28-Expression wurde in peripheren Lymphknoten, Colon, Pankreas und Magen gemessen (über 1.500 pg/mg). Dagegen zeigten Dünndarm, mesenteriale Lymphknoten, Thymus, Peyer-Plaques, Milz und der C26-Tumor nur mäßige CCL28-Expression (unter 1.000 pg/mg). CCL28 wurde vor allem in peripheren Lymphknoten und in einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts, besonders in Colon, Pankreas und Magen, vermehrt exprimiert. Die CCL28-Expression im murinen Tumormodell für das Colonkarzinom war im Vergleich zu gesundem Gewebe nicht erhöht.

4.2.2 CCL28-exprimierende Zellen im humanen Mammakarzinom

Um zu klären, welche Zellen im humanen Mammakarzinom CCL28 produzieren und damit zur Rekrutierung regulatorischer T-Zellen ins Tumormilieu beitragen, wurden in nachfolgend beschriebenen Experimenten Mammakarzinom-Gewebeschnitte von 33 Patientinnen immunhistologisch untersucht (Tabelle 11).

Präparat	Patientenalter	Histologie	TNM-Stadium	Grading	ER/PR Rezeptor	Her2neu	CCL28 Gesamt	CCL28 Tumor	CCL28 Non-Tumor
1	77	inv.-duct.	pT3N0Mx	3	neg	3xpos	2	3	1
2	64	inv.-duct.	pT1cN0Mx	3	3xpos	neg	1	0	2
3	57	inv.-duct.	ypT2N3aMx	3	3xpos	3xpos	1,5	1	2
4	26	inv.-duct.	pT1cN1M1	3	mini pos	neg	0,5	0	1
5	55	inv.-duct.	pT3N2aMx	3	neg	3xpos	1,5	1	2
6	71	inv.-duct.	pT3N2aMx	3	neg	neg	1,5	1	2
7	44	inv.-duct.	pT4cN3aMx	3	2xpos	3xpos	2	3	1
8	41	inv.-duct.	pT1cN2aMx	3	2xpos	3xpos	2	2	2
9	69	inv.-duct.	pT1cN0Mx	3	neg	3xpos	1	0	2
10	38	inv.-duct.	pT1cN2aMx	3	2xpos	neg	2	2	2
11	62	inv.-duct.	pT1cN0Mx	3	neg	neg	1,5	0	3
12	66	inv.-duct.	pT2(m)N1aMx	2	3xpos	neg	2	2	2
13	49	inv.-duct.	ypT2pN1aMx	3	neg	3xpos	0,5	0	1
14	40	inv.-duct.	pT1b(m)N1miMx	2	2xpos	pos(FISH)	1	0	2
15	56	inv.-duct.	pT3N3aMx	3	neg	3xpos	2	2	2
16	68	inv.-duct.	pT1cN0Mx	3	3xpos	neg	0,5	0	1
17	74	inv.-duct.	pT2N1aMx	2	3xpos	neg	1	0	2
18	67	inv.-duct.	pT2N0Mx	2	2xpos	neg	1,5	2	1
19	42	inv.-lob.	ypT2N1aMx	2	2xpos	neg	1,5	1	2
20	41	inv.-lob.	pT2N2aMx	2	3xpos	0	2	2	2
21	73	inv.-lob.	pT1cN0Mx	2	3xpos	neg	2,5	3	2
22	39	medullär	pT2N0Mx	3	1xpos	neg	2	1	3
23	44	medullär	ypT2N0Mx	3	1xpos	neg	1,5	0	3
24	71	medullär	pT2N0Mx	3	3xpos	neg	1,5	1	2
25	33	medullär	pT3N0Mx	3	1xpos	3xpos	2	1	3
26	40	medullär	pT2NxMx	3	2xpos	pos(FISH)	2	1	3
27	32	medullär	pT2pN1aMx	3	2xpos	neg	3	3	3
28	49	medullär	pT1cN0Mx	3	neg	neg	0,5	0	1
29	62	medullär	pT1bN0Mx	2	mini pos	neg	1,5	0	3
30	53	medullär	ypT2N1Mx	3	neg	neg	1	1	1
31	68	medullär	pT1cN0Mx	3	neg	neg	1	0	2
32	58	muzinös	pT1cNxMx	2	2xpos	neg	2	2	2
33	78	muzinös	pT2N0Mx	2	3xpos	neg	2	3	1

Tabelle 11: Klinische und histopathologische Daten zum untersuchten Mammakarzinom-Gewebe

Dargestellt sind ergänzende Daten zum untersuchten Mammakarzinom-Gewebe. Angegeben sind jeweils das Alter der Patienten bei der Probenentnahme, Histologie, TNM-Stadium, Grading, Östrogen-/Progesteron-Rezeptor-Expression, Her2neu-Expression, Anzahl der gesamten CCL28-positiven Zellen (CCL28 Gesamt) bzw. nur der nach morphologischen Kriterien CCL28-positiven Tumorzellen (CCL28 Tumor) und der CCL28-positiven benignen Zellen (CCL28 Non-Tumor). Die CCL28-Expression ist semiquantitativ dargestellt (0=negativ, 1=wenige, 2=mäßig, 3=viele).

Für die Beschreibung von Morphologie und Lokalisation der CCL28-exprimierenden Zellen wurden zunächst immunhistochemische Färbungen von CCL28 im Tumorgewebe erstellt. Zur genaueren Charakterisierung der Zellen wurden anschließend Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von CCL28 und verschiedenen Leukozyten-Markern erstellt und konfokalmikroskopisch ausgewertet.

4.2.2.1 Stromazellen und Tumorzellen im humanen Mammakarzinom exprimieren CCL28

Zur Untersuchung der CCL28-Expression im Mammakarzinom wurde CCL28 durch einen anti-CCL28 Antikörper detektiert und sowohl immunhistochemisch als auch mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. In den immunhistochemischen Färbungen wurde CCL28 durch das chromogene Substrat DAB in braunem Farbton dargestellt. In den Immunfluoreszenzfärbungen wurde CCL28 durch RRX rot dargestellt. Es wurden Gewebeproben von insgesamt 33 Patientinnen mit nachgewiesenem Mammakarzinom untersucht (Tabelle 11).

Die CCL28-positiven Zellen waren sowohl im Tumorgewebe selbst als auch im Tumor-umgebenden Stroma lokalisiert (Abbildung 14 A, B). Intrazellulär lag CCL28 diffus im gesamten Zytoplasma verteilt vor. Die direkt im Tumorgewebe lokalisierten CCL28-positiven Zellen zeigten morphologisch Hinweise für Malignität. Hier ließen sich pathologisch vergrößerte, uneinheitlich und atypisch geformte Zellen erkennen. Die Zellen hatten variable Größe mit einem Gesamtdurchmesser von bis zu 75 µm und einen entrundeten Kern mit einem Durchmesser von bis zu 25 µm. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis war uneinheitlich. Die im Tumor-umgebenden Stroma lokalisierten CCL28-positiven Zellen stellten sich bezüglich Größe, Form und Struktur einheitlich dar und entsprachen nach morphologischen Kriterien am ehesten Leukozyten.

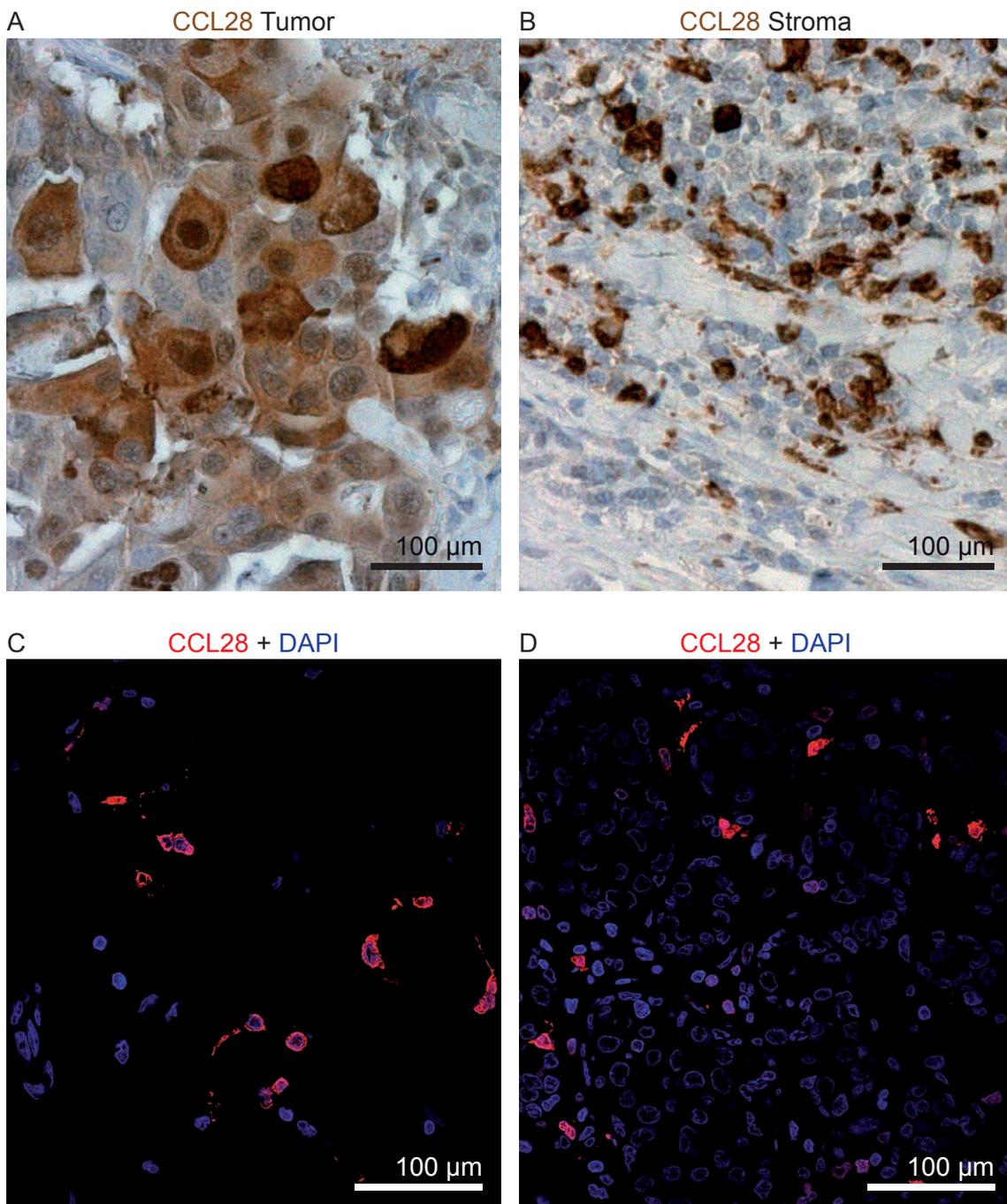


Abbildung 14: CCL28-exprimierende Zellen im humanen Mammakarzinom
Dargestellt sind immunhistologisch gefärbte Gewebeschnitte des humanen Mammakarzinoms. **A, B:** Immunhistochemie; CCL28 braun (DAB), Zellkerne blau (Hämatoxylin) **C, D:** Immunfluoreszenzfärbung; CCL28 rot (RRX), Zellkerne blau (DAPI). Mammakarzinom-Subtypen: **A:** invasiv-ductal; **B:** medullär **C, D:** invasiv-lobulär

Alle 33 untersuchten Gewebeproben wiesen CCL28-Expression in Leukozyten auf. In 21 von 33 Proben bestand dazu CCL28-Expression durch Tumorzellen. Damit konnte gezeigt werden, dass CCL28 im humanen Mammakarzinom sowohl von Stromazellen als auch von Tumorzellen exprimiert wird.

4.2.2.2 CCL28-Expression im humanen Mammakarzinom in Abhängigkeit von Histologie und Tumorgroße

Da CCL28 sowohl von Stromazellen als auch von Tumorzellen exprimiert wird, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob es bei der CCL28-Expression Unterschiede zwischen den verschiedenen histologischen Typen des humanen Mammakarzinoms gibt. Außerdem wurde die CCL28-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen T-Stadien des Mammakarzinoms analysiert.

Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen von CCL28 in Mammakarzinom-Gewebeproben von insgesamt 33 Patientinnen nach folgenden Kriterien analysiert (Tabelle 11, Abbildung 15): Bezüglich der Expressionsrate von CCL28 wurde semiquantitativ zwischen - (keine), + (geringe), ++ (mäßige) und +++ (starke) Expression unterschieden. Dabei wurde zusätzlich je nach Zellmorphologie differenziert zwischen Leukozyten und Tumorzellen. Bei der Beurteilung der CCL28-Expression in verschiedenen Stadien des Mammakarzinoms wurden die jeweiligen pathologischen T-Stadien nach der TNM-Klassifikation zur Zeit der Probenentnahme berücksichtigt.

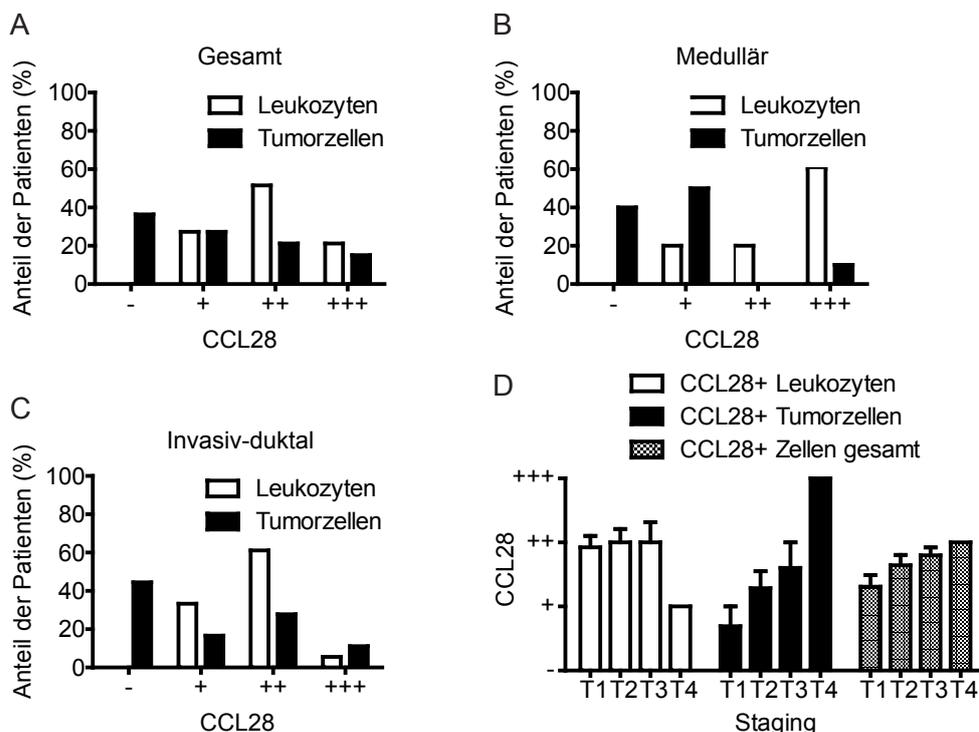


Abbildung 15: CCL28-Expression in Abhängigkeit von Subtyp und Tumorstadium des Mammakarzinoms

Dargestellt sind Daten zur CCL28-Expressionsrate in humanem Mammakarzinom-Gewebe verschiedener Patienten. Die Auswertung basierte auf immunhistochemischen Färbungen und erfolgte semiquantitativ: - = keine, + = geringe, ++ = mäßige, +++ = starke Expression. Bei CCL28-positiven Zellen wurde unterschieden zwischen Leukozyten und Tumorzellen. **A** Daten zu allen untersuchten Patienten (n=33) **B** Daten zu Patienten mit medullärem Mammakarzinom (n=10) **C** Daten zu Patienten mit invasiv-ductalem Mammakarzinom (n=18) **D** Daten zu CCL28-Expression in Abhängigkeit vom klinischen T-Stadium der Patienten (T1: n=13; T2: n=14; T3: n=5; T4: n=1) und vom Zelltyp (nur CCL28-positive Leukozyten, nur CCL28-positive Tumorzellen, gesamte CCL28-positive Zellen). Angabe als Mittelwert + SEM. ANOVA Einfaktorielle Varianzanalyse für „CCL28+ Tumorzellen“: p=0,096

Von allen untersuchten Gewebeproben zeigten 64% CCL28-Expression durch Tumorzellen (Abbildung 15 A). Dabei war eine unterschiedlich hohe Expressionsrate von „gering“ bis „stark“ zu beobachten. Alle untersuchten Präparate zeigten CCL28-Expression durch Leukozyten. Bei 52% der Präparate bestand eine „mäßige“ CCL28-Expression durch Leukozyten. Bezüglich CCL28-Expression unterschieden sich der medulläre Subtyp und der invasiv-ductale Subtyp nicht wesentlich (Abbildung 15 B, C). In beiden Subtypen bestand zu 60% (medullär) bzw. 56% (invasiv-ductal) CCL28-Expression durch Tumorzellen. CCL28-Expression durch Leukozyten war in allen T-Stadien ähnlich stark ausgeprägt (Abbildung 15 D). Bei der CCL28-Expression durch Tumorzellen zeigte sich ein Trend in Richtung höherer T-Stadien, der jedoch nicht signifikant war (p=0,096, Abbildung 15 D).

4.2.2.3 Makrophagen exprimieren CCL28 im humanen Mammakarzinom

Wir konnten durch die immunhistochemische Darstellung CCL28-exprimierender Zellen im Mammakarzinom zeigen, dass sowohl Tumorzellen als auch Stromazellen CCL28 produzieren. Welcher Zelltyp im Stroma CCL28 exprimiert, war jedoch nicht bekannt und wurde daher in den folgenden Experimenten untersucht.

Zur Identifikation der CCL28-exprimierenden Zellen wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von CCL28 und verschiedenen Zellmarkern angefertigt, um anschließend anhand eventueller Kollokationen Rückschlüsse auf den genauen Zelltyp zu ziehen. Als Kollokationen wurden positive Signale der beiden Immunfärbungen innerhalb einer betrachteten Zelle definiert. Dabei spielte die räumliche Kollokation innerhalb der Zelle jedoch keine Rolle. Zur Orientierung im Gewebe wurden außerdem Zellkerne mit Hilfe von DAPI dargestellt. Die nachfolgend gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen wurden in Tumorgewebe einer 41-jährigen Patientin mit invasiv-lobulärem Mammakarzinom (Präparat 6, Tabelle 12) durchgeführt und durch Konfokalmikroskopie visualisiert.

Um zu untersuchen, ob es sich bei CCL28-produzierenden Zellen in humanem Mammakarzinom um Leukozyten handelt, wurden CCL28 und CD45 angefärbt und auf Kollokation untersucht.

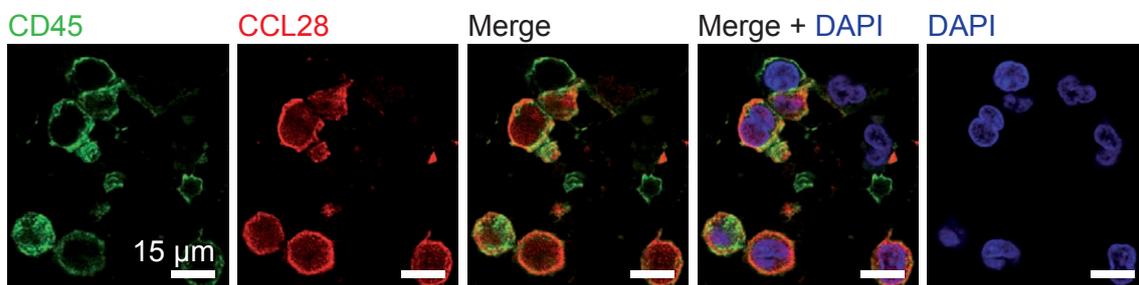


Abbildung 16: CD45/CCL28-Expression im invasiv-lobulären Mammakarzinom
Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD45 und CCL28. Die Farbkanäle grün (CD45) und rot (CCL28) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In 22 Gesichtsfeldern konnten 112 CCL28-positive Zellen identifiziert werden, von denen 94 Zellen (84%) auch CD45 exprimierten (Tabelle 13). Es konnte damit gezeigt werden, dass die hier im humanen Mammakarzinom untersuchten CCL28-exprimierenden Zellen größtenteils Leukozyten waren.

Um zu untersuchen, ob CCL28-exprimierende Zellen monozytären Ursprungs sind, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL28 und CD14 angefertigt.

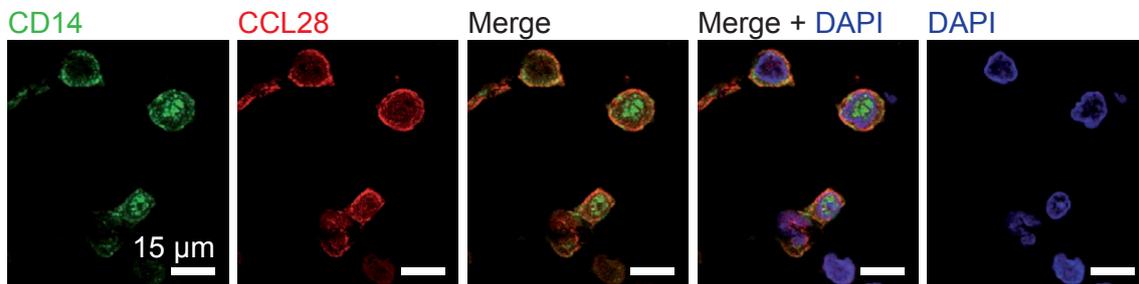


Abbildung 17: CD14/CCL28-Expression im invasiv-lobulären Mammakarzinom
Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD14 und CCL28. Die Farbkanäle grün (CD14) und rot (CCL28) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In 27 Gesichtsfeldern konnten 122 CCL28-positive Zellen identifiziert werden, von denen 119 (98%) auch CD14 exprimierten (Tabelle 13). Damit konnten die möglichen CCL28-exprimierenden Zelltypen auf Monozyten, von Monozyten stammende dendritische Zellen und Makrophagen eingegrenzt werden. Granulozyten konnten aufgrund der nicht vorhandenen Kernpolymorphie ausgeschlossen werden.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die CCL28-exprimierenden Zellen Monozyten oder Makrophagen waren. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL28 und CD68 angefertigt.

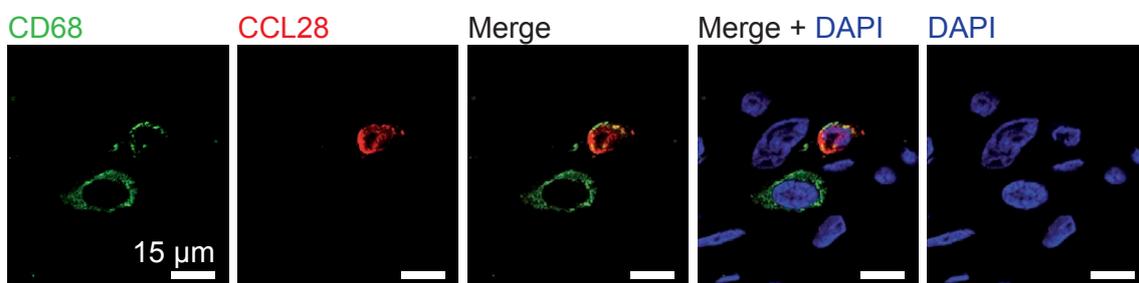


Abbildung 18: CD68/CCL28-Expression im invasiv-lobulären Mammakarzinom
Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD68 und CCL28. Die Farbkanäle grün (CD68) und rot (CCL28) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 28 Gesichtsfeldern konnten 141 CCL28-positive Zellen identifiziert werden, von denen 116 (82%) auch CD68 exprimierten (Tabelle 13). Die möglichen CCL28-exprimierenden Zelltypen konnten damit auf Monozyten und Makrophagen eingegrenzt werden.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die CCL28-exprimierenden Zellen den M2-Makrophagen zuzuordnen waren. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CCL28 und CD206 angefertigt.

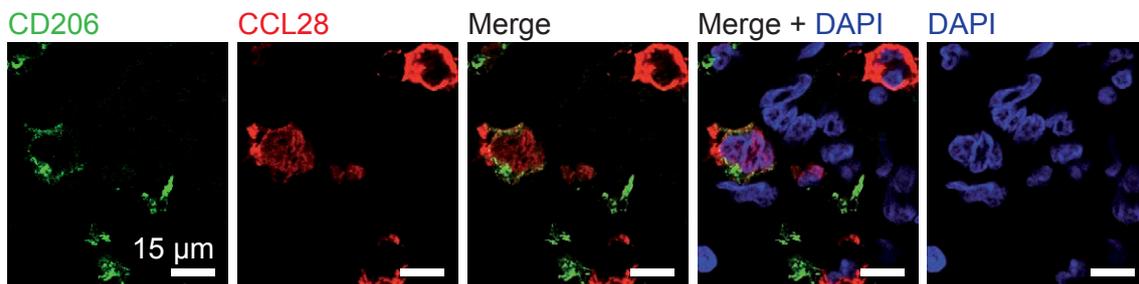


Abbildung 19: CD206/CCL28-Expression im invasiv-lobulären Mammakarzinom
Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD206 und CCL28. Die Farbkanäle grün (CD206) und rot (CCL28) sind einzeln dargestellt, dazu deren Überlagerung (Merge) mit und ohne blauem Farbkanal (Kernfärbung DAPI).

In insgesamt 30 Gesichtsfeldern konnten 100 CCL28-positive Zellen identifiziert werden, von denen 37 Zellen (37%) CD206 exprimierten (Tabelle 13). Somit konnte gezeigt werden, dass die hier untersuchten CCL28-exprimierenden Zellen im humanen Mammakarzinom Monozyten oder Makrophagen waren, die teilweise dem M2-Subtyp zugeordnet werden konnten.

Fallnummer	6
Histologie	invasiv-lobulär
Patientenalter (Jahre)	41
Grading	2
TNM	pT2N2aMx
Rezeptor (ER/PR)	3xpos
Her2neu	0
CD8	1
CCL22	2
CCL28 Tumor	2
CCL28 Stroma	2
Foxp3	1

Tabelle 12: Klinische und histopathologische Daten zum untersuchten Mammakarzinom-Gewebe

Dargestellt sind ergänzende Daten zum untersuchten Mammakarzinom-Gewebe. Angegeben sind jeweils das Alter des Patienten bei der Probenentnahme, das Grading des Tumors, das TNM-Stadium, Östrogen-/Progesteron-Rezeptor-Expression, Her2neu-Expression, die Anzahl CD8-positiver Zellen (semiquantitativ), die Anzahl CCL22-positiver Zellen (semiquantitativ), die Anzahl CCL28-positiver Zellen (semiquantitativ; Differenzierung zwischen Tumor- und Stromalokalisation) und die Anzahl Foxp3-positiver Zellen (semiquantitativ); semiquantitative Angaben: 0=negativ, 1=wenige, 2=mäßig, 3=viele

Präparat	Histologie	Zellmarker	%Zellmarker+ von CCL28+	%CCL28+ von Zellmarker+	Anzahl CCL28+	Anzahl Zellmarker+	Anzahl Gesichtsfelder
6	invasiv-lobulär	CD14	98	98	122	121	27
6	invasiv-lobulär	CD45	84	20	112	478	22
6	invasiv-lobulär	CD68	82	31	141	379	28
6	invasiv-lobulär	CD206	37	30	100	123	30

Tabelle 13: Koexpression verschiedener Zellmarker durch CCL28-positive Zellen im Mammakarzinom

Dargestellt sind die aus der konfokalmikroskopischen Analyse der Mammakarzinom-Gewebeproben gewonnenen Daten zur Koexpression verschiedener Zellmarker durch CCL28-positive Zellen. Zu den einzelnen Gewebeproben und den jeweiligen untersuchten Zellmarkern sind die durch Auszählen ermittelten Daten angegeben.

Zusammenfassend waren die hier untersuchten CCL28-exprimierenden Zellen im humanen Mammakarzinom CD45+CD14+CD68+ und teilweise (37%) CD206+. Die weiteren untersuchten Zellmarker CD64, DC-SIGN und DC-LAMP wurden nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die hier untersuchten CCL28-exprimierenden Zellen im humanen Mammakarzinom waren folglich Monozyten und Makrophagen, die am ehesten dem M2-Typ entsprachen.

4.3 Systemische Expression der Chemokine CCL22 und CCL28

Wir konnten bereits für das humane Mammakarzinom zeigen, dass Monozyten und Makrophagen im Tumorgewebe und Tumor-umgebenden Stroma CCL22 und CCL28 exprimieren. Ob diese lokal tumorvermittelte Chemokinexpression auch zu systemisch erhöhten Chemokinkonzentrationen führt, war bisher nicht untersucht worden. Eine systemisch erhöhte Konzentration der Chemokine CCL22 und CCL28 könnte im Rahmen einer Tumorerkrankung zu einer Mobilisierung regulatorischer T-Zellen und damit zu einer generalisierten Immunsuppression führen. In diesem Fall könnte die Serum-CCL22- oder CCL28-Konzentration als prognostischer Biomarker für das Ansprechen auf eine immunstimulatorische Therapie wie beispielsweise den CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab dienen. In den nachfolgenden Experimenten sollte daher die systemische CCL22- und CCL28-Expression in Tumorpatienten und gesunden Probanden untersucht werden.

4.3.1 Monozyten im peripheren Blut exprimieren CCL22

CCL22-exprimierende Zellen im Mammakarzinom konnten als Monozyten oder unpolarisierte Makrophagen identifiziert werden. Ob auch im peripheren Blut zirkulierende Monozyten CCL22 exprimieren, war bisher nicht hinreichend geklärt und wurde daher im nachfolgend beschriebenen Experiment überprüft. Hierfür wurden aus dem Blut eines gesunden Spenders PBMC isoliert. Diese wurden anschließend immunphänotypisch im Durchflusszytometer analysiert. Zunächst sollte sichergestellt werden, dass die für die Durchflusszytometrie verwendete intrazelluläre CCL22-Färbung spezifisch war. Humane PBMC wurden *in vitro* 24 h mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin behandelt, um die Zytokinausschüttung zu stimulieren. Anschließend wurde in den Zellen durch einen PE-gekoppelten anti-CCL22 Antikörper intrazellulär vorliegendes CCL22 detektiert. Als Negativkontrollen der Intrazellulärfärbung

dienten PBMC, die entweder nicht permeabilisiert, ohne anti-CCL22 Antikörper oder mit einer passenden Isotypenkontrolle behandelt wurden (Abbildung 20 A – C). Da sich nur in der Kondition mit Permeabilisierung und anti-CCL22 Antikörper eine eindeutig positive Zellfraktion zeigte (Abbildung 20 D), konnte in nachfolgenden Färbungen von einer spezifischen Bindung des anti-CCL22 Antikörpers an intrazellulär vorliegendes CCL22 ausgegangen werden.

Im Folgenden sollte der Anteil CCL22-positiver Zellen in humanen PBMC ermittelt werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob es sich bei den Zellen um Monozyten handelt. Hierfür wurden PBMC mit oder ohne Stimulation durch PMA und Ionomycin im Durchflusszytometer auf CCL22-Expression untersucht. Außerdem wurden folgende Zellmarker auf Koexpression mit CCL22 getestet: CD14, das innerhalb der PBMC vor allem von Monozyten exprimiert wird, und CD86, das insbesondere von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Nach 24 h Stimulation mit PMA und Ionomycin waren 19% der PBMC CCL22-positiv (Abbildung 20 D). Bei Analyse direkt nach der PBMC-Isolierung aus dem Blut waren 10% der PBMC CCL22-positiv (Abbildung 20 F). Von den CCL22-positiven PBMC waren 57% CD14-positiv und 79% CD86-positiv (Abbildung 20 F, G). Im gesunden Probanden exprimierten 10% der PBMC CCL22. Der Großteil dieser Zellen entsprach Monozyten (CD14+CD86+).

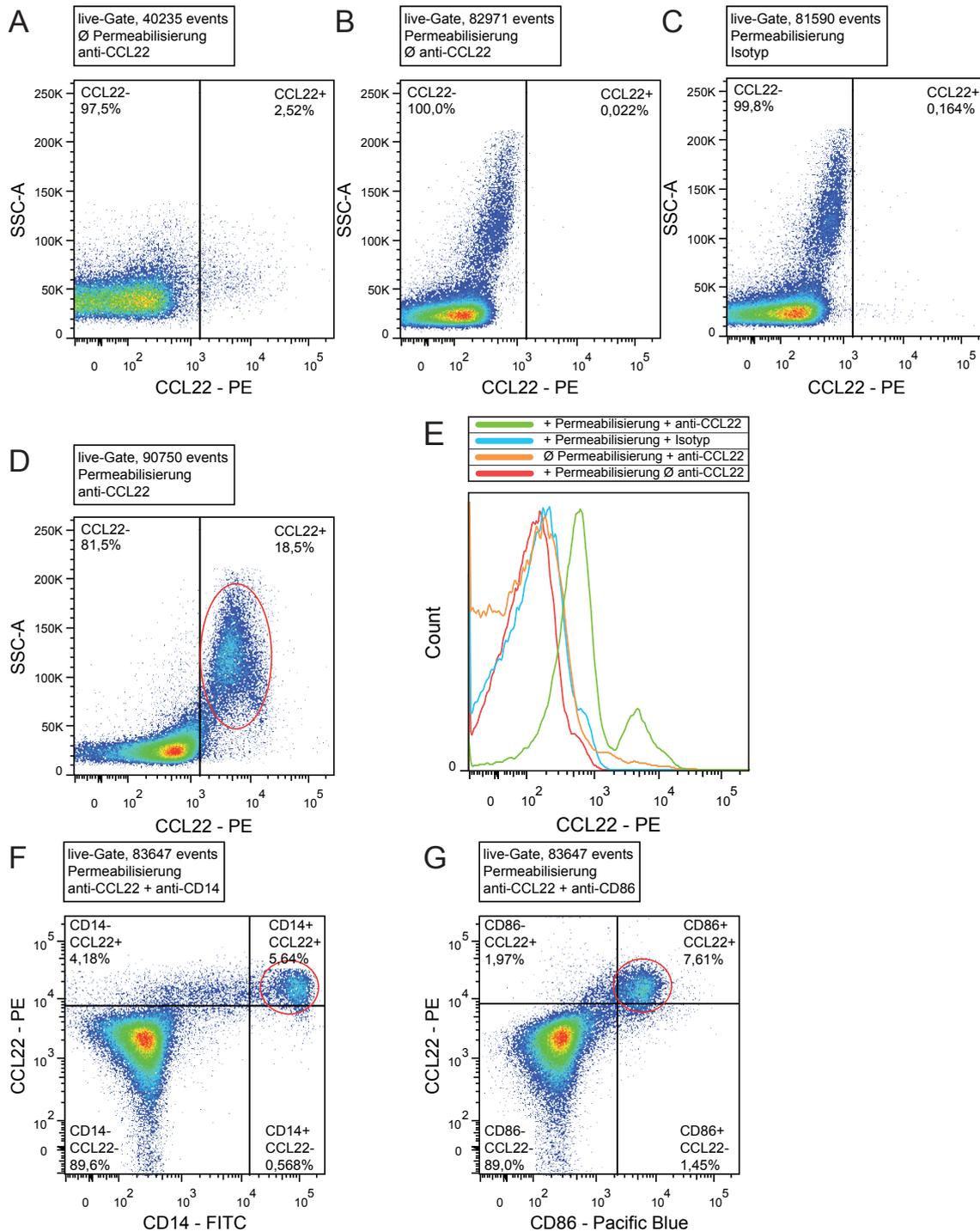


Abbildung 20: CCL22-Expression in humanen PBMC

A-E Kontrollfärbungen: Humane PBMC wurden 24 h *in vitro* mit PMA und Ionomycin stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. **A** ohne Permeabilisierung, mit anti-CCL22 Antikörper; **B** mit Permeabilisierung, ohne anti-CCL22 Antikörper; **C** mit Permeabilisierung, mit Isotyp-Antikörper; **D** mit Permeabilisierung, mit anti-CCL22 Antikörper; **E** CCL22-Kontrollfärbungen (aus **A-D**) als Histogramm; **F-G** Kofärbungen mit anti-CD14 Antikörper und anti-CD86 Antikörper: Humane PBMC wurden direkt nach Isolation aus dem Blut durchflusszytometrisch untersucht. **F** CD14- und CCL22-Expression in humanen PBMC; **G** CD86- und CCL22-Expression in humanen PBMC; Rote Kreise kennzeichnen die CCL22-positiven Zellpopulationen.

4.3.2 Tumorpatienten weisen keine erhöhte CCL22- oder CCL28-Konzentration im Serum auf

Es ist bereits gezeigt worden, dass im Tumorgewebe vermehrt CCL22 und CCL28 exprimiert wird (Tabelle 2, Facciabene et al. 2011). Unsere immunhistologische Analyse ergab, dass CCL22 und CCL28 vor allem im gut vaskularisierten Tumor-umgebenden Stroma exprimiert werden. Dazu zeigten die durchflusszytometrischen Untersuchungen, dass auch im peripheren Blut CCL22-exprimierende Zellen vorliegen. Die tumorvermittelte Induktion von CCL22 und CCL28 könnte sich also durchaus auf erhöhte Chemokinkonzentrationen im peripheren Blut auswirken und damit auch einen systemischen Einfluss auf die Immunregulation haben oder als Tumormarker dienen. In nachfolgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob Tumorerkrankungen zu veränderten Konzentrationen von CCL22 oder CCL28 im peripheren Blut führen.

Zuerst sollten eventuell störende Einflussfaktoren in Bezug auf die Chemokinkonzentration ausgeschlossen werden, insbesondere Alter, Geschlecht und entzündliche Prozesse. Dazu wurden die gemessenen CCL22- und CCL28-Konzentrationen auf Korrelation sowohl mit Alter oder Geschlecht der Probanden als auch mit der Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) getestet. In der Analyse zeigten sich keine signifikanten Korrelationen mit Alter, Geschlecht oder CRP-Konzentration. Die Serumkonzentration von CCL22 erwies sich als zeitlich verhältnismäßig konstant mit Abweichungen unter 175 pg/ml zwischen zwei Zeitpunkten mit mindestens zwei Wochen Abstand (Abbildung 21). Dagegen war die Serumkonzentration von CCL28 weniger persistent mit Abweichungen bis zu 4.635 pg/ml zwischen zwei Zeitpunkten mit mindestens zwei Wochen Abstand (Abbildung 22). Potentielle Einflussfaktoren in Bezug auf die CCL22- und CCL28-Serumkonzentration wie Alter, Geschlecht und entzündliche Prozesse konnten damit weitgehend ausgeschlossen werden.

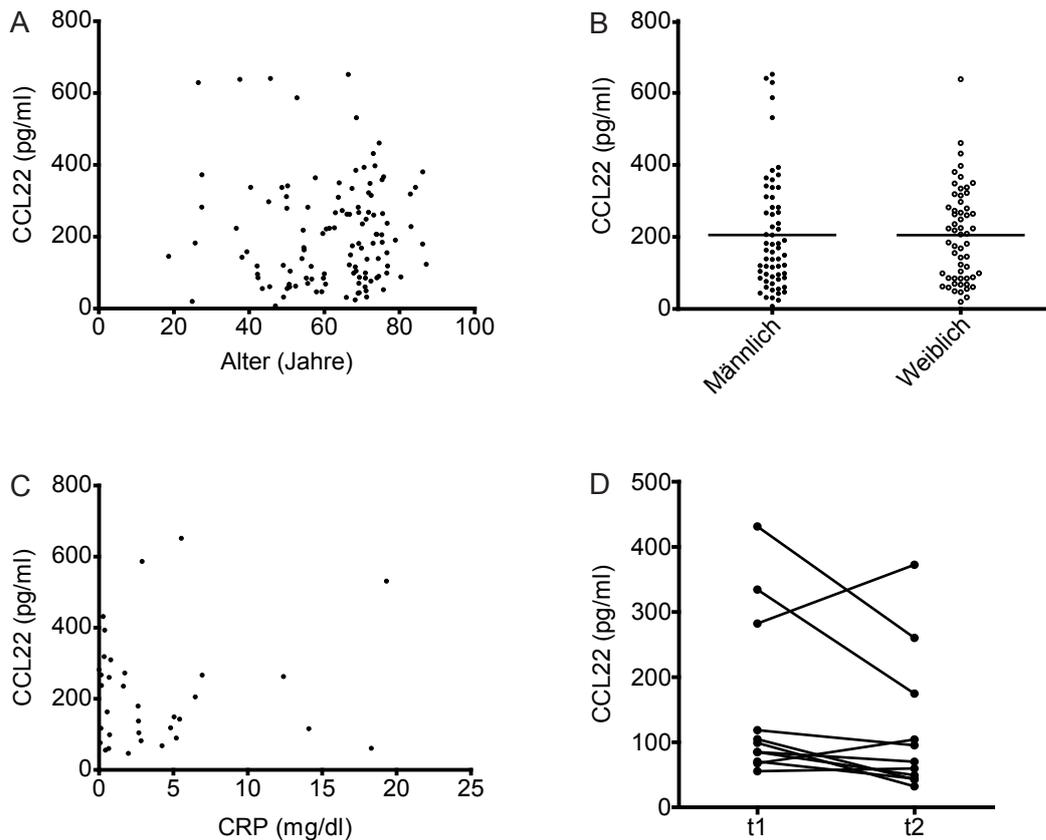


Abbildung 21: CCL22-Konzentration im Serum der untersuchten Patienten

Jeder Punkt im Diagramm stellt die CCL22-Konzentration im Serum eines Patienten dar **A** CCL22-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Patientenalter (19 bis 87 Jahre, n=119) **B** CCL22-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Geschlecht (männlich: n=62; weiblich: n=57) **C** CCL22-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Entzündungsmarker CRP (n=34) **D** CCL22-Serumkonzentration im zeitlichen Verlauf (n=2x11); Die Zeitpunkte t1 und t2 der Blutentnahme sind um mindestens 2 Wochen versetzt.

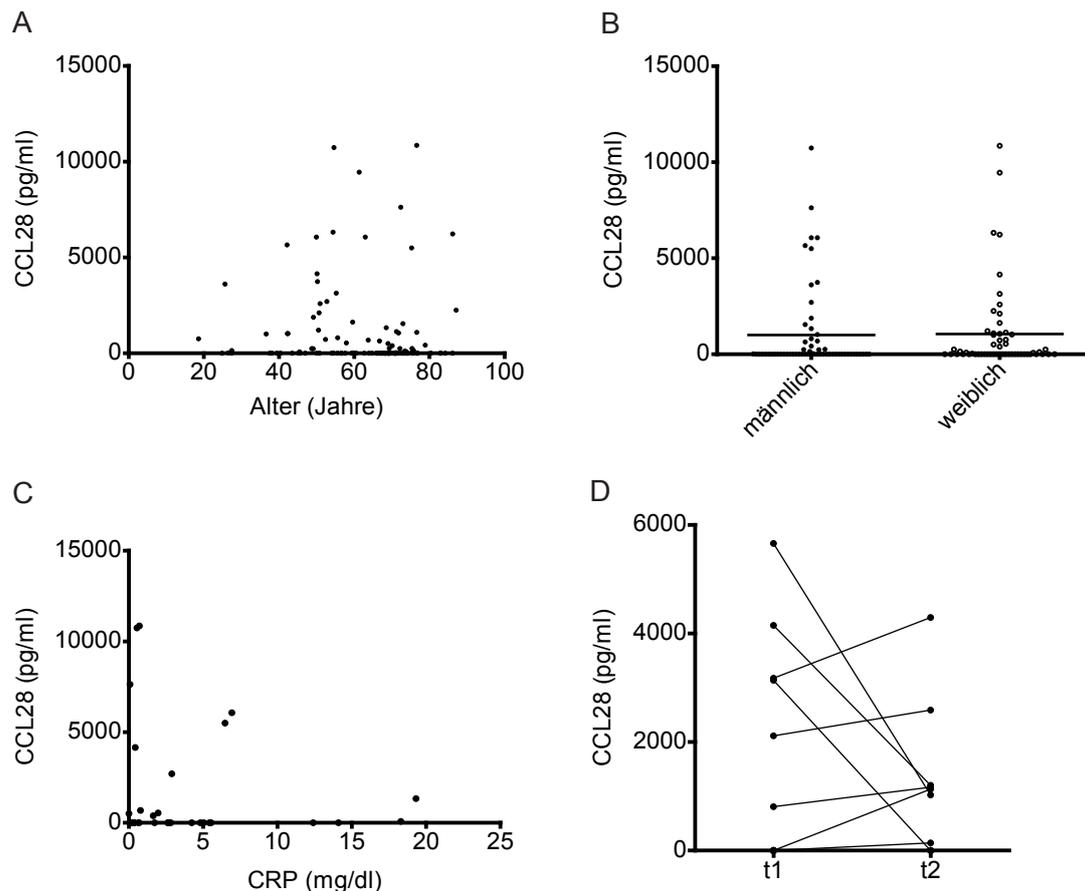


Abbildung 22: CCL28-Konzentration im Serum der untersuchten Patienten

Jeder Punkt im Diagramm stellt die CCL28-Konzentration im Serum eines Patienten dar **A** CCL28-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Patientenalter (19 bis 87 Jahre, n=118) **B** CCL28-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Geschlecht (männlich: n=62; weiblich: n=56) **C** CCL28-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Entzündungsmarker CRP (n=34) **D** CCL28-Serumkonzentration im zeitlichen Verlauf (n=2x13); Die Zeitpunkte t1 und t2 der Blutentnahme waren um mindestens 2 Wochen versetzt.

Es sollte überprüft werden, ob Tumorerkrankungen die CCL22-Konzentration im Blut beeinflussen. Dazu wurde die CCL22-Konzentration in humanem Serum per ELISA gemessen und dabei zwischen Patienten mit bzw. ohne Tumorerkrankung und gesunden Probanden unterschieden. Untersucht wurden insgesamt 119 Patienten im Alter von 19 bis 87 Jahren. Davon litten 29 Patienten an einem Karzinom, 43 Patienten an einer hämatologischen Neoplasie und 21 Patienten an einem Melanom. Den Krebspatienten gegenübergestellt wurden zum einen 26 Patienten, die wegen nicht-neoplastischen Erkrankungen in stationärer Behandlung waren, und 77 gesunde Kontrollpersonen im Alter von 22 bis 69 Jahren.

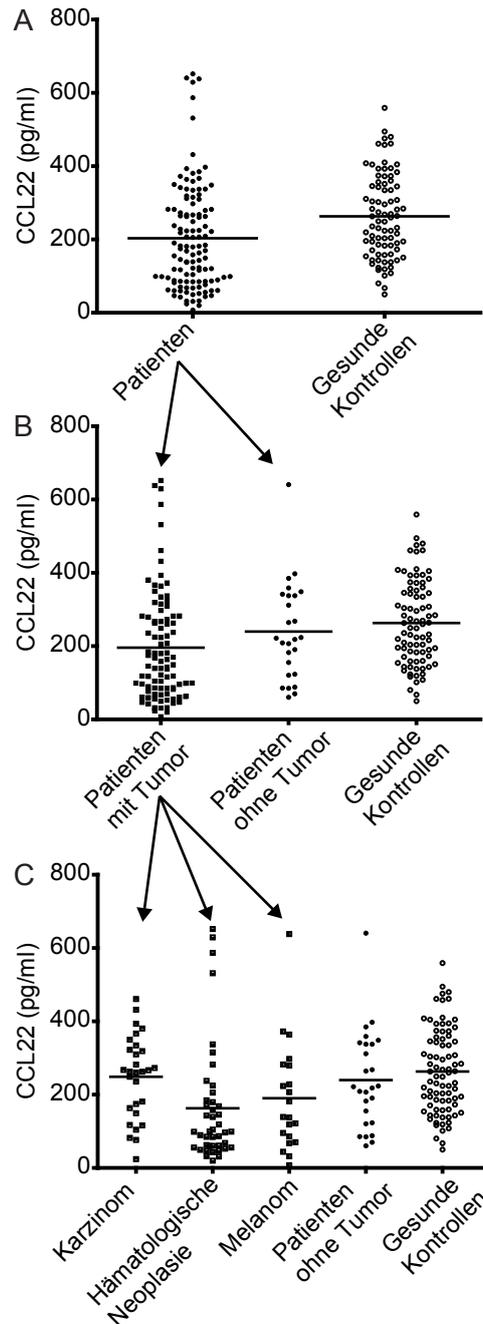


Abbildung 23: CCL22-Konzentration im Serum von Patienten und von gesunden Probanden

Jeder Punkt im Diagramm stellt die CCL22-Konzentration im Serum eines Patienten dar **A** CCL22-Serumkonzentration von Patienten (n=119) und von gesunden Probanden (n=77) **B** CCL22-Serumkonzentration von Patienten mit (n=93) bzw. ohne (n=26) Tumorerkrankung und von gesunden Probanden (n=77) **C** CCL22-Serumkonzentration von Patienten mit Tumorerkrankung unterschiedlicher Entität (Karzinom: n=29; hämatologische Neoplasie: n=43; Melanom: n=21) bzw. von Patienten ohne Tumorerkrankung (n=26) und von gesunden Probanden (n=77)

Die statistische Analyse der CCL22-Serumkonzentrationen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden mit und ohne Tumorerkrankung (Abbildung 23 B). Nach Subdifferenzierung der Patienten in einzelne Gruppen bestimmter Tumorentitäten wiesen Patienten mit Tumorerkrankungen aus dem hämatologischen Bereich im Durchschnitt signifikant niedrigere CCL22-Konzentrationen im Serum auf als die beiden Kontrollgruppen (Patienten ohne Tumor, unpaired t-test: $p = 0,045$; gesunde Probanden, unpaired t-test: $p < 0,0001$; Abbildung 23 C). Tumorpatienten weisen demnach keine erhöhte CCL22-Konzentration im Serum auf.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob Tumorerkrankungen die CCL28-Konzentration im Blut beeinflussen. Dazu wurde die CCL28-Konzentration in humanem Serum per ELISA gemessen und dabei zwischen Patienten mit bzw. ohne Tumorerkrankung und gesunden Probanden unterschieden. Untersucht wurden insgesamt 118 Patienten im Alter von 19 bis 87 Jahren. Davon litten 29 Patienten an einem Karzinom, 42 Patienten an einer hämatologischen Neoplasie und 21 Patienten an einem Melanom. Den Krebspatienten gegenübergestellt wurden zum einen 26 Patienten, die wegen nicht-neoplastischen Erkrankungen in stationärer Behandlung waren, und 73 gesunde Probanden im Alter von 22 bis 69 Jahren.

Die statistische Analyse der CCL28-Serumkonzentrationen ergab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Probanden mit und ohne Tumorerkrankung (Abbildung 24). Allen Gruppen gemeinsam war, dass 30 bis 40% der Probanden eine CCL28-Konzentration über 1.000 ng/ml im Serum (CCL28-positiv) aufwiesen, während die restlichen Probanden kaum per ELISA messbare CCL28-Serumkonzentrationen zeigten (CCL28-negativ). Die untersuchten Tumorpatienten wiesen demnach im Vergleich zu gesunden Probanden keine erhöhte CCL28-Konzentration im peripheren Blut auf.

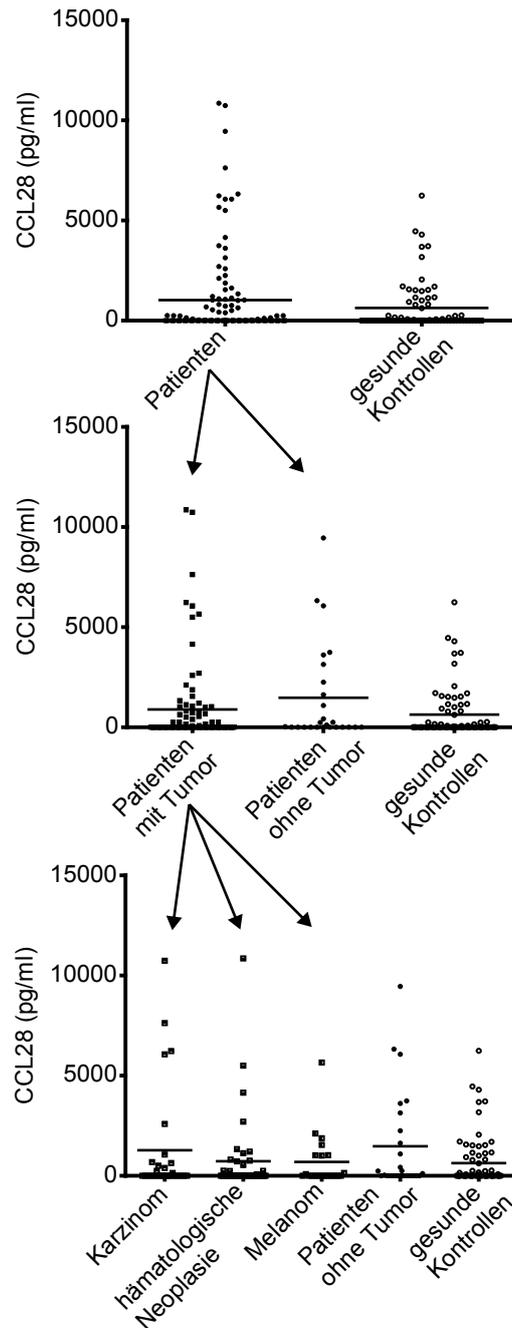


Abbildung 24: CCL28-Konzentration im Serum von Patienten und von gesunden Probanden

Jeder Punkt im Diagramm stellt die CCL28-Konzentration im Serum eines Patienten dar **A** CCL28-Serumkonzentration von Patienten (n=118) und von gesunden Probanden (n=73) **B** CCL28-Serumkonzentration von Patienten mit (n=92) bzw. ohne (n=26) Tumorerkrankung und von gesunden Probanden (n=73) **C** CCL28-Serumkonzentration von Patienten mit Tumorerkrankung unterschiedlicher Entität (Karzinom: n=29; hämatologische Neoplasie: n=42; Melanom: n=21) bzw. von Patienten ohne Tumorerkrankung (n=26) und von gesunden Probanden (n=73)

5 Diskussion

Erhöhte CCL22-Expression im Ovarialkarzinom führt zu einer Anreicherung regulatorischer T-Zellen (Treg) im Tumor und damit zu einer lokalen Unterdrückung der Tumor-spezifischen Immunantwort mit der Folge von beschleunigtem Tumorwachstum und reduziertem Überleben (Curiel et al. 2004). Auch für das Mammakarzinom und viele weitere Tumorentitäten wurde eine CCL22-abhängige Tumordinfiltration durch Treg beschrieben, die mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Gobert et al. 2009, Tabelle 2). Analog dazu wurde auch eine prognoseverschlechternde CCL28-vermittelte Treg-Anreicherung im Ovarialkarzinom beschrieben (Facciabene et al. 2011). Da es sich bei der CCL22- und CCL28-abhängigen Treg-Anreicherung in Tumoren um einen generellen Mechanismus Tumor-vermittelter Immunsuppression handeln könnte, ist es von großer Relevanz, die entsprechenden Chemokin-exprimierenden Zellen im Tumor eindeutig zu identifizieren.

5.1 Mononukleäre Zellen sezernieren lösliche Faktoren, die CCL22 in humanen Tumorzelllinien induzieren

Es wurde bereits gezeigt, dass CCL22 sowohl in Colonepithel als auch in Keratinozyten durch das proinflammatorische Zytokin Interferon- γ induziert wird (Berin et al. 2001, Fujii-Maeda et al. 2004). Auch in Tumorzellen induzieren proinflammatorische Zytokine CCL22. So konnte eine Interferon- γ -abhängige Induktion von CCL22 für das Mammakarzinom nachgewiesen werden (Faget et al. 2011). Außerdem wurde für das Lungenkarzinom eine CCL22-Induktion durch TNF- α beschrieben (Nakanishi et al. 2006). Eine durch Inflammation getriggerte CCL22-Expression im Tumor könnte zur lokalen Anreicherung immunsuppressiver Treg im Tumormilieu beitragen und damit eine erfolgreiche Immunantwort verhindern.

Wir konnten zeigen, dass nur einzelne Tumorzelllinien des Mammakarzinoms konstitutiv CCL22 exprimieren. Außerdem konnten wir erstmals eine konstitutive CCL22-Expression durch die Epidermoid-Karzinom-Zelllinie A-431 nachweisen. Für diese Zelllinien zeigte sich außerdem eine deutliche Interferon- γ -abhängige CCL22-Induktion. Alle anderen untersuchten Tumorentitäten exprimierten weder konstitutiv noch durch Interferon- γ induzierbar CCL22. Zellfreie Überstände von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) konnten hingegen auch in Tumorzellen CCL22 induzieren, die keine Interferon- γ -vermittelte CCL22-Induktion zeigten. Unsere Daten legen damit nahe, dass CCL22 durch Tumorzellen exprimiert werden kann und dass neben Interferon- γ noch weitere von Immunzellen sezernierte Faktoren für die CCL22-Expression in Tumorzellen verantwortlich sind.

Für das Mammakarzinom konnten solche Faktoren schon identifiziert werden. Von Monozyten produziertes IL-1 β und TNF- α in Kombination mit von NK-Zellen sezerniertem Interferon- γ induzieren CCL22 in Tumorzelllinien des Mammakarzinoms (Faget et al. 2011). CCL22-Expression ist im Tumormilieu jedoch nicht auf Tumorzellen beschränkt. Es wurde gezeigt, dass von Tumorzellen sezerniertes IL-1 α zu CCL22-Induktion in dendritischen Zellen führt (Wiedemann et al. 2016). Proinflammatorische Zytokine lösen damit eine CCL22-Induktion sowohl in Tumorzellen als auch in Immunzellen aus. Dies könnte einen Mechanismus des Tumors darstellen, einer initialen Immunantwort mit Immunsuppression entgegenzuwirken und damit sein Überleben zu sichern.

Wir konnten somit ergänzend zu den Daten von Faget et al. und Wiedemann et al. zeigen, dass eine CCL22-Induktion in Tumorzellen durch von Immunzellen sezernierte lösliche Faktoren in mehreren Tumorentitäten besteht. Jedoch ist eine ausschließlich durch Interferon- γ induzierte CCL22-Expression auf einzelne Tumorzelllinien vor allem des Mammakarzinoms beschränkt. Es

gilt daher, in Zukunft die löslichen Faktoren zu identifizieren, die CCL22 in Tumorzellen anderer Entitäten induzieren.

5.2 CCL22 wird im humanen Mammakarzinom von Monozyten oder unpolarisierten Makrophagen exprimiert

Bei seiner Entdeckung wurde CCL22 als Chemokin beschrieben, das von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird (Godiska et al. 1997). Weitere Quellen nennen vor allem dendritische Zellen als den *in vitro* und *in vivo* CCL22-exprimierenden Zelltyp (Vulcano et al. 2001). Es liegen jedoch auch Daten vor, die CCL22-Expression durch aktivierte B-Zellen (Schaniel et al. 1998) oder durch T-Helferzellen (Iellem et al. 2000) zeigen. Im Tumormilieu hingegen waren CCL22-exprimierende Zellen bisher unzureichend beschrieben.

Wir konnten durch immunhistologische Untersuchungen zeigen, dass *in vivo* im Tumorgewebe des Mammakarzinoms die Mehrzahl der CCL22-exprimierenden Zellen im Tumor-umgebenden Stroma vorliegen und nicht Tumorzellen, sondern Immunzellen sind. Wir haben deren Immunphänotyp erstmals als CD45+CD14+CD68+ beschrieben und durch weitere Untersuchungen ausgeschlossen, dass es sich um dendritische Zellen oder polarisierte Makrophagen handelt. Die untersuchten Gewebeproben des medullären, invasiv-ductalen und invasiv-lobulären Mammakarzinoms ergaben übereinstimmend den oben beschriebenen Phänotyp. Somit konnten wir CCL22-exprimierende Zellen im Tumorstroma des Mammakarzinoms erstmals als Monozyten und unpolarisierte Makrophagen identifizieren.

Unsere Daten ergänzen damit Vorbefunde, in denen gezeigt wurde, dass im Mammakarzinom CCL22-Expression neben vereinzelt Tumorzellen vor allem durch myeloide Tumor-infiltrierende Zellen stattfindet (Anz et al.

2011). Im Tumor-assoziierten Aszites von Patienten mit Ovarialkarzinom konnten bereits CCL22-exprimierende Makrophagen identifiziert werden (Curiel et al. 2004). Diese wurden jedoch weder näher beschrieben noch im eigentlichen Tumorgewebe oder Tumor-umgebenden Stroma nachgewiesen. Im Mammakarzinom wurde CCL22-Expression durch Tumorzellen und Tumor-infiltrierende Immunzellen gezeigt, jedoch auch hier ohne genauere Immunphänotypisierung (Gobert et al. 2009).

Wir konnten aus unseren erbrachten Daten erstmals schlussfolgern, dass Monozyten oder unpolarisierte Makrophagen im Tumor-umgebenden Stroma die hauptsächliche Quelle des im Mammakarzinom erhöhten und mit einer schlechten Prognose verbundenen Chemokins CCL22 darstellen. Diese Erkenntnis leistete einen Beitrag zum Verständnis der von Curiel et al. 2004 erstmals beschriebenen CCL22-vermittelten Immunsuppression im Tumormilieu. Ferner konnten wir in Vorarbeiten am Mausmodell zeigen, dass eine Suppression von intratumoralem CCL22 durch Typ I Interferon das Tumorwachstum reduziert (Anz et al. 2015). CCL22-exprimierende Zellen stellen damit ein mögliches Ziel einer neuartigen Tumormimmuntherapie in Form einer spezifischen Depletion dieser Zellen dar. Unsere immunphänotypische Identifikation CCL22-exprimierender Zellen im Tumor könnte in dieser Hinsicht ein erster Schritt auf dem Weg zu neuen immuntherapeutischen Behandlungsoptionen in der Onkologie sein. Dafür müssten in Zukunft noch spezifischere Marker dieser CCL22-exprimierenden Tumor-assoziierten Zellen identifiziert werden.

5.3 CCL28 wird im humanen Mammakarzinom von Tumorzellen und M2-Makrophagen exprimiert

CCL28 ist vor allem als Chemokin bekannt, das von Mukosa-assoziierten Epithelien verschiedener Organe exprimiert wird. In Colonepithelzellen und in Cholangiozyten wird CCL28 durch proinflammatorische Stimuli induziert. Dabei trägt CCL28 über spezifische Treg-Anreicherung zur lokalen Immunhomöostase bei (Ogawa et al. 2004, Eksteen et al. 2006).

Wir konnten erstmals zeigen, dass CCL28 im Mammakarzinom exprimiert wird. In allen von n = 33 Mammakarzinom-Patienten untersuchten Gewebeproben konnten wir immunhistologisch CCL28-Expression durch myeloide Zellen im Tumor-umgebenden Stroma nachweisen. Dazu konnte in etwa zwei Dritteln der Proben auch CCL28-Expression durch Tumorzellen beschrieben werden. Bei der CCL28-Expression durch Tumorzellen zeigte sich ein Trend in Richtung höherer T-Stadien, der jedoch nicht signifikant war. CCL28-exprimierende nicht-maligne Zellen im Mammakarzinom konnten von uns erstmals immunphänotypisch als CD45+CD14+CD68+CD206+ charakterisiert werden. Wir konnten damit erstmals nachweisen, dass neben Tumorzellen auch Tumor-infiltrierende Leukozyten CCL28 exprimieren und diese Monozyten und M2-Makrophagen entsprechen.

CCL28-Expression in Tumoren war bisher nur für das Ovarialkarzinom beschrieben. Lokale Hypoxie induziert hier in Tumorzellen CCL28, was zu spezifischer Treg-Anreicherung im Tumormilieu und damit zu einer Unterdrückung der Immunantwort und reduziertem Überleben führt (Facciabene et al. 2011).

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Tumor-assoziierte CCL28-Expression in mehreren Tumorentitäten vorhanden ist und damit womöglich einen generellen Mechanismus Tumor-induzierter Immunsuppression darstellt. Da CCL28-Expression im Ovarialkarzinom schon als Risikofaktor für ein verkürztes Überleben beschrieben wurde (Facciabene et al. 2011), könnte CCL28 den Angriffspunkt einer neuartigen Tumormimmuntherapie bieten. In Zukunft sollten daher noch weitere Tumorentitäten auf mögliche CCL28-Expression untersucht werden.

5.4 CD68+ Makrophagen im Tumorstroma sind mit schlechter Prognose assoziiert

Wir konnten nachweisen, dass sowohl CCL22- als auch CCL28-positive Zellen im Tumorstroma des Mammakarzinoms den Makrophagen-Zellmarker CD68 exprimieren. Interessanterweise sind CD68-positive Makrophagen im Tumorstroma des Mammakarzinoms als negativer prognostischer Faktor beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl CD68-positiver Zellen im Mammakarzinom positiv mit Tumorgröße und Tumorgrad, und negativ mit dem prognostisch günstigen molekularen Subtyp Luminal A korreliert. Außerdem ist die Zahl CD68-positiver Zellen im Tumormilieu ein unabhängiger Risikofaktor für reduziertes krankheitsspezifisches Überleben bei Mammakarzinom (Medrek et al. 2012, Mahmoud et al. 2012). Auch in vielen weiteren Tumorentitäten sind CD68-positive Zellen mit einer negativen Prognose assoziiert (Ni et al. 2015, Gollapudi et al. 2013, Pantano et al. 2013, Zhou et al. 2009). Unser Nachweis, dass Tumor-assoziierte CD68-positive Zellen zwei verschiedene Chemokine produzieren, die beide zu einer Treg-Anreicherung im Tumor führen, lässt daher vermuten, dass dieser Mechanismus zur Verschlechterung der Prognose beiträgt.

6 Zusammenfassung

Der Fortschritt der Tumorimmuntherapie hängt von unserem Verständnis der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem ab. Durch die Beschreibung Tumor-vermittelter Mechanismen der Immunsuppression lassen sich potentielle neuartige therapeutische Angriffspunkte finden, von denen Patienten in Zukunft profitieren könnten. Es ist bekannt, dass sich regulatorische T-Zellen (Treg) durch Chemokine vermittelt im Tumormilieu anreichern. Durch ihren immunsuppressiven Einfluss verhindern sie eine effiziente Tumor-spezifische Immunantwort und fördern das Tumorwachstum, was in einer ungünstigeren Prognose resultiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen der Expression der Treg-rekrutierenden Chemokine CCL22 und CCL28 im humanen Mammakarzinom zu untersuchen. Wir konnten in *in vitro* Experimenten zeigen, dass nur wenige Tumorzelllinien konstitutiv CCL22 exprimieren. Immunzellen sezernieren jedoch lösliche Faktoren wie Interferon- γ , die CCL22 in Tumorzellen induzieren. *In vivo* konnten wir im humanen Mammakarzinom CCL22-Expression sowohl in Tumorzellen als auch in Immunzellen des Tumor-umgebenden Stromas nachweisen. CCL22-exprimierende Zellen im Tumorstroma konnten als CD45+CD14+CD68+ Monozyten oder unpolarisierte Makrophagen identifiziert werden. Für CCL28 konnten wir erstmals im Mammakarzinom eine Expression durch Tumorzellen sowie Immunzellen nachweisen. CCL28-exprimierende Zellen im Stroma konnten als CD45+CD14+CD68+CD206+ Monozyten oder M2-Makrophagen identifiziert werden. Außerdem haben wir gezeigt, dass CCL22 im peripheren Blut durch aktivierte Monozyten produziert wird. Durch Tumoren sezerniertes CCL22 und CCL28 spiegelt sich jedoch nicht in systemisch erhöhten Chemokinspiegeln wider, da Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden keine erhöhten CCL22- oder CCL28-Konzentrationen im peripheren Blut aufwiesen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Treg-rekrutierenden Chemokine CCL22 und CCL28 zu einem großen Anteil von spezialisierten Monozyten und Makrophagen im Tumorstroma produziert werden. Die nun vorliegende Charakterisierung dieser Zellen bietet Angriffspunkte für zielgerichtete Tumormimmuntherapien, deren Machbarkeit und Effizienz weiter evaluiert werden muss.

7 Literaturverzeichnis

- Anz, D., Eiber, S., Scholz, C., Endres, S., Kirchner, T., Bourquin, C., et al.** (2011). In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8+ to FoxP3+ cells is characteristic for the medullary subtype. *Histopathology*, 59(5), 965-974.
- Anz, D., Rapp, M., Eiber, S., Koelzer, V. H., Thaler, R., Haubner, S., et al.** (2015). Suppression of Intratumoral CCL22 by Type I Interferon Inhibits Migration of Regulatory T Cells and Blocks Cancer Progression. *Cancer Res*, 75(21), 4483-4493.
- Atkins, M. B., & Larkin, J.** (2016). Immunotherapy Combined or Sequenced With Targeted Therapy in the Treatment of Solid Tumors: Current Perspectives. *J Natl Cancer Inst*, 108(6).
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay Nel, H., et al.** (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*, 12(2), 465-472.
- Bailur, J. K., Gueckel, B., Derhovanessian, E., & Pawelec, G.** (2015). Presence of circulating Her2-reactive CD8 + T-cells is associated with lower frequencies of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells, and better survival in older breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 17, 34.
- Baitsch, L., Fuertes-Marraco, S. A., Legat, A., Meyer, C., & Speiser, D. E.** (2012). The three main stumbling blocks for anticancer T cells. *Trends Immunol*, 33(7), 364-372.
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., et al.** (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, 24(34), 5373-5380.
- Benevides, L., Cardoso, C. R., Tiezzi, D. G., Marana, H. R., Andrade, J. M., & Silva, J. S.** (2013). Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur J Immunol*, 43(6), 1518-1528.

- Bergmann, C., Strauss, L., Wieckowski, E., Czystowska, M., Albers, A., Wang, Y., et al.** (2009). Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression. *Head Neck*, 31(3), 371-380.
- Berin, M. C., Dwinell, M. B., Eckmann, L., & Kagnoff, M. F.** (2001). Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280(6), G1217-1226.
- Bischoff, L., Alvarez, S., Dai, D. L., Soukhatcheva, G., Orban, P. C., Verchere, C. B.** (2015). Cellular mechanisms of CCL22-mediated attenuation of autoimmune diabetes. *J Immunol*, 194(7), 3054 - 3064.
- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., & Van Pel, A.** (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 12, 337-365.
- Bufler, P., Stiegler, G., Schuchmann, M., Hess, S., Kruger, C., Stelter, F., et al.** (1995). Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol*, 25(2), 604-610.
- Burnet, F. M.** (1967). Immunological aspects of malignant disease. *Lancet*, 289(7501), 1171-1174.
- Campbell, D. J.** (2015). Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *J Immunol*, 195(6), 2507-2513.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B. C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., et al.** (2006). High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 108(9), 2957-2964.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., et al.** (2009). High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 27(9), 1470-1476.
- Chang, C., Wu, S. Y., Kang, Y. W., Lin, K. P., Chen, T. Y., Medeiros, L. J., et al.** (2015). High Levels of Regulatory T Cells in Blood Are a Poor Prognostic Factor in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 144(6), 935-944.

- Chantry, D., Romagnani, P., Raport, C. J., Wood, C. L., Epp, A., Romagnani, S., et al.** (1999). Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood*, 94(6), 1890-1898.
- Coley, W. B.** (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. *Am J Med Sci*, 105(5), 487-510.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., et al.** (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9), 942-949.
- Danilova, E., Skrindo, I., Gran, E., Hales, B. J., Smith, W. A., Jahnsen, J., et al.** (2015). A role for CCL28-CCR3 in T-cell homing to the human upper airway mucosa. *Mucosal Immunol*, 8(1), 107-114.
- de Jong, R. A., Leffers, N., Boezen, H. M., ten Hoor, K. A., van der Zee, A. G., Hollema, H., et al.** (2009). Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 114(1), 105-110.
- de Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Ait-Yahia, S., et al.** (1998). A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity*, 9(3), 325-336.
- De Visser, K. E., Schumacher, T. N., & Kruisbeek, A. M.** (2003). CD8+ T cell tolerance and cancer immunotherapy. *J Immunother*, 26(1), 1-11.
- Demir, L., Yigit, S., Ellidokuz, H., Erten, C., Somali, I., Kucukzeybek, Y., et al.** (2013). Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs. *Clin Exp Metastasis*, 30(8), 1047-1062.
- Deng, L., Zhang, H., Luan, Y., Zhang, J., Xing, Q., Dong, S., et al.** (2010). Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 16(16), 4105-4112.
- Eksteen, B., Miles, A., Curbishley, S. M., Tselepis, C., Grant, A. J., Walker, L. S., et al.** (2006). Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10. *J Immunol*, 177(1), 593-603.

- Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I. S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L. P., et al.** (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*, 475(7355), 226-230.
- Faget, J., Biota, C., Bachelot, T., Gobert, M., Treilleux, I., Goutagny, N., et al.** (2011). Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res*, 71(19), 6143-6152.
- Fernandez, E. J., & Lolis, E.** (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 469-499.
- Frey, D. M., Droeser, R. A., Viehl, C. T., Zlobec, I., Lugli, A., Zingg, U., et al.** (2010). High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer*, 126(11), 2635-2643.
- Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., et al.** (2007). Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*, 132(7), 2328-2339.
- Fujii-Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Shinazawa, M., Yu, B., Koga, T., et al.** (2004). Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J Invest Dermatol*, 122(1), 20-28.
- Galli, G., Chantry, D., Annunziato, F., Romagnani, P., Cosmi, L., Lazzeri, E., et al.** (2000). Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol*, 30(1), 204-210.
- Gantt, S., Gervassi, A., Jaspan, H., & Horton, H.** (2014). The role of myeloid-derived suppressor cells in immune ontogeny. *Front Immunol*, 5, 387.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., et al.** (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100(5), 575-585.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., et al.** (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*, 69(5), 2000-2009.

- Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., & Russell, L. B.** (1991). X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol*, 138(6), 1379-1387.
- Godiska, R., Chantry, D., Raport, C. J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., et al.** (1997). Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*, 185(9), 1595-1604.
- Gollapudi, K., Galet, C., Grogan, T., Zhang, H., Said, J. W., Huang, J., et al.** (2013). Association between tumor-associated macrophage infiltration, high grade prostate cancer, and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Am J Cancer Res*, 3(5), 523-529.
- Gottfried, E., Kunz-Schughart, L. A., Weber, A., Rehli, M., Peuker, A., Muller, A., et al.** (2008). Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol*, 67(5), 453-463.
- Han, S., Zhang, C., Li, Q., Dong, J., Liu, Y., Huang, Y., et al.** (2014). Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*, 110(10), 2560-2568.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harimoto, H., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Nakatsuka, K., Wakabayashi, A., Sakamoto, C., et al.** (2013). Inactivation of tumor-specific CD8(+) CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 91(9), 545-555.
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., & Goyert, S. M.** (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol*, 141(2), 547-552.
- Hieshima, K., Ohtani, H., Shibano, M., Izawa, D., Nakayama, T., Kawasaki, Y., et al.** (2003). CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol*, 170(3), 1452-1461.
- Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., & Hirohashi, S.** (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*, 12(18), 5423-5434.

- Horn, T., Laus, J., Seitz, A. K., Maurer, T., Schmid, S. C., Wolf, P., et al.** (2015). The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. *World J Urol*.
- Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., et al.** (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*, 6(19), 17462-17478.
- Iellem, A., Colantonio, L., Bhakta, S., Sozzani, S., Mantovani, A., Sinigaglia, F., et al.** (2000). Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol*, 30(4), 1030-1039.
- Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., et al.** (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, 194(6), 847-853.
- Igney, F. H., & Krammer, P. H.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 277-288.
- Kaporis, H. G., Guttman-Yassky, E., Lowes, M. A., Haider, A. S., Fuentes-Duculan, J., Darabi, K., et al.** (2007). Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3+ T cells in a Th2 dominant microenvironment. *J Invest Dermatol*, 127(10), 2391-2398.
- Kim, W. Y., Jeon, Y. K., Kim, T. M., Kim, J. E., Kim, Y. A., Lee, S. H., et al.** (2009). Increased quantity of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells is an independent predictor for improved clinical outcome in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Ann Oncol*, 20(10), 1688-1696.
- Knutson, K. L., Maurer, M. J., Preston, C. C., Moysich, K. B., Goergen, K., Hawthorne, K. M., et al.** (2015). Regulatory T cells, inherited variation, and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 64(12), 1495-1504.
- Lee, S., Cho, E. Y., Park, Y. H., Ahn, J. S., & Im, Y. H.** (2013). Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer. *Acta Oncol*, 52(1), 73-81.
- Li, Y. Q., Liu, F. F., Zhang, X. M., Guo, X. J., Ren, M. J., & Fu, L.** (2013). Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PLoS One*, 8(10), e76379.

- Liu, F., Li, Y., Ren, M., Zhang, X., Guo, X., Lang, R., et al.** (2012). Peritumoral FOXP3(+) regulatory T cell is sensitive to chemotherapy while intratumoral FOXP3(+) regulatory T cell is prognostic predictor of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 135(2), 459-467.
- Liu, S., Foulkes, W. D., Leung, S., Gao, D., Lau, S., Kos, Z., et al.** (2014). Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res*, 16(5), 432.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., et al.** (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*, 169(5), 2756-2761.
- Lv, M., Xu, Y., Tang, R., Ren, J., Shen, S., Chen, Y., et al.** (2014). miR141-CXCL1-CXCR2 signaling-induced Treg recruitment regulates metastases and survival of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 13(12), 3152-3162.
- Maeda, N., Yoshimura, K., Yamamoto, S., Kuramasu, A., Inoue, M., Suzuki, N., et al.** (2014). Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*, 21 Suppl 4, S546-554.
- Maggio, E. M., Van Den Berg, A., Visser, L., Diepstra, A., Kluiver, J., Emmens, R., et al.** (2002). Common and differential chemokine expression patterns in rs cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. *Int J Cancer*, 99(5), 665-672.
- Mahmoud, S. M., Lee, A. H., Paish, E. C., Macmillan, R. D., Ellis, I. O., & Green, A. R.** (2012). Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol*, 65(2), 159-163.
- Maniecki, M. B., Moller, H. J., Moestrup, S. K., & Moller, B. K.** (2006). CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology*, 211(6-8), 407-417.
- Mantovani, A., Gray, P. A., Van Damme, J., & Sozzani, S.** (2000). Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol*, 68(3), 400-404.

- Mantovani, A., Sica, A.** (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*, 22(2), 231 - 237.
- Martinez, F. O., & Gordon, S.** (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13.
- Maruyama, T., Kono, K., Izawa, S., Mizukami, Y., Kawaguchi, Y., Mimura, K., et al.** (2010). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*, 23(5), 422-429.
- McCoy, M. J., Hemmings, C., Miller, T. J., Austin, S. J., Bulsara, M. K., Zeps, N., et al.** (2015). Low stromal Foxp3 regulatory T-cell density is associated with complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer*.
- Medrek, C., Ponten, F., Jirstrom, K., & Leandersson, K.** (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, 12, 306.
- Miller, A. M., Lundberg, K., Ozenci, V., Banham, A. H., Hellstrom, M., Egevad, L., et al.** (2006). CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol*, 177(10), 7398-7405.
- Mills, C. D.** (2015). Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol*, 6, 212.
- Mizukami, Y., Kono, K., Kawaguchi, Y., Akaike, H., Kamimura, K., Sugai, H., et al.** (2008). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer*, 122(10), 2286-2293.
- Murphy, K.** (2011). *Janeway's Immunobiology* (Vol. 8).
- Nakanishi, T., Imaizumi, K., Hasegawa, Y., Kawabe, T., Hashimoto, N., Okamoto, M., et al.** (2006). Expression of macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 in human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 55(11), 1320-1329.
- Ni, Y. H., Ding, L., Huang, X. F., Dong, Y. C., Hu, Q. G., & Hou, Y. Y.** (2015). Microlocalization of CD68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Tumour Biol*, 36(7), 5291-5298.

- Ogawa, H., Imura, M., Eckmann, L., & Kagnoff, M. F.** (2004). Regulated production of the chemokine CCL28 in human colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(5), G1062-1069.
- Pan, J., Kunkel, E. J., Gossler, U., Lazarus, N., Langdon, P., Broadwell, K., et al.** (2000). A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol*, 165(6), 2943-2949.
- Pantano, F., Berti, P., Guida, F. M., Perrone, G., Vincenzi, B., Amato, M. M., et al.** (2013). The role of macrophages polarization in predicting prognosis of radically resected gastric cancer patients. *J Cell Mol Med*, 17(11), 1415-1421.
- Penna, G., Vulcano, M., Roncari, A., Facchetti, F., Sozzani, S., & Adorini, L.** (2002). Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 169(12), 6673-6676.
- Perrone, G., Ruffini, P. A., Catalano, V., Spino, C., Santini, D., Muretto, P., et al.** (2008). Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer*, 44(13), 1875-1882.
- Petersen, R. P., Campa, M. J., Sperlazza, J., Conlon, D., Joshi, M. B., Harpole, D. H., Jr., et al.** (2006). Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*, 107(12), 2866-2872.
- Powell, B. R., Buist, N. R., & Stenzel, P.** (1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr*, 100(5), 731-737.
- Qin, X. J., Shi, H. Z., Deng, J. M., Liang, Q. L., Jiang, J., & Ye, Z. J.** (2009). CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion. *Clin Cancer Res*, 15(7), 2231-2237.
- Rasmussen, T., Dahl, I. M., Jensen, L., & Johnsen, H. E.** (2000). CD68+/CD83+/CD1a- dendritic cell subsets from patients with multiple myeloma are not infected with human herpesvirus 8. *Med Oncol*, 17(3), 189-194.
- Saito, N., Pulford, K. A., Breton-Gorius, J., Masse, J. M., Mason, D. Y., & Cramer, E. M.** (1991). Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am J Pathol*, 139(5), 1053-1059.

- Sakaguchi, S.** (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 6(4), 345-352.
- Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., et al.** (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27(2), 186-192.
- Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., & Takabayashi, A.** (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*, 98(5), 1089-1099.
- Sasaki, A., Tanaka, F., Mimori, K., Inoue, H., Kai, S., Shibata, K., et al.** (2008). Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 34(2), 173-179.
- Sather, B. D., Treuting, P., Perdue, N., Miazgowicz, M., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., et al.** (2007). Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med*, 204(6), 1335-1347.
- Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., et al.** (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(51), 18538-18543.
- Schaniel, C., Pardali, E., Sallusto, F., Speletas, M., Ruedl, C., Shimizu, T., et al.** (1998). Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J Exp Med*, 188(3), 451-463.
- Shih, C., & Weinberg, R. A.** (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell*, 29(1), 161-169.
- Shin, D.S., Ribas, A.** (2015). The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr Opin Immunol*, 33, 23-35.
- Shive, C. L., Jiang, W., Anthony, D. D., & Lederman, M. M.** (2015). Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS*, 29(10), 1263-1265.
- Spary, L. K., Salimu, J., Webber, J. P., Clayton, A., Mason, M. D., & Tabi, Z.** (2014). Tumor stroma-derived factors skew monocyte to dendritic cell differentiation toward a suppressive CD14 PD-L1 phenotype in prostate cancer. *Oncoimmunology*, 3(9), e955331.

- Strauss, L., Bergmann, C., & Whiteside, T. L.** (2009). Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, 182(3), 1469-1480.
- Tang, H. L., & Cyster, J. G.** (1999). Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*, 284(5415), 819-822.
- Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., et al.** (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 73(2), 539-549.
- Thomas, A. A., Fisher, J. L., Rahme, G. J., Hampton, T. H., Baron, U., Olek, S., et al.** (2015). Regulatory T cells are not a strong predictor of survival for patients with glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17(6), 801-809.
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M.** (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188(2), 287-296.
- Tokuno, K., Hazama, S., Yoshino, S., Yoshida, S., & Oka, M.** (2009). Increased prevalence of regulatory T-cells in the peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer. *Anticancer Res*, 29(5), 1527-1532.
- Trowbridge, I. S., & Thomas, M. L.** (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*, 12, 85-116.
- Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S. A., & Dirnhofer, S.** (2008). Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3⁺ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 93(2), 193-200.
- Vacchelli, E., Semeraro, M., Enot, D. P., Chaba, K., Poirier Colame, V., Dartigues, P., et al.** (2015). Negative prognostic impact of regulatory T cell infiltration in surgically resected esophageal cancer post-radiochemotherapy. *Oncotarget*, 6(25), 20840-20850.
- Vulcano, M., Albanesi, C., Stoppacciaro, A., Bagnati, R., D'Amico, G., Struyf, S., et al.** (2001). Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol*, 31(3), 812-822.

- Wang, W., Soto, H., Oldham, E. R., Buchanan, M. E., Homey, B., Catron, D., et al.** (2000). Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem*, 275(29), 22313-22323.
- West, N. R., Kost, S. E., Martin, S. D., Milne, K., Deleeuw, R. J., Nelson, B. H., et al.** (2013). Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer*, 108(1), 155-162.
- Whiteside, T. L.** (2006). Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*, 16(1), 3-15.
- Wiedemann, G. M., Knott, M. M., Vetter, V. K., Rapp, M., Haubner, S., Fessler, J., et al.** (2016). Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology*, 5(9), e1175794.
- Wolf, D., Wolf, A. M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A. G., Muller-Holzner, E., et al.** (2005). The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11(23), 8326-8331.
- Yan, M., Jene, N., Byrne, D., Millar, E. K., O'Toole, S. A., McNeil, C. M., et al.** (2011). Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. *Breast Cancer Res*, 13(2), R47.
- Yang, Z. Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E., & Ansell, S. M.** (2006). Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107(9), 3639-3646.
- Yuan, Q., Bromley, S. K., Means, T. K., Jones, K. J., Hayashi, F., Bhan, A. K., et al.** (2007). CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med*, 204(6), 1327-1334.
- Zhou, J., Ding, T., Pan, W., Zhu, L. Y., Li, L., & Zheng, L.** (2009). Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer*, 125(7), 1640-1648.

8 Abkürzungsverzeichnis

A

APC Antigen-presenting cell

B

BCL-2 B-cell lymphoma 2

C

CCL C-C motif ligand

CCR C-C motif chemokine receptor

CD Cluster of differentiation

CRP C-reactive protein

CTLA-4 Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

D

DAB 3,3'-diaminobenzidine

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

DC-SIGN Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

DC-LAMP Dendritic cell-lysosomal associated membrane protein

DLBCL Diffuse large B-cell lymphoma

DMEM Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Deoxyribonucleic acid

E

EDTA Ethylendiamintetraacetat

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

ER	Estrogen receptor
F	
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxP3	Forkhead box P3
FSC	Forward scatter
H	
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIF	Hypoxia-inducible factor
I	
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
iR	Inhibitory receptor
L	
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LPS	Lipopolysaccharide
M	
MDC	Macrophage-derived chemokine
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MEC	Mucosae-associated epithelial

	chemokine
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
N	
NK	Natural killer
NSCLC	Non-small cell lung cancer
P	
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyde
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMA	Phorbol myristate acetate
PR	Progesterone receptor
R	
RRX	Rhodamine Red-X
S	
SEM	Standard error of the mean
SSC	Sideward scatter
T	
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th	T helper
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

TNM	Tumor, Nodus, Metastase
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris-aminomethan
V	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLE-RPMI	Very Low Endotoxin Roswell Park Memorial Institute

9 Publikationen

Originalartikel

1. Anz D, Kruger S, **Haubner S**, Rapp M, Bourquin C, Endres S.
The DPP-IV inhibitors sitagliptin, vildagliptin and saxagliptin do not impair innate and adaptive immune responses.
Diabetes, Obesity and Metabolism 2014; 16(6):569-72
2. Anz D, Rapp M, Eiber S, Koelzer VH, Raffael T, **Haubner S**, Knott MM, Nagel S, Golic M, Wiedemann GM, Bauernfeind F, Wurzenberger C, Hornung V, Scholz C, Mayr Doris, Rothenfusser S, Endres S, Bourquin C.
Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression.
Cancer Research 2015; 75(21):4483-93
3. Wiedemann GM, Knott MM, Vetter VK, Rapp M, **Haubner S**, Fessler J, Kühnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D.
Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells.
OncoImmunology 2016; 5(9):e1175794
4. Anz D, Wiedemann G, Knott M, Vetter V, Rapp M, **Haubner S**, Fessler J, Endres S.
IL-1 Sekretion durch Tumorzellen induziert CCL22 und vermittelt die Migration von regulatorischen T-Zellen im Hepatozellulären Karzinom.
Zeitschrift für Gastroenterologie 2016; 54 - KV296
5. Rapp M, Wintergerst MW, Kunz WG, Lisowski D, **Haubner S**, Moder S, Eiber S, Raffael T, Knott M, Layritz P, Stutte S, von Andrian U, Bourquin C, Endres S, Anz D.
Constitutive expression of CCL22 maintains immune homeostasis by recruiting regulatory T cells to dendritic cells.
Manuskript in Vorbereitung, 2016.
6. **Haubner S**, Endres S, Anz D.
In breast cancer, CCL28 expression is mediated by tumor stromal M2 macrophages and correlated with high tumor stage.
Manuskript in Vorbereitung, 2016.

Vorträge1. **Haubner S.**

Tumor-infiltrating macrophages are the main source of regulatory T cell-attracting chemokines.

7. Jahrestreffen des Graduiertenkollegs 1202, Kloster Frauenchiemsee, Deutschland, 2012.

Posterpräsentationen1. **Haubner S, Kruger S, Rapp M, Endres S, Anz D.**

Serum levels of regulatory T cell-attracting chemokines in cancer patients.

World Immune Regulation Meeting, Davos, Schweiz, 2012.

2. **Rapp M, Haubner S, Nagel S, Wiedemann GM, Mayr D, Eiber S, Rothenfusser S, Bourquin C, Endres S, Anz D.**

CCL22 in murine and human tumors is derived from tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells.

China Tregs 2012 Conference, Shanghai, China, 2012.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres, der mir unter besten Bedingungen den Einstieg in die Tumormunologie ermöglicht hat und mich zu jeder Zeit insbesondere auch über wissenschaftliche Fragen hinaus als Mentor gefördert hat.

Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei PD Dr. David Anz, der mir als Arbeitsgruppenleiter dieses herausfordernde Projekt anvertraut hat und mich mit unermüdlichem Elan in jeder Hinsicht bei meiner Dissertation unterstützt hat.

Bei der gesamten Abteilung für Klinische Pharmakologie und insbesondere bei Dr. Moritz Rapp, Wolfgang Kunz und Dr. Gabriela Wiedemann bedanke ich mich für die Hilfe bei der Einarbeitung und die vielen wertvollen Ratschläge bei den Laborbesprechungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und bei meinen Freunden für ihre große Geduld und persönliche Unterstützung bei meiner Dissertation bedanken.

11 Lebenslauf

Name: Sascha Paul Haubner
 Geburtsdatum/-ort: 05.03.1989 in Nürnberg
 Nationalität: Deutsch

Schulbildung und Hochschulstudium

06.2008 Allgemeine Hochschulreife,
 Ostendorfer-Gymnasium Neumarkt i.d.OPf.
 10.2008 bis 09.2015 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität
 München
 11.2015 Ärztliche Prüfung und Approbation
 03.2016 ECFMG-Certification:
 United States Medical Licensing Examination (USMLE)

Klinische Ausbildung

2012 bis 2014 **Famulaturen**
 Anästhesiologie: Chirurgische Klinik Dr. Rinecker,
 München
 Gastroenterologie: Addenbrooke's Hospital, University of
 Cambridge, UK
 Klinische Pharmakologie: Medizinische Klinik und
 Poliklinik IV, Klinikum der Universität München
 Hämato-Onkologie: Hadassah Medical Center, Jerusalem,
 Israel und Dr.-von-Hauner'sches Kinderspital,
 Klinikum der Universität München
 2014 bis 2015 **Praktisches Jahr**
 Chirurgie: Viszeralchirurgie und Notaufnahme an der
 Université Pierre et Marie Curie, Paris, Frankreich
 Innere Medizin: Hämato-Onkologie und Notaufnahme an
 der University of Alberta, Edmonton, Kanada;
 Hämato-Onkologie und Notaufnahme am Weill
 Cornell Medical College, New York City, US
 Neurologie: Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum
 der Universität München
 Seit 04.2016 **Assistenzarzt** in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
 am Klinikum der Universität München

Promotion

2011 bis 2016 Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie,
 Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der
 Universität München

Stipendien

2014 bis 2015 Stipendiat des LMU MeCuM Studierende Exzellenz
 Programms (StEP)
 2011 bis 2012 Promotionsstipendium im Rahmen des von der DFG
 geförderten Graduiertenkollegs 1202