

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Roden
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie
Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Analyse von CD56-positiven Monozyten im peripheren Blut und Gewebe von Tumorpatienten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anna Maria Baran

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Roland Fenk

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Papewalis C., Jacobs B., Baran A.M., Ehlers M., Stoecklein N.H., Willenberg H.S., Schinner S., Anlauf M., Raffel A., Cupisti K., Fenk R., Scherbaum W.A., Schott M.: Increased numbers of tumor-lysing monocytes in cancer patients. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2011)

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
°C	Grad Celsius
⁵¹ Cr	⁵¹ Chrom
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CUP	<i>Cancer of unknown primary</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
cpm	<i>Counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid
DCs	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HLA	Humane Leukozytenantigene
HLA-DR	Humanes Leukozyten-Antigen Isotyp HLA Klasse II
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IFN	Interferon
IFN-DCs	Interferon-DCs
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kBq	Kilobecquerel
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i>

L	Liter
LSAB	<i>Labelled (Strept)-Avidin-Biotin</i>
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (magnetische Zellseparation)
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i> (neurales Zelladhäsionsmolekül)
NCR	Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSS	Normales Schweine-Serum
PAMPS	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i> (programmierter Tod-1)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> (Mustererkennungszepetor)
RT	Raumtemperatur
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SSC	<i>Side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> (TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand)
U	Unit (atomare Masseneinheit)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 Natürliche Killer-Zellen (NK).....	2
1.3 Monozyten.....	4
1.4 Dendritische Zellen.....	5
1.5 CD56-positive Interferon-DCs (IFN-DCs).....	8
1.6 Fragestellung.....	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Laborgeräte.....	10
2.1.2 Software.....	11
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	12
2.1.5 Medien und Puffer.....	13
2.1.6 Biologisches Material.....	14
2.1.7 Antikörper.....	14
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe.....	17
2.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut.....	18
2.2.3 Immunphänotypisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS).....	19
2.2.4 Magnetische Zellseparation (MACS).....	23
2.2.5 Zellkultur.....	25
2.2.6 Apoptosenachweis mittels Annexin-V-Färbung.....	26
2.2.7 Zytotoxizitätsassay (⁵¹ Chrom-Freisetzungstest).....	27
2.2.8 Immunhistochemie.....	28
2.2.9 LSAB-Methode.....	30
2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung.....	31
2.2.11 Statistische Auswertung.....	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Anteil CD14 ⁺ /CD56 ⁺ Monozyten im peripheren Blut.....	33
3.2 Phänotypisierung der CD14 ⁺ /CD56 ⁺ Monozyten.....	39
3.2.1 NK-Zell-Oberflächenmarker.....	39

3.2.2 Oberflächenmarker dendritischer Zellen	40
3.3 Funktionelle Analysen von CD14 ⁺ /CD56 ⁺ Monozyten	42
3.3.1 Apoptosedetektion	42
3.3.2 Bestimmung der zytolytischen Aktivität	43
3.3.3 Analyse der co-stimulatorischen Moleküle und T-Zell-Aktivierung.....	44
3.4 Immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebeschnitten.....	45
4 Diskussion	49
5 Literaturverzeichnis	58
6 Danksagung	
7 Eidesstattliche Versicherung	

Zusammenfassung

Dendritische Zellen sind hochpotente, antigenpräsentierende Zellen, die in der Lage sind, das Immunsystem zu koordinieren, zu regulieren und eine zytotoxische Immunantwort zu initiieren. Über ihre vielfältigen Funktionen spielen sie eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von Immunprozessen und stellen ein Verbindungsglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dar. Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten erstmals CD56⁺ DCs identifizieren, die Eigenschaften von NK-Zellen aufweisen und damit zytotoxische Fähigkeiten besitzen. Die untersuchten Zellen tragen den Oberflächenmarker CD56, der bislang nicht für antigenpräsentierende Zellen wie DCs beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen durch Exposition mit IFN- α *in vitro* aus Monozyten generiert werden können. In der vorliegenden Arbeit galt es zu prüfen, ob CD14⁺/CD56⁺ Monozyten als mögliche Vorläuferzellen von CD56⁺ DCs im peripheren Blut und Tumorgewebe detektiert werden können und welche Rolle diese in der natürlichen Anti-Tumor-Immunantwort einnehmen. Hierzu wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut von Tumorkranken durchflusszytometrisch quantifiziert und auf verschiedene charakteristische Oberflächenmoleküle von dendritischen Zellen und NK-Zellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Tumorkranken im peripheren Blut eine signifikant höhere Anzahl von CD14⁺/CD56⁺ Monozyten aufweisen als gesunde Kontrollprobanden. Des Weiteren wurden im Rahmen von funktionellen Analysen Annexin-Apoptose-Assays sowie ⁵¹Chrom-Freisetzungstests zur Zytotoxizitätsbestimmung durchgeführt. In immunhistochemischen Färbungen an Gewebepreparaten eines papillären Schilddrüsenkarzinoms konnte eine erhöhte Anzahl CD14⁺/CD56⁺ Monozyten im Tumorgewebe, insbesondere in direkter Nähe von Tumorzellen, nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass CD14⁺/CD56⁺ Monozyten möglicherweise Vorläuferzellen von CD56⁺ IFN-DCs darstellen und als diese eine Rolle in der natürlichen Anti-Tumor-Immunantwort einnehmen könnten.

1 Einleitung

In der Tumorimmunologie sind zwei Phänomene von herausragender Bedeutung, zum einen die natürliche Anti-Tumor-Immunantwort sowie sogenannte Tumor-*Escape*-Mechanismen. Hierbei stellt die Infiltration von Immunzellen ins Tumorgewebe ein bekanntes Phänomen dar, das bereits in vielen Studien untersucht worden ist. Neben verschiedenen soliden Tumoren unterschiedlichen Ursprungs wurde dies auch für verschiedene endokrine Tumoren gezeigt¹. Insbesondere beim papillären Schilddrüsenkarzinom stellt die natürliche Anti-Tumor-Immunantwort einen Grundpfeiler bei der Verhinderung von Metastasierung und Rezidiven dar. Über ihre Mechanismen, wie die initialen Schritte in der Tumorzellerkennung sowie die Antigenpräsentation und Tumorzellyse, besteht umfangreiche Kenntnis². Seit mehreren Jahren steht im Fokus neuerer Untersuchungen, wann und wie intensiv sich ein Tumor den Angriffen der Immunzellen entzieht³.

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem setzt sich aus zwei zusammenhängenden Teilsystemen zusammen, dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem dient als erste Verteidigungslinie bei der Abwehr pathogener Erreger und umfasst neben Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten auch NK-Zellen, die durch aktivierende („nicht-eigene“) und inhibierende Rezeptoren (Selbst-Antigene) reguliert werden⁴. Zu den Effektoren des erworbenen Immunsystems zählen T-Zellen und B-Zellen, die durch Antigenerkennung eine spezifische Immunantwort induzieren können und an der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses beteiligt sind.

Eine zentrale Rolle im Immunsystem spielen dendritische Zellen, die als hochpotente, antigenpräsentierende Zellen verantwortlich sind für die Erkennung und Prozessierung von Fremdanitigenen, die anschließend T-Zellen präsentiert werden. Durch ihre vielfältigen Funktionen sind DCs in der Lage, das Immunsystem zu koordinieren, zu regulieren und eine zytotoxische Immunantwort zu initiieren⁵.

1.2 Natürliche Killer-Zellen (NK)

NK-Zellen spielen eine grundlegende Rolle bei der Erkennung und Elimination infizierter Zellen und Tumorzellen, da diese eine veränderte Oberflächenstruktur aufweisen und durch das Fehlen von Selbstantigenen (insbesondere MHC-Klasse-I) gekennzeichnet sind. NK-Zellen stammen von CD34⁺ Knochenmarkstammzellen der lymphatischen Linie ab und machen bis ca. 15% der zirkulierenden Lymphozyten im peripheren Blut aus⁴. Als Bestandteil der angeborenen Immunität benötigen NK-Zellen zur Erkennung ihrer Zielzellen kein spezifisches Antigen. Die Unterscheidung zwischen gesunden und infizierten Zellen sowie die Regulation der Zytotoxizität erfolgt über ein komplexes und balanciertes Zusammenspiel aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Zur Erkennung gesunder Zellen dienen den NK-Zellen eine Vielzahl von inhibitorischen Rezeptoren, welche die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche gesunder, eigener Zellen erkennen und auf diese Weise eine Selbsttoleranz sicherstellen. Auf der anderen Seite wird der zytotoxische Wirkmechanismus von NK-Zellen durch die Hypothese des „missing self“ erklärt. Dieser Hypothese zu Folge können NK-Zellen infizierte oder entartete Zellen dadurch erkennen, dass diese Zellen keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren bzw. diese herunterregulieren, um dadurch der Erkennung des Immunsystems, insbesondere durch die Mechanismen der erworbenen Immunität, zu entgehen. Durch das Fehlen dieses Erkennungsmerkmals auf der Zelloberfläche der Zielzellen sind NK-Zellen jedoch befähigt, diese Zellen zu erkennen und eine Apoptoseinduktion zu bewirken⁶.

Neben diesen fehlenden „Selbststrukturen“ besitzen NK-Zellen sogenannte Killerstrukturen. Charakteristischerweise exprimieren NK-Zellen den Oberflächenrezeptor CD16 (FCγRIII), Bindungsstelle für Immunglobuline des Typs IgG, wodurch NK-Zellen in die Lage versetzt werden, Antikörpervermittelte Zelllyse zu induzieren. Ein weiteres charakteristisches Oberflächenmolekül ist CD56, welches auch als neuronales Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) bezeichnet wird. Anhand der Expressionsstärke beider Oberflächenmoleküle können NK-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt werden⁷. 90% der NK-Zellen exprimieren CD16 in hohem und CD56 in geringem Ausmaß (CD56^{dim}), während die

restlichen 10% der NK-Zellen eine hohe Expression von CD56 (CD56^{bright}) und weniger von CD16 aufweisen und durch ihr hohes immunregulatorisches Potenzial gekennzeichnet sind⁴.

Alle peripheren NK-Zellen exprimieren zudem den aktivierenden Rezeptor CD161 (NKR-P1)⁸. Dieser gehört zur Familie der Glykoproteine und ist an der Regulation der NK-Zell-Funktion beteiligt⁹. Die weiteren aktivierenden NK-Rezeptoren können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. Die Rezeptorfamilie der KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) erkennen insbesondere HLA-A, HLA-B und HLA-C und werden in inhibierende und aktivierende Rezeptoren aufgeteilt⁴. Zu den Rezeptoren der C-Typ-Lektin (NKG2)-Familie gehören neben dem aktivierenden Rezeptor CD314 (NKG2D) auch CD94 und CD159a (NKG2A), welche als Heterodimere vor allem HLA-E erkennen und inhibierend bzw. regulatorisch wirken⁸. Die dritte Gruppe stellen die natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR) dar, zu denen NKp46 (CD335), NKp44 (CD336) sowie NKp30 (CD337) gezählt werden⁸.

Zur Zytolyse ihrer Zielzellen machen sich NK-Zellen verschiedene Zytotoxizitätsmechanismen zu Nutze. Die Zytolyse von Zielzellen kann mit Hilfe zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforin sowie Granzym A und B erfolgen¹⁰. Nachdem NK-Zellen ihre Zielzellen erkannt und gebunden haben, werden die im Zytoplasma befindlichen Granula, die Perforin und Granzyme beinhalten, mittels Exozytose in den Kontaktspace zwischen NK-Zelle und Zielzelle freigesetzt. Die Granzyme bewirken eine Perforation der Zielzelle, dringen in diese ein und induzieren durch Caspase-abhängige Signalwege den programmierten Zelltod¹⁰. Ein weiterer Mechanismus zur Apoptoseinduktion ist die Expression von Todesrezeptoren, z.B. der Fas-Signalweg. Hierbei erfolgt die Apoptoseinduktion nach Bindung des Fas-Liganden der NK-Zelle an den Fas-Rezeptor (CD95) auf der Oberfläche der Zielzellen¹⁰. Fas gehört zur TNF-Familie und enthält intrazytoplasmatische Todesrezeptoren, die Caspase-abhängige Signalkaskaden aktivieren und Apoptose induzieren¹¹. Ein weiteres Mitglied der TNF-Familie, das über eine Aktivierung von Todesrezeptoren Apoptose fördert, ist TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)¹². TRAIL bewirkt eine Caspase-abhängige Apoptoseinduktion in einer Vielzahl von Tumorzellen, jedoch nicht in gesunden Zellen¹², indem es verschiedene Rezeptoren, z.B. DR4 und DR5, bindet¹³.

Obwohl NK-Zellen einen Bestandteil des angeborenen Immunsystems darstellen, belegen neuere Untersuchungen ein immunologisches Gedächtnis, was bisher nur Immunzellen des erworbenen Immunsystems vorbehalten war. Sie können somit eine Verknüpfungsstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort darstellen¹⁴.

1.3 Monozyten

Monozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems und machen 3 – 8% der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus. Sie stammen von pluripotenten Knochenmarksvorläuferzellen ab und reifen über die myeloide Reihe durch GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) und/oder M-CSF (Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) zu reifen Monozyten heran. Nachdem sie aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden, zirkulieren sie für 8 bis 72 Stunden im Blut, bevor sie in verschiedene Gewebe migrieren. Monozyten spielen eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess und können in diesem unterschiedliche Funktionen einnehmen. Neben Phagozytose und Antigenpräsentation sind Monozyten zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, z.B. IL-1, IL-6, TNF- α , proteolytischen Enzymen, Myeloperoxidase und Wachstumsfaktoren befähigt. Hierdurch sind Monozyten grundlegend an der Regulation von angeborenen Immunreaktionen beteiligt. Des Weiteren können sie im Rahmen des Entzündungsprozesses reaktive Sauerstoffspezies und Nitritoxid freisetzen, wodurch die Monozyten selbst eine Effektorfunktion innehaben¹⁵.

Weiterhin sind Monozyten in der Lage, T-Zellen sowohl zu stimulieren als auch zu supprimieren¹⁶. Anhand der Expression von Ly6G können zwei Subpopulationen unterteilt werden, sogenannte Wächter- („*patrolling monocytes*“) und Entzündungsmoноzyten („*inflammatory monocytes*“)¹⁷.

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen ist dabei abhängig vom Zytokinprofil der Umgebung. Monozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche typischerweise das Molekül CD14, welches eine Bindung an Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien ermöglicht und ein Differenzierungsantigen darstellt. Ferner werden Fc-Rezeptoren und Rezeptoren für Komplementfaktoren auf der Oberfläche ausgebildet.

1.4 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden erstmals 1973 durch Steinman und Cohn beschrieben und erhielten ihren Namen durch ihre bäumchenartige Struktur¹⁸. DCs kommen in ihrer unreifen Form in fast allen peripheren Geweben vor und suchen ihre Umgebung ständig nach Fremdanthigenen ab, wodurch sie eine Wächterfunktion innehaben („*sentinels*“)¹⁹. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Antigene aufzunehmen, diese zu prozessieren und anschließend naiven T-Zellen zu präsentieren, wodurch eine spezifische Immunantwort induziert wird²⁰. DCs stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sich hinsichtlich ihrer Funktionalität, Morphologie sowie der Expression von Oberflächenmolekülen unterscheidet. Sie gehen im Knochenmark aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen hervor und bringen zwei Vorläuferzelltypen hervor, die myeloide (CD11c⁺) und die lymphoide (CD11c⁻) Zellreihe. Aus der myeloiden Reihe differenzieren sich die interstitiellen DCs sowie Langerhanszellen und bilden den Hauptanteil der DCs⁵. Aus der lymphoiden Reihe kann anhand ihrer Oberflächenmoleküle eine weitere Subpopulation von DCs unterschieden werden: die plasmazytoiden DCs. Diese sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD123 und BDCA-2 (CD303) gekennzeichnet, während eine Expression von CD11c und CD14 fehlt. Diese Subpopulation von DCs exprimiert die intrazellulären Toll-like-Rezeptoren (TLR) TLR-7 und TLR-9, welche in der Lage sind, einzelsträngige RNA (ssRNA) und unmethylierte CpG-Motive in viraler DNA zu erkennen²¹. Nach Stimulation und Aktivierung produzieren plasmazytoide DCs große Mengen von Typ-I-Interferon (v.a. IFN- α)²².

Dendritische Zellen sind gekennzeichnet durch einen charakteristischen Lebenszyklus, in dem sich verschiedene morphologische und funktionelle Veränderungen vollziehen. Im peripheren Gewebe liegen DCs in ihrer unreifen Form vor, in der sie ein hohes Potenzial zur Aufnahme von Antigenen besitzen, jedoch nur geringe T-Zell-stimulatorische Kapazität aufweisen. Sie zeigen eine geringe Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen sowie eine kompakte Oberflächenstruktur. Die Antigenaufnahme kann hierbei über Rezeptor-vermittelte Endozytose, Phagozytose oder über Makropinozytose erfolgen²³.

DCs exprimieren verschiedene Rezeptoren, sogenannte *pattern recognition receptors* (PRR), die Pathogene über sogenannte *PAMPS* (*pathogen*

associated molecular patterns) erkennen. Zu den exprimierten PRR gehören die Toll-like-Rezeptoren zur Erkennung von mikrobiellen Molekülen wie den bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS)²⁴, den C-Typ-Lektinen wie dem Mannose-Rezeptor²⁵ oder Fc-Rezeptoren für die Erkennung von Immunglobulinen.

Zu den C-Typ-Lektin-Rezeptoren wird auch CD209 gezählt, ein Adhäsionsmolekül, welches auch als *DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin)* bezeichnet wird und auf der T-Zelle an ICAM3 bindet. CD209 wird auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und ist als PRR in der Lage, verschiedene Mikroorganismen zu binden, in dem es Glykoproteine mit Mannose-haltigen Strukturen erkennt^{26,27}.

Nach phagozytotischer Aufnahme der Antigene erfolgt die enzymatische Prozessierung zu kleinen Fragmenten, welche an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und an die Oberfläche der Zelle mobilisiert werden²⁸. Nach Kontakt der unreifen DCs mit mikrobiellen Produkten und/oder inflammatorischen Signalen beginnt die Migration der DCs zu den drainierenden Lymphknoten, wodurch der Reifungsprozess initiiert wird¹⁹. Während dieser Wanderung erfolgt eine Umwandlung der unreifen in eine reife dendritische Zelle mit hohem T-Zell-stimulatorischen Potenzial. Dabei exprimieren DCs vermehrt MHC-I- und MHC-II-Moleküle, co-stimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 sowie verschiedene für die T-Zell-Interaktion erforderliche Adhäsionsmoleküle (u.a. CD50, CD54, CD58 und CD209)¹⁹. Die Fähigkeit zur Migration wird dabei durch die Expression verschiedener Chemokine reguliert, z.B. durch die Expression von *Homing*-Faktoren wie CCR7²⁹. Im Lymphknoten treffen die reifen DCs schließlich auf naive T-Helfer-Zellen und bilden mit ihnen eine sogenannte immunologische Synapse³⁰.

Zur T-Zell-Aktivierung sind hierbei drei Signale notwendig³¹. Fehlen diese Signale, wird die T-Zelle in Anergie versetzt und eine weitere T-Zell-Immunantwort verhindert. Das zentrale Signal wird vermittelt durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an Peptide, die von antigenpräsentierenden Zellen mittels MHC-Molekülen präsentiert werden³¹. Dabei werden MHC-Klasse-II-Moleküle durch CD4⁺ T-Helfer-Zellen erkannt, während MHC-Klasse-I-Moleküle der Präsentation von intrazellulären Antigenen, z.B. virusinfizierten Zellen, dienen

und ihre Peptide CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Die Antigenpräsentation kann auch durch CD1a erfolgen. Dieses Oberflächenmolekül gehört zur Gruppe von Transmembran-Glykoproteinen, die strukturelle Ähnlichkeit mit MHC-Molekülen aufweisen³² und T-Zellen lipid- und glykolipidhaltigen Antigenstrukturen präsentieren³³.

Zur vollständigen T-Zell-Aktivierung und klonalen Expansion einer T-Zelle bedarf es eines zweiten Signals. Dieses kommt durch die Expression verschiedener co-stimulatorischer Signale zu Stande und schafft durch zusätzliche Bindung der co-stimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) an den Liganden CD28 auf der T-Zelle eine Stabilisierung der Antigenpräsentation³⁴.

Weitere Signalverstärkungen erfolgen durch die Bindung von ICOS (*Inducible Co-Stimulator*), einem Mitglied der CD28-Rezeptorfamilie, an seinen Liganden ICOS-L auf der DC und die Interaktion des Oberflächenmoleküls CD40 mit CD40L auf der T-Zelle³⁵. Durch die Interaktion dieser Rezeptoren resultiert eine T-Zell-Aktivierung mit vermehrter Zytokinproduktion³⁶.

Neben der Bindung von CD80 und CD86 an den Liganden CD28 kann eine Cross-Präsentation an inhibitorische Rezeptoren erfolgen³⁷. CTLA-4 ist grundlegend an der Regulation der peripheren T-Zell-Toleranz beteiligt³⁷. Während die Bindung an den aktivierenden Rezeptor CD28 zu T-Zell-Überleben, vermehrter IL-2-Produktion sowie gesteigerter T-Helfer-Zell-Differenzierung führt, wird durch Bindung an CTLA-4 der Zellzyklus gehemmt und eine weitere T-Zell-Immunantwort unterbunden³⁷. PD-1 (*programmed cell death protein-1*) ist ein weiteres Mitglied der CD28-Rezeptorfamilie, der als inhibierender Rezeptor hemmend auf T-Zellen wirkt und wie CTLA-4 wesentlich an der Ausbildung einer peripheren Toleranz beteiligt ist. Insbesondere die Expression von PD-1 einerseits und der co-stimulatorischen Moleküle wie CD80/86 andererseits bestimmt das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung und legt die Schwelle zwischen Toleranzentwicklung und Entstehung von Autoimmunität fest³⁸.

Das dritte Signal zur Aktivierung der naiven T-Zellen geschieht durch die Sekretion sogenannter polarisierender Signale zur Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zelle in verschiedene Arten von Helferzellen³¹. Das Profil dieser T-Zell-polarisierenden Faktoren ist dabei vermittelt durch PRR und abhängig von

Pathogen-assoziierten Faktoren, die DCs vor der T-Zell-Aktivierung beeinflussen³¹. So können Zytokine, Gewebefaktoren und andere Mediatoren in eine Th1-, Th2-, Th0-, Th17 sowie eine regulatorische Gruppe eingeteilt werden³¹. Die Freisetzung der Zytokine IL-12, IL-27 und IFN- γ induziert eine Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zelle in eine Th1-Zelle, während die Anwesenheit von IL-4, IL-5 und IL-13 sowie OX40L eine Th2-Antwort hervorruft³¹. Die Polarisierung zu regulatorischen T-Zellen wird durch IL-10 und TGF- β gefördert³⁹.

Neben der Antigenaufnahme und -präsentation sowie anschließender T-Zell-Aktivierung mit Induktion einer spezifischen Immunität sind DCs auch grundlegend an der Entwicklung einer peripheren Toleranz gegen Selbstantigene beteiligt^{19,40,41}. Die immunregulatorische Fähigkeit mit Entstehung einer Toleranz gegen Selbstantigene wird dadurch vermittelt, dass bei Abwesenheit von Gefahrensignalen, wie z.B. Entzündungen oder Gewebsschäden, körpereigene Antigene in der Peripherie ständig im „*steady state*“ durch unreife, nicht aktivierte DCs aufgenommen und naiven T-Zellen in den Lymphknoten präsentiert werden. Hierdurch werden T-Zellen in Anergie versetzt⁴² oder die Bildung von regulatorischen T-Zellen induziert, die eine Hemmung der Immunantwort bewirken⁴³. Bei Auftreten von Gefahrensignalen und inflammatorischen Stimuli reift die dendritische Zelle zu einer aktivierten DC heran und induziert sowohl eine T-Zell-Aktivierung als auch eine spezifische Immunantwort⁴².

1.5 CD56-positive Interferon-DCs (IFN-DCs)

Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten erstmals CD56⁺ DCs identifizieren, die Eigenschaften von NK-Zellen aufweisen und damit zytotoxische Fähigkeiten besitzen⁴⁴. Diese Zellen tragen den für NK-Zellen typischen Oberflächenmarker CD56, der bislang nicht für antigenpräsentierende Zellen wie DCs beschrieben wurde⁴⁴. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen durch Exposition mit IFN- α *in vitro* aus Monozyten generiert werden können⁴⁴. Nach Generierung der IFN-DCs fand sich der Monozytenmarker CD14 herunterreguliert, während typische DC-Marker (CD1a, CD11c) deutlich höher exprimiert waren⁴⁴. Zusätzlich konnte auf diesen Zellen eine erhöhte Expression von MHC-Molekülen (HLA-DR), co-stimulatorischen

Molekülen (CD40, CD80, CD86) sowie des Reifungsmarkers CD83 festgestellt werden⁴⁴. Weiterführende durchflusszytometrische Untersuchungen der ebenfalls entstehenden CD56-negativen Subpopulation zeigten eine annähernd gleiche Expression verschiedener DC-spezifischer Oberflächenmarker auf CD56⁺ und CD56⁻ IFN-DCs⁴⁴. Allerdings waren die CD56⁺ IFN-DCs durch zytotoxische Eigenschaften gegenüber Tumorzellen und die Fähigkeit zu einer starken T-Zell-Aktivierung gekennzeichnet⁴⁴. Es konnte gezeigt werden, dass die zytolytische Fähigkeit dieser DCs durch TRAIL vermittelt wurde⁴⁴. In intrazytoplasmatischen Zytokinfärbungen zeigte sich außerdem, dass CD56⁺ IFN-DCs zusätzlich auch IFN- γ produzieren⁴⁴. Diese IFN-DCs können aufgrund ihrer Funktionen somit eine Verknüpfungsstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellen.

1.6 Fragestellung

Als Ziel der vorliegenden Arbeit galt es, CD14⁺CD56⁺ Monozyten als mögliche Vorläuferzellen von CD56⁺ DCs im peripheren Blut sowie im Tumorgewebe zu detektieren und zu prüfen, welche Rolle diese Zellen in der natürlichen Anti-Tumor-Immunantwort einnehmen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

- Pipetten, Eppendorf research, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Herasafe, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Sterilbank, Laminar Flow Cabinet, Class 100, Meckenheim, Deutschland
- Handstückzähler, IVO, Villingen-Schwenningen, Deutschland
- Flockeneisbereiter, NordCap SPR80, Stettner Kühlanlagen, Mainz, Deutschland
- Zentrifuge, TJ-6-Centrifuge, Beckman Coulter, USA
- Zentrifuge, Rotixa 120R, Hettich Zentrifugen, Mülheim an der Ruhr, Deutschland
- Biofuge, Pico, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Zellzählkammer, Neubauer Improved Bright-Line, Tiefe 0,1 mm, Brand, Wertheim, Deutschland
- Durchflusszytometer, FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Pipettierhilfe, Pipetus[®] akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH + Co. KG, Eberstadt, Deutschland
- Vortexer, Reax 2000, Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Mikroskop, Wilovert[®], Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Kontrastmikroskop, Leica DM IL, Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop, BZ8000, Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
- Brutschrank, Heracell (37°C, 5% CO₂), Heraeus, Hanau, Deutschland
- Kühlschranks, Liebherr Premium (3°C, 30% Luftfeuchtigkeit), Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland

- Gefrierschrank, Liebherr Premium (-20°C), Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
- Mikrotiterplatten, Schüttler AM169, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland
- Mikroplatten-Reader, Sunrise, Tecan, Crailsheim, Deutschland
- Wizard Automatic Gammacounter, Wallac, Turku, Finnland
- Kryostat, Jung Frigocut 2008E, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
- MidiMACS™ Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.2 Software

- Statistische Auswertung Prism 3, GraphPad Software, San Diego, USA
- FACSCalibur, Cell Quest Pro, BD Biosciences, San Jose, USA
- Excel 2007, Microsoft Corporation, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Stripetten, Costar Stripette, 5 ml/10 ml/25 ml, Corning, New York, USA
- Pipettenspitzen, TipOne, 0,1-10 µl/1-100 µl/101-1000 µl, Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
- Reaktionsgefäße, Eppendorf Tubes, 0,5 ml/1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Falcon-Tube, 50 ml Polypropylene Conical Tube, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FACS-Röhrchen, BD Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FACS-Flow, BD FACS Flow Sheath Fluid, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FACS-Rinse, BD FACS Rinse Solution, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- FACS-Clean, BD FACS Clean Solution, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- CPT-Röhrchen, BD Vacutainer CPT, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
- Filter, MACS Pre-Separation Filters, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

- Zell-Isolations-Säulen, MACS LS Separation Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Blutabnahme-Set, Vacutainer Brand Safety-Lok, Blood Collection Sets, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
- Deckgläschen, Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
- Objektträger, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
- Kryoröhrchen, Nalgene CryowareTM, Nunc International, Rochester, New York, USA
- Zellkulturplatten (96-Well), Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
- Zellkulturplatten (24-Well), Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
- T75-Zellkulturflaschen, Nunc, Roskilde, Dänemark

2.1.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits

- FcR-Block, FcR-Blocking-Reagent, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Trypanblau, Trypan blue solution (0,4%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Aceton, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Ethanol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Trypsin/EDTA-Lösung, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Triton-X-100, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- PFA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- FKS, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- NSS, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
- ⁵¹Chrom, Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland
- DAPI, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Gewebekleber, Tissue Tek[®] OCT Compound, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
- DAKO-Pen, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
- Verdünnungsmittel, Antibody diluent with background reducing components, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
- Eindeckmedium, Faramount Aqueous Mounting Medium, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
- Vitamin Solution 100x, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

- L-Glutamin, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Monocyte Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
 - Annexin-Bindungspuffer
 - Anti-Annexin V-FITC
 - Propidiumiodid
- Universal LSAB™2 Kit/HRP, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
 - Peroxidase-Block, DAKO peroxidase blocking solution ready-to-use
 - Linkantikörper, Biotinylated Link Antibody
 - Streptavidin-HRP
 - DAB Substratchromogen

2.1.5 Medien und Puffer

- RPMI 1640, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Erythrozyten-Lysepuffer, Buffer EL Erythrocyte lysis buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland
- HEPES, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- PBS-Puffer, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- MACS-Puffer, Auto MACS Running Buffer, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
- R10-Medium:
 - RPMI 1640
 - 10% FKS
 - 100 U/ml Penicillin
 - 100 µg/ml Streptomycin
 - 2 mM L-Glutamin
 - 20 mM HEPES
- TBS-T-Puffer
 - 50 mM Tris
 - 150 mM NaCl
 - 0,05% Tween 20
- PBS-T

- 0,2% Triton-X-100 in PBS

2.1.6 Biologisches Material

- IFN- α , Roferon®-A, Roche, Basel, Schweiz
- Jurkat-Zelllinie, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland
- K562-Zelllinie, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland
- PC3-Zelllinie, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland

2.1.7 Antikörper

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorochrom	Spezifität	Isotyp	Klon	Hersteller
CD14	PerCP	anti-human	IgG2b	MOP9	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD56	APC	anti-human	IgG2b	AF12-7H3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD16	FITC	anti-human	IgG1	NKP15	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BDCA-1 (CD1c)	PE	anti-human	IgG2a	AD5-8E7	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19	FITC	anti-human	IgG1	4G7	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BDCA-2 (CD303)	PE	anti-human	IgG1	AC144	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

CD80	FITC	anti-human	IgG1	L307.4	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD86	PE	anti-human	IgG2b	IT2.2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
HLA-DR	FITC	anti-human	IgG2a	G46-6	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD40	PE	anti-human	IgG1	5C3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD25	FITC	anti-human	IgG1	M-A251	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
NkG2A (CD159a)	PE	anti-human	IgG2a	131411	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
CD123	FITC	anti-human	IgG2a	9F5	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
NkG2D (CD314)	PE	anti-human	IgG1	ID11	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD337	PE	anti-human	IgG1	NKp30, P30-15	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD1a	FITC	anti-human	IgG1	SK9	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD161	PE	anti-human	IgG1	DX12	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD83	FITC	anti-human	IgG1	HB15e	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

CD94	PE	anti-human	IgG1	HP-3D9	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
TRAIL	PE	anti-human	IgG1	RIK-2	eBioscience, Frankfurt a.M., Deutschland

Primärantikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Verdünnung	Klonalität	Isotyp, Spezifität	Hersteller
CD14	1:50	polyklonal	IgG rabbit anti-human	Abcam Cambridge, UK
CD56	1:50	monoklonal	IgG mouse anti-human	Abcam Cambridge, UK
CD3	1:50	monoklonal	IgG rabbit anti-human	Abcam Cambridge, UK
CD8	1:50	monoklonal	IgG rabbit anti-human	Abcam Cambridge, UK

Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Spezies Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
goat anti-rabbit	Alexa Fluor® 488	1:500	molecular probes®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
goat anti-mouse	Alexa Fluor® 594	1:500	molecular probes®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
goat anti-rabbit	Alexa Fluor® 594	1:500	molecular probes®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

Im Zeitraum von April 2008 bis Mai 2009 wurde am Universitätsklinikum Düsseldorf bei 55 Tumorpatienten der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie sowie für Endokrinologie und Diabetologie peripheres Blut abgenommen. Das Patientenkollektiv umfasste 26 männliche und 29 weibliche Patienten. Das durchschnittliche Alter betrug $60,1 \pm 14,5$ Jahre. Einschlusskriterium war das Vorliegen einer malignen Erkrankung. Eingeschlossen wurden sowohl solide Tumoren als auch hämatologische Erkrankungen. Die eingeschlossenen Tumorentitäten können der Tabelle 1 entnommen werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung erhielt keiner der Tumorpatienten eine Chemotherapie (Ausschlusskriterium).

Tabelle 1: Verteilung der eingeschlossenen Tumorentitäten. Als Einschlusskriterium galt das Vorliegen eines Malignoms. Ausgeschlossen wurden Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Chemotherapie erhielten.

Tumorentitäten	Anzahl Patienten (n)
Solide Tumoren	18
Endokrine Tumoren	13
Neuroendokriner Tumor des GIT	4
Nebennierenkarzinom	2
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	5
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	2
Nicht-endokrine Tumoren	5
Kolonkarzinom	2
Liposarkom	1
Plattenepithelkarzinom	1
CUP-Syndrom	1
Hämatologische Erkrankungen	37
Multiples Myelom	18
Myelodysplastisches Syndrom	4
Akute Leukämie	6
Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom	7
Chronisch myeloproliferative Erkrankung	2

Zusätzlich wurde für eine Kontrollgruppe peripheres Blut von 40 gesunden Probanden entnommen, die im Durchschnitt $33,2 \pm 12,3$ Jahre alt waren. Die Zustimmung der lokalen Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf lag vor (Studennummer 2608). Vor Blutentnahme wurde von jedem teilnehmenden Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

2.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation mittels *Vacutainer*[®] *CPT*[™] Blutentnahmeröhrchen. Das *Vacutainer*-System beinhaltet Natriumzitrat als Antikoagulant, ein *FICOLL*[™] *Hypaque density fluid*[™] sowie eine feste Polyester-Gelschicht, welche eine Trennung der unterschiedlich dichten Flüssigkeiten hervorruft. Während der Zentrifugation bei 1750 rpm für 20 Minuten bei Raumtemperatur kommt es zu einem Auftrennen der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) und einer Ansammlung dieser Zellpopulationen oberhalb der Gelschicht. Oberhalb der trüben, weißen Zellschicht aus mononukleären Zellen befindet sich das Blutplasma mit Thrombozyten. Die feste Gelschicht bildet eine undurchlässige Barriere zum Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten und ermöglicht somit eine Entnahme der mononukleären Zellen ohne Durchmischung mit den übrigen Zellpopulationen. Pro Blutentnahme konnten mit einem *CPT*-Röhrchen 8 ml Vollblut aufgereinigt werden. Nach Zentrifugation (20 Minuten, 1750 rpm, RT) wurde die Plasmafraktion abpipettiert und verworfen. Nach Überführung der Leukozyten in ein 50 ml *Falcon-Tube* und dem Spülen des *CPT*-Röhrchens mit 2 ml R10-Medium wurde die Suspension für 5 Minuten bei 4°C und 1400 rpm zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets mit 1 ml R10-Medium und Überführung auf einen Filter (*Pre-Separation Filter*) wurde das Röhrchen mit 5 ml R10-Medium gespült und der Inhalt zum Nachspülen des Filters verwendet. Es folgte eine erneute Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten bei 1400 rpm und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Zellpellet mit 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und nach Zugabe weiterer 2 ml Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das *Falcon-Tube* mit 10 ml R10-Medium aufgefüllt, zentrifugiert und das Pellet mit 10 ml R10-Medium

letztmalig gewaschen und zentrifugiert. Bei den dabei gewonnenen Zellen handelt es sich um aufgereinigte, periphere mononukleäre Zellen (PBMCs).

2.2.3 Immunphänotypisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) ermöglicht die quantitative Bestimmung und immunologische Phänotypisierung von Einzelzellen in einer Zellsuspension durch die gleichzeitige Erfassung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen. Dazu wird die Zellsuspension zunächst aus dem Probenröhrchen mittels Überdruck in die Messküvette gepresst und durch eine Hüllflüssigkeit (*sheath fluid*) umhüllt und verdünnt. Die Querschnittsverringerng in der Messküvette führt zu einer Beschleunigung des Probenstroms und zu einem Hintereinanderreihen einzelner Zellen. Dieser als hydrodynamische Fokussierung bezeichnete Vorgang ermöglicht am Messpunkt, d.h. dem Kreuzungspunkt des Flüssigkeitsstroms mit dem Laserstrahl, das Auftreffen und Analysieren einzelner Zellen mithilfe verschiedener Fluoreszenz- und Streulichtdetektoren. Das Streulicht wird unterteilt in das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht. Der Anteil des Lichtes, der vorwärts gestreut wird (*forward scatter*, FSC), erfasst den entlang der Zellachse einfallenden Laserstrahl und stellt ein Maß für die relative Größe der gemessenen Zellen dar. Demgegenüber bildet das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) die Zellgranularität ab. Mit Hilfe dieser beiden Parameter ist in der Vorwärts-/Seitwärtsstreulichtdarstellung eine Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten möglich. Die parallele Detektion der Fluoreszenzsignale durch Anwendung Antigen-spezifischer, an Farbstoffe gekoppelter monoklonaler Antikörper kann die Expression von Oberflächenmolekülen einer Zelle untersucht und eine exakte Immunphänotypisierung durchgeführt werden. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf eine Zelle absorbieren die gekoppelten Fluorochrome Lichtenergie, die nach Rückkehr auf ihr Ausgangsniveau Energie in Form von Photonen höherer Wellenlänge abgeben. Dabei wird das emittierte Licht für jeden Fluoreszenzfarbstoff in einem charakteristischen Wellenlängenbereich von Photodetektoren erfasst. In der vorliegenden Arbeit kam eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse mit den vier Fluorochromen Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) zum Einsatz (Tabelle 2). Da die

verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Emissions- und Absorptionsspektren aufweisen, konnten dementsprechend vier Parameter simultan an einer Zelle analysiert werden.

Tabelle 2: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome. Das in dieser Arbeit verwendete FACS-Gerät mit zwei Lasern (Exzitation 488 nm und 633 nm) ermöglichte die Analyse von vier Fluoreszenzen.

Fluorochrom	Abkürzung	Exzitation (nm)	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488	495	521
Phycoerythrin	PE	488	480, 565	578
Peridin-Chlorophyll-Protein	PerCP	488	490	675
Allophycocyanin	APC	633	650	660

Das verwendete Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma BD Biosciences enthält als Lichtquelle zwei Laser: einen luftgekühlten Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm für die Anregung der Fluorochrome FITC, PE, PerCP sowie einen roten Diodenlaser mit einer Emission bei 635 nm für das Fluorochrom APC.

Um spätere unspezifische Bindungen der Antikörper an FcR-Rezeptor-exprimierende Zellen (B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) zu verhindern und die Spezifität von Antikörpermarkierungen zu erhöhen, wurden die PBMCs zunächst mit einem FcR-Block-Reagenz inkubiert. Dazu wurde das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen, 100 µl FcR-Block-Reagenz hinzugefügt, gut gemischt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension auf zehn FACS-Röhrchen verteilt, mit je 5 µl des entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers versehen und 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. In einem abschließenden Waschschrift mit 2 ml kaltem MACS-Puffer und einer 5-minütigen Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl 1% PFA resuspendiert und bis zur FACS-Messung im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Vor der Messung wurde jedes FACS-Röhrchen

mit 200 µl FACS-Flow aufgefüllt und die Zellsuspension mit Hilfe eines Vortexers gemischt.

Zu jeder Messung wurde mit Hilfe von Isotypkontrollen der Hintergrund der Eigenfluoreszenz festgelegt. Bei der Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe muss die Überschneidung der Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe berücksichtigt werden, die durch eine vorherige Kompensation der Fluoreszenzkanäle korrigiert wird. Aus diesem Grund wurden vier Kontrollfärbungen mit Anti-CD45-Antikörpern in einer der angegebenen Farben durchgeführt und jeweils getrennt durchflusszytometrisch gemessen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Kontrollen zur Einstellung der FACS-Messung. Die Verwendung von Isotypkontrollen (Kontrolle 1) diente der Bestimmung des durch Autofluoreszenz bedingten Hintergrunds. Positivkontrollen wurden verwendet, um die Einstellung der Kompensation zu optimieren (Kontrollen 2 - 5).

Kontrolle 1	IgG1 FITC	IgG2a PE	IgG1 PerCP	IgG2b APC
Kontrolle 2	CD45 FITC	IgG2a PE	IgG1 PerCP	IgG2b APC
Kontrolle 3	IgG1 FITC	CD45 PE	IgG1 PerCP	IgG2b APC
Kontrolle 4	IgG1 FITC	IgG2a PE	CD45 PerCP	IgG2b APC
Kontrolle 5	IgG1 FITC	IgG2a PE	IgG1 PerCP	CD45 APC

Anhand einer finalen Kontrollmessung konnten die richtige Kompensation überprüft und die Grenzen des Quadrantenkreuzes in der Punktwolkendarstellung richtig positioniert werden, um die Expression der gesuchten Oberflächenmoleküle zu definieren. Zur Durchführung der Immunphänotypisierung der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten wurde zunächst anhand der Streulichtdarstellung die Monozytenpopulation identifiziert (siehe Abb. 1 A). Durch Verwendung eines *Gates* (R1) um diese zu untersuchende Zellpopulation wurden in den darauf folgenden Beobachtungen ausschließlich die Informationen der in diesem *Gate* ausgewählten Monozyten ausgewertet (Abb. 1 B). Das hier gesetzte zweite *Gate* (R2) um die CD14⁺/CD56⁺ doppelpositiven Zellen ermöglichte die Bestimmung einer Vielzahl von Oberflächenmolekülen (Abb. 1 C, Tabelle 4). Pro Röhrchen wurden 100000

Ereignisse erfasst und die Durchflussrate von 200 bis 300 Zellen pro Sekunde nicht überschritten. Die Anzahl der gemessenen Ereignisse wurde prozentual auf die Monozytenanzahl bezogen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Analyse-Software *Cell Quest Pro*[®] (BD Biosciences).

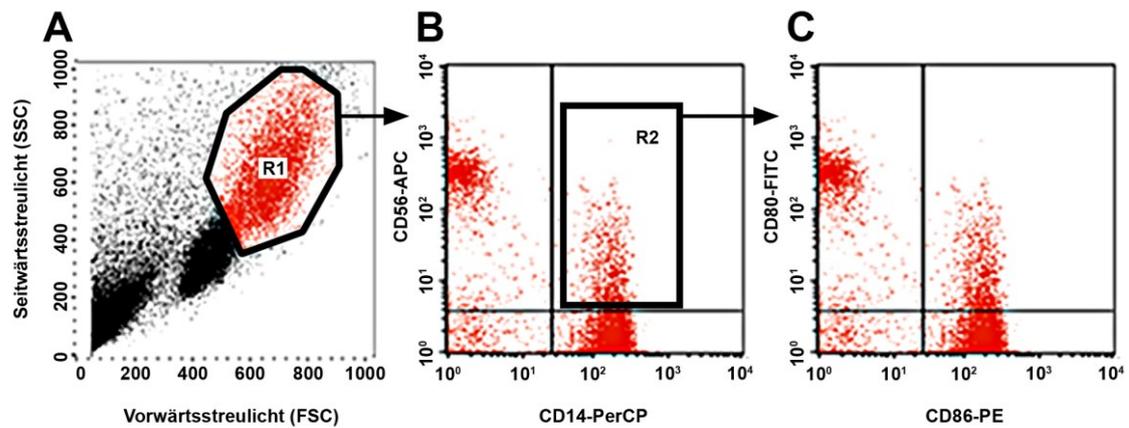


Abb. 1: Exemplarische Auswertung einer Immunphänotypisierung. (A) Die Einstellung in der Streulicht-Darstellung wurde so gewählt, dass neben dem Debris die Lymphozyten und Monozyten anhand der Größe und Granularität klar abgrenzbar dargestellt werden. (B) Die in der Region 1 (R1) enthaltenen Monozyten wurden weiter auf ihre Expression von CD14 und CD56 und (C) die doppelpositiven Monozyten (R2) auf verschiedene NK- und DC-Marker hin untersucht.

Tabelle 4: Verwendetes Antikörper-Panel zur Immuntypisierung. Zur Bestimmung der Expression von NK-Zell- und DC-Oberflächenantigenen wurden 10 verschiedene Zusammensetzungen (*Panels*) verwendet, bei denen CD14 und CD56 mitgefärbt wurden.

Probe 1	CD16 FITC	BDCA-1 PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 2	CD19 FITC	BDCA-2 PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 3	CD80 FITC	CD86 PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 4	HLA-DR FITC	CD40 PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 5	CD25 FITC	NKG2A PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 6	CD123 FITC	NKG2D PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 7	CD209 FITC	CD337 PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 8	CD1a FITC	CD161 PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 9	CD84 FITC	CD94 PE	CD14 PerCP	CD56 APC
Probe 10	HLA-DR FITC	TRAIL PE	CD14 PerCP	CD56 APC

2.2.4 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die magnetische Zellseparation (*magnetic activated cell sorting*, MACS) dient der Isolierung bestimmter Zellpopulationen. Dazu werden spezifische monoklonale Antikörper verwendet, die an supramagnetische Partikel, sogenannte *Microbeads*, gekoppelt sind. Die Zellen werden mit diesen inkubiert und im Anschluss gewaschen. Danach wird die Zellsuspension auf eine Trennsäule aufgetragen, die ferromagnetische Stahlpartikel enthält und sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die mittels der gekoppelten Antikörper markierten Zellen bleiben in der Säule haften, während die unmarkierten Zellen die Säule zusammen mit der Flüssigkeit durchlaufen. Nach Entfernen der Säule werden die markierten Zellen eluiert. Die MACS-Technik kann zur positiven und negativen Selektion von spezifischen Zellpopulationen verwendet werden. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Zellseparation werden anschließend die Fraktionen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Isolierung von Monozyten aus peripheren mononukleären Zellen wurde mit Hilfe des Monozyten-Isolationskits (Monocyte Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach dem Prinzip der negativen Selektion durchgeführt. Zur Anwendung kamen PBMCs, die aus dem Blut von Patienten mit endokrinen und nicht-endokrinen Malignomen isoliert worden waren und zuvor nach durchflusszytometrischer Analyse eine große Anzahl CD14⁺/CD56⁺ doppelpositiver Monozyten aufwiesen (n = 3). Nach Isolierung der Monozyten erfolgte zunächst die Bestimmung der Zellzahl der aufgereinigten PBMCs. Dazu wurde das Zellpellet mit 1 ml R10-Medium resuspendiert und das Falcon-*Tube* mit 14 ml R10-Medium aufgefüllt. Aus der Zellsuspension wurden nach gründlicher Mischung 10 µl entnommen und in ein Eppendorf-*Tube* mit 100 µl Trypanblau überführt. Hiervon wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und mikroskopisch ausgezählt. Die Berechnung der exakten Zellzahl pro ml erfolgte nach folgender Formel: Anzahl der gezählten Zellen/Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴.

Anschließend wurden pro 1x10⁷ Zellen 30 µl MACS-Puffer verwendet, mit 10 µl FcR-Block sowie 10 µl des Monozyten Biotin-Antikörper-Cocktails versetzt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Der dabei zum Einsatz gekommene Antikörpercocktail beinhaltete Antikörper gegen plasmazytoide DCs, NK-Zellen,

T-Zellen, B-Zellen und basophile Granulozyten (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a). Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l der Anti-Biotin-*Microbeads* pro 1×10^7 Zellen. Nach gründlicher Durchmischung folgte eine 15-minütige Inkubation der Zellsuspension bei 4°C. Durch die Zugabe von 14 ml MACS-Puffer und die anschließende Zentrifugation wurden ungebundene Antikörper entfernt. Nachfolgend wurde das Zellpellet mit 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension über die Trennsäule gegeben. Nach dem Durchlauf folgte ein dreimaliges Spülen der Säule mit jeweils 3 ml MACS-Puffer und die mit CD14⁺/CD16⁻ Monozyten angereicherte Fraktion wurde in einem 15 ml-*Tube* aufgefangen. Abschließend wurden die gewonnenen Monozyten mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit geprüft. Dafür wurden die Zellen mit einem Anti-CD14-FITC-Antikörper und einem PE-markierten Antikörper-Cocktail gegen CD3, CD19, CD57, CD66b, CD161 sowie dem Anti-CD56-APC-Antikörper gefärbt und zusammen mit einem FcR-Block für 10 Minuten inkubiert. Die Zugabe von Propidiumiodid ermöglichte die Bestimmung toter Zellen.

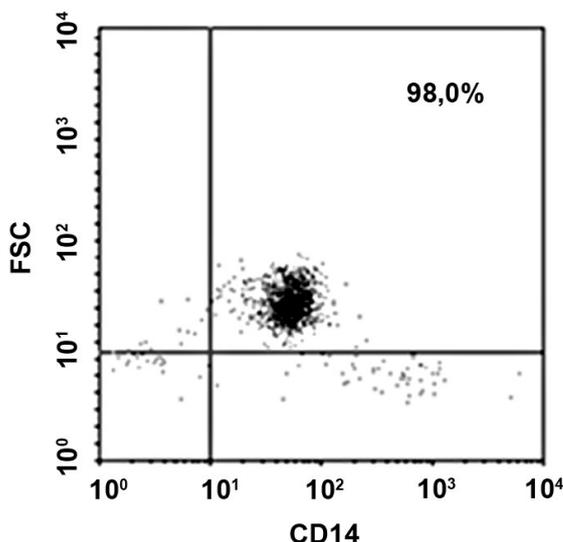


Abb. 2: Reinheitsbestimmung von Monozyten. Nach negativer Selektion mit CD14-*Microbeads* wurde die Reinheit der gewonnenen Monozyten durchflusszytometrisch überprüft. Die Färbung erfolgte mit einem FITC-markierten Anti-CD14-Antikörper sowie einem Cocktail aus PE-gekoppelten Antikörpern gegen CD3, CD19, CD57, CD66b, CD161 sowie einem APC-gekoppelten Anti-CD56-Antikörper. Dargestellt ist ein exemplarischer Dot-Plot der CD14-Analyse. Die Population im rechten, oberen Quadranten entspricht den CD14⁺ Monozyten in einer Reinheit von 98,0%. Eine Viabilität von 98% wurde durch Zugabe von Propidiumiodid bestätigt.

2.2.5 Zellkultur

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Vor Gebrauch wurden alle verwendeten Materialien desinfiziert oder sterilisiert. Die Inkubationen der Zellkulturen erfolgten in einem Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Als Kulturmedium kam R10-Medium zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zelllinien verwendet, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurden. Zum einen wurden K562-Zellen als Targetzellen eingesetzt (ATCC-Nr.: CCL-243), eine erythroleukämische Zelllinie, die aus einem Patienten in der Blastenkrise einer chronisch-myeloischen Leukämie gewonnen wurde. Durch das Fehlen von MHC Klasse-I- und -II-Antigenen gelten diese als besonders sensitiv gegen die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Bei Jurkat-Zellen (ATCC-Nr.: TIB-152) handelt es sich um eine immortalisierte T-Lymphozyten-Zelllinie. PC3-Zellen (ATCC-Nr.: CRL-1435) sind eine menschliche androgenunabhängige Prostatakarzinom-Zelllinie mit hohem metastatischem Potential, die erstmals aus einer ossären Metastase eines 62-jährigen Patienten mit Prostatakarzinom gewonnen wurde.

Die für die funktionellen Untersuchungen verwendeten Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen in R10-Medium ausgesät und bei fast vollständiger Konfluenz gesplittet. Dafür wurden die Jurkat- und PC3-Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA abgelöst, anschließend mit R10-Medium gewaschen und ein Zehntel der Zellen weiterkultiviert. K562 als Suspensionskultur wurde entsprechend verdünnt weiterkultiviert. Zur Kontrolle des Wachstums und zum Ausschluss von Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien wurden die Zellkulturen täglich unter einem Kontrastmikroskop untersucht.

Die mittels negativer Selektion isolierten Monozyten wurden in 24-Well-Zellkulturplatten (Durchmesser 1,3 cm) in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Well in 1 ml Gesamtvolumen ausgesät und für 18 Stunden in R10-Medium mit 10000 U/ml IFN- α (Roferon®-A) im Brutschrank bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Rahmen des Apoptosenachweises und Zytotoxizitätsassays weiter verwendet.

2.2.6 Apoptosenachweis mittels Annexin-V-Färbung

In der Frühphase der Apoptose wird Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite transloziert. Annexin-V ist ein Kalzium-abhängiges Protein, welches eine hohe Affinität für dieses Membranphospholipid aufweist und deshalb FITC-markiert zum durchflusszytometrischen Nachweis apoptotischer Zellen verwendet wurde. Da nekrotische Zellen die Integrität ihrer Zellmembran verloren haben, kann Annexin-V auch in diese Zellen eindringen, wodurch durchflusszytometrisch eine Unterscheidung apoptotischer Zellen und nekrotischer Zellen nicht möglich wäre. Aus diesem Grund erfolgte gleichzeitig zur Annexin-V-Färbung eine Färbung mit Propidiumiodid, welches die durchlässige Membran toter Zellen, nicht jedoch die intakte Membran von vitalen Zellen durchdringen kann. Zellen im Frühstadium der Apoptose sind Annexin-V-positiv und PI-negativ. Zellen, die positiv für Annexin-V und PI sind, befinden sich dagegen im Endstadium der Apoptose oder sind nekrotisch.

Zur Durchführung der Färbung wurden die Jurkat-Zellen sowie die mit IFN- α stimulierten Monozyten geerntet und zweimalig gewaschen. Danach erfolgte jeweils eine Co-Inkubation der Jurkat-Zellen mit den frisch isolierten Monozyten sowie den IFN-DCs, jeweils in einem Verhältnis von 1:1 in 200 μ l Medium in 96-Well-Zellkulturplatten für 18 Stunden. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet und zweimal mit Annexin-Bindungspuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 100 μ l Puffer resuspendiert und für 15 Minuten mit 5 μ l Anti-Annexin-FITC und 5 μ l Propidiumiodid im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 400 μ l Bindungspuffer folgte die durchflusszytometrische Analyse der gefärbten Tumorzellen. Anhand des Unterschieds hinsichtlich Größe und Granularität konnten die Tumorzellen in der FSC/SSC-Darstellung identifiziert werden und durch Setzen eines *Gates* von den Monozyten abgegrenzt werden. Als Positivkontrolle für die Annexin-V-Färbung dienten Zellen, die mit 6 μ M Camptothecin, einem Apoptoseinduktor, für 4 Stunden bei 37°C inkubiert wurden.

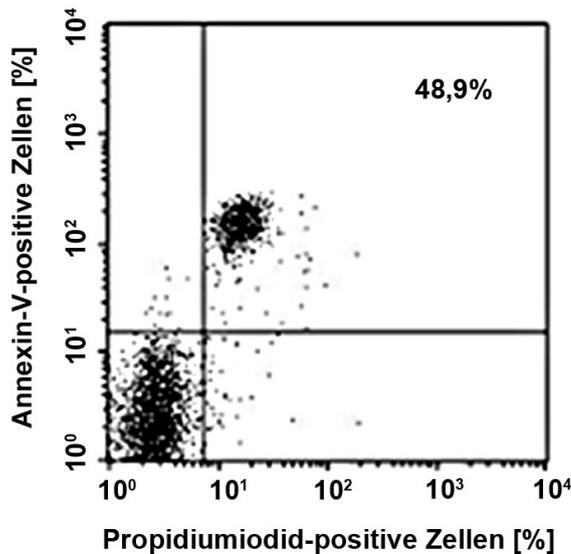


Abb. 3: Exemplarische Darstellung des Dotplots einer durchflusszytometrischen Annexin-V-PI-Messung. Oben links finden sich die Annexin-V-positiven Zellen (apoptotische Zellpopulation), oben rechts die Annexin-V-positiven und PI-positiven Zellen (nekrotische oder spätapoptotische Zellpopulation).

2.2.7 Zytotoxizitätsassay (⁵¹Chrom-Freisetzungstest)

Mit dem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest ist es möglich, die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen zu ermitteln. Die Targetzellen werden dabei mit radioaktivem ⁵¹Chrom markiert und anschließend mit Effektorzellen zusammengeführt. Sobald eine Zielzelle von ihrer Effektorzelle lysiert wird, entweicht das radioaktive Chrom und kann mit Hilfe eines Gammacounters quantifiziert werden. Die Menge des gemessenen ⁵¹Cr ist dabei direkt proportional zur Lyseaktivität der Effektorzellen. Die zytotoxische Aktivität wurde als prozentualer Anteil an maximaler Lyse angegeben, die durch einen Kontrollansatz mit dem Detergenz Triton-X-100 erfasst wird. In der vorliegenden Arbeit dienten K562-Zellen als Targetzellen und sowohl frisch aus PBMCs isolierte als auch mit IFN- α stimulierte Monozyten als Effektorzellen.

Zur Durchführung der Freisetzungstests wurden die K562- und PC3-Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit ⁵¹Chrom bei 37°C (3,7 kBq für 1×10^6 Zellen in 100 μ l) markiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die radioaktiv markierten Targetzellen (K562 und P3-Zellen) mit den Effektorzellen (Monozyten) in einer 96-Well-Zellkulturplatte inkubiert. Dazu wurden jeweils 5×10^3 Tumorzellen in 200 μ l R10-Medium ausgesät und mit verschiedenen Effektor-zu-Target-Verhältnissen (80:1, 40:1, 20:1) zusammengebracht.

Parallel wurden Negativ- und Positivkontrollen angesetzt. Zur Ermittlung der maximalen Lyse wurden 100 µl Triton-X-100 pro *Well* verwendet, zur Bestimmung der spontanen Lyse jeweils 100 µl R10-Medium. Nach 8 Stunden wurde 100 µl Überstand entnommen und die ⁵¹Chrom-Freisetzung mit einem *Wizard Automatic Gammacounter* quantifiziert. Die spezifische Zytotoxizität wurde nach der folgenden Formel berechnet:

% spezifische Lyse = [(experimentelle Freisetzung cpm – spontane Freisetzung cpm)/(maximale Freisetzung cpm – spontane Freisetzung cpm)] × 100.

2.2.8 Immunhistochemie

Ein Ziel der Arbeit bestand darin, mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, ob CD14⁺/CD56⁺ doppelpositive Zellen im Tumorgewebe von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom auch direkt das Tumorgewebe invadieren und dort eine Anti-Tumor-Immunantwort induzieren. Zur Testung und Optimierung der Antikörperkonzentrationen wurden zunächst Einzelfärbungen nach der LSAB-Methode durchgeführt, um anschließend beide Färbungen gleichzeitig im Rahmen der Fluoreszenzimmunhistochemie zu etablieren. Die LSAB-Methode ist eine weit verbreitete immunhistochemische Methode und beruht auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin zu Biotin. Bei der Färbung wird der Gewebeschnitt zunächst mit einem Primärantikörper und anschließend mit einem biotinylierten Linkantikörper inkubiert. Es folgt eine Inkubation mit Streptavidin-HRP. Streptavidin ist dabei an Meerrettich-Peroxidase (*Horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelt, ein Enzym, das zu einer Zersetzung von H₂O₂ in H₂O und O₂ führt. Der dabei entstehende Sauerstoff reagiert mit dem im Anschluss aufgetragenen Substratchromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin), wodurch ein unlösliches, dunkelbraunes Endprodukt entsteht.

Bei der Immunfluoreszenz werden Antikörper zur Detektion von Antigenen im Gewebe benutzt, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist das Fluorochrom direkt an den Antikörper gekoppelt. In dieser Arbeit kam die indirekte Immunfluoreszenz zur Anwendung, wobei zunächst die Bindung eines Primärantikörpers an das gewünschte Antigen und im Anschluss daran die Inkubation eines mit einem Fluorochrom

markierten Sekundärantikörpers erfolgt, wodurch eine Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe fluoreszenzmikroskopisch möglich wird. Zu den Vorteilen der Fluoreszenzmethode gehört, dass sich die angefärbten Strukturen durch ihre leuchtenden Farbsignale deutlich vom dunklen Hintergrund abheben und die gesuchten Antigene auf diese Weise leichter vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden sind. Nachteilig ist das rasche Ausbleichen der Fluorochrome sowie die Möglichkeit, falsch-positive Ergebnisse durch Eigenfluoreszenzen zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Alexa-Fluorochrome verwendet, die sich durch eine hohe Fotostabilität und Fluoreszenzintensität, deutliche pH-Stabilität sowie eine geringe Hintergrundanfärbung auszeichnen. Da jedes Fluorochrom über ein eigenes Exzitations-/Absorptions- und Emissionsspektrum verfügt, ist für Doppelmarkierungen eine bestimmte Kombination von Fluoreszenzfiltern (Mehrfachfluoreszenzfilter) notwendig.

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen immunhistochemischen Färbungen wurden in Gefriertechnik durchgeführt. Für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurde das Tumorgewebe von fünf Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom untersucht. Das Gewebe wurde von der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Als Positivkontrolle für den Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD14 wurde ein Gewebe gewählt, in dem in ausreichendem Ausmaß CD14 positive Zellen nachweisbar sind und in welchem der Anti-CD14-Antikörper mit sehr hoher Spezifität bindet. Es kamen dabei Tonsillae palatinae von gesunden Patienten zur Anwendung, die von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden. Als Positivkontrolle für den Antikörper gegen CD56 dienten NK-Zellen, die durch magnetische Zellsortierung aus PBMCs gewonnen wurden und nach Ausstrich und Fixierung mit -20°C kaltem Aceton einer immunhistochemischen Färbung mit dem zu testendem Antikörper unterzogen wurden. Des Weiteren wurden bei allen immunhistochemischen Versuchen begleitend Negativkontrollen durchgeführt, bei denen die Gefrierschnitte lediglich mit TBS-T ohne den entsprechenden Primärantikörper inkubiert wurden.

Zur Kryokonservierung wurde das Gewebe über flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Gewebekleber auf einem Halter fixiert. Am Kryostat wurden anschließend von den gefrorenen Gewebeblöcken 7 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Es wurden jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten luftgetrocknet. Die Objektträger wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Vor Beginn der Färbung wurden die Objektträger für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend folgte eine Fixierung der Kryostatschnitte für 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton und eine erneute Trocknung für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

2.2.9 LSAB-Methode

Nach Kryokonservierung und Gewebefixierung mit Aceton erfolgte eine Umrandung der Kryostatschnitte mit einem Fettstift (DAKO-Pen) mit anschließendem 5-minütigem Waschgang in einem TBS-T-Pufferbad. Der Puffer wurde abgeklopft und die überschüssige Flüssigkeit mit Zellstoff abgewischt. Anschließend wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt, die Kryoschnitte mit Peroxidase-Block (DAKO *peroxidase blocking solution*) überschichtet und für 10 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte eine 60-minütige Inkubation unspezifischer Bindungsstellen mit 5%-igem NSS. Nach Abklopfen der Flüssigkeit folgte die Überschichtung der Schnitte mit jeweils 100 µl des verdünnten Primärantikörpers (*mouse anti-human*). Als Verdünnungsmittel diente eine Antikörperlösung mit Hintergrund-reduzierenden Inhaltsstoffen. Zur Ermittlung der optimalen Antikörperverdünnung wurden in Vorversuchen verschiedene Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten getestet. Beim Auftragen der Antikörper wurde auf einem Objektträger stets auf einem Schnitt die Färbung neben einer Negativkontrolle durchgeführt, um bei der Auswertung einen direkten Vergleich von spezifischer und unspezifischer Anfärbung zu ermöglichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Antikörper durch 5-minütiges Waschen in TBS-T entfernt. Im Anschluss daran folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Linkantikörper, *anti-mouse*) bei Raumtemperatur. Nach erneuter 5-minütiger TBS-T-Waschung

wurden die Objektträger für 30 Minuten mit Streptavidin-HRP inkubiert. Nach 5-minütigem Waschen in Pufferlösung wurden die Gewebeschnitte einer 2- bis 5-minütigen Inkubation mit DAB-Substratlösung (3,3'-Diaminobenzidin) unterzogen. Dabei wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle die braune Anfärbung beobachtet und die Inkubation durch Spülen mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) abgestoppt, sobald eine intensive Farbreaktion erreicht war. Anschließend erfolgte eine 1- bis 2-minütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin, welches im Anschluss unter fließendem Leitungswasser entfernt wurde. Abschließend wurden die Gewebeschnitte unter Verwendung eines wässrigen Eindeckmediums eingedeckt.

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung

Nach Herausnahme aus dem Kühlschrank wurden die Gefrierschnitte zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend folgte eine 15-minütige Fixierung der Gewebeschnitte mit 4% PFA. Es folgten drei Waschgänge mit PBS-T für jeweils 5 Minuten. Im Anschluss daran wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift umrandet, um ein Auslaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die anschließende Inkubation mit 5% NSS in PBS-T für 1 Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur diente der Minderung von unspezifischen Bindungsreaktionen im Gewebe. Nach Entfernen des Blockserums erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in der feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Dabei kamen simultan auf einem Gefrierschnitt der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD14 sowie der monoklonale Maus-Antikörper gegen CD56 in einer Verdünnung von 1:50 zur Anwendung. Bei den verwendeten Primärantikörpern handelte es sich um die in der konventionellen Immunhistochemie nach LSAB-Methode getesteten Antikörper. Als Verdünnungsmittel diente eine Antikörperlösung mit Hintergrund-reduzierenden Inhaltsstoffen. Bei jeder Immunfluoreszenzfärbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher der Primärantikörper ausgelassen und lediglich der Sekundärantikörper pipettiert wurde. Am nächsten Tag folgte ein dreimaliger Waschgang von jeweils 5 Minuten in PBS-T zur Entfernung nicht gebundener Primärantikörper. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur in

einer abgedunkelten feuchten Kammer. Als Sekundärantikörper kamen ein rot-fluoreszierender Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege (Alexa Fluor® 594 *goat anti-mouse* IgG) sowie ein grün-fluoreszierender Anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege (Alexa Fluor® 488 *goat anti-rabbit* IgG) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-T zur Anwendung. Der Sekundärantikörper war dabei gegen die Spezies gerichtet, in welcher der jeweilige Primärantikörper hergestellt worden ist. Nach einem Waschschrift mit PBS-T wurden die Gefrierschnitte zur Reduktion einer Autofluoreszenz des Gewebes einer 10-minütigen Inkubation in Sudanschwarz 0,3% in Ethanol unterzogen. Nachfolgend wurden die Objektträger zweimal kurz in 70% Ethanol und dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Abschließend wurden die Gefrierschnitte unter Verwendung eines DNA-Farbstoff-haltigen Eindeckmediums mit Anti-Fading-Eigenschaften eingedeckt. DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit ultravioletter Strahlung blau fluoresziert. Die Lagerung der gefärbten Gefrierschnitte erfolgte lichtgeschützt bei -20°C. Die Visualisierung der Fluoreszenzsignale erfolgte durch ein mit einer Digitalkamera verbundenes Keyence Mikroskop BZ8000.

2.2.11 Statistische Auswertung

Zur Berechnung von Signifikanzen wurde für die statistische Analyse die Software GraphPad Prism 3 verwendet. Dabei wurden Werte mit $p > 0,05$ als nicht signifikant, Werte mit $p < 0,05$ als signifikant, Werte mit $p < 0,01$ als sehr signifikant und Werte mit $p < 0,001$ als höchst signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden mit dem ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur auf statistische Signifikanz überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Anteil CD14⁺/CD56⁺ Monozyten im peripheren Blut

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden CD56⁺ DCs identifiziert, die Eigenschaften von NK-Zellen und somit zytotoxische Fähigkeiten aufweisen⁴⁴. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen war das Ziel dieser Arbeit, zu prüfen, ob CD14⁺/CD56⁺ Monozyten als mögliche Vorläuferzellen von CD56⁺ DCs im peripheren Blut sowie im Tumorgewebe vorliegen.

Für die Blutuntersuchungen wurden mononukleäre Zellen mit Anti-CD14- und Anti-CD56-Antikörpern gefärbt, durchflusszytometrisch quantifiziert und auf verschiedene Oberflächenmerkmale überprüft. Verglichen wurde hierbei das Blut von Tumorpatienten (n = 55) und einer gesunden Kontrollgruppe (n = 40). Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der PBMCs beider Gruppen zeigten sich deutliche Unterschiede. Eine repräsentative FACS-Analyse beider Probandengruppen ist in der Abb. 4 dargestellt. Nach Setzen eines *Gates* (R1) in der Streulichtanalyse (Abb. 1) erfolgte die Quantifizierung der Monozyten (CD14) und anschließend die durchflusszytometrische Analyse der CD14⁺/CD56⁺ doppelpositiven Zellen, in Abb. 4 Zellen im oberen, rechten Quadranten.

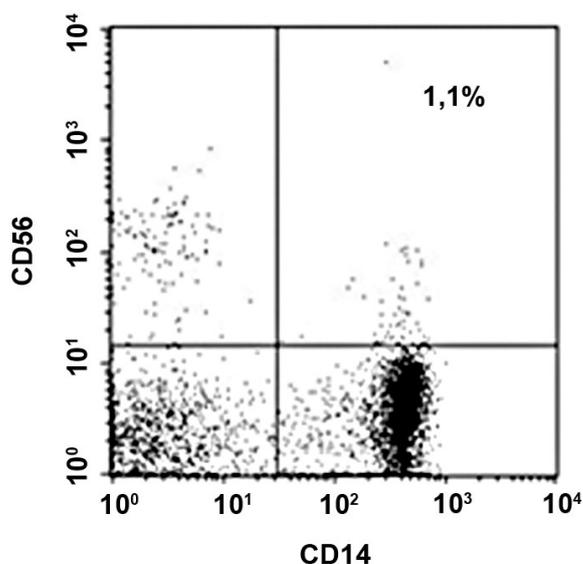


Abb. 4: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten. Nach Setzen eines *Gates* (R1) auf die Monozyten erfolgte die Quantifizierung der CD14⁺ und CD56⁺ Zellen. In den Quadranten finden sich oben links die CD56⁺ Zellen (NK-Zellen), unten rechts die CD14⁺ Monozyten und oben rechts die CD14⁺/CD56⁺ doppelpositiven Zellen.

In der Summe aller Analysen fand sich eine signifikant höhere Anzahl von CD14⁺/CD56⁺ Monozyten bei Patienten mit Malignomen verglichen mit gesunden Kontrollprobanden. Während bei Patienten mit Malignomen durchschnittlich 9,5 ± 1,6% CD14⁺/CD56⁺ doppelpositive Monozyten zu finden waren, ließen sich bei gesunden Probanden durchschnittlich 2,6 ± 0,3% doppelpositive Zellen messen (Abb. 5).

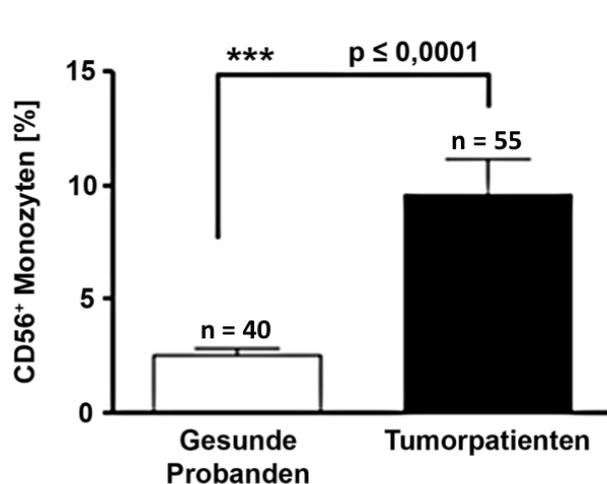


Abb. 5: Anteil CD14⁺/CD56⁺ Monozyten im peripheren Blut. Die phänotypische Untersuchung von PBMCs mittels Durchflusszytometrie zeigte eine signifikant höhere Anzahl von CD14⁺/CD56⁺ Monozyten bei Patienten mit Malignomen verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe.

Aufgrund einer unterschiedlichen Altersverteilung der Kontroll- und der Patientengruppe (mittleres Alter der gesunden Probanden 33,2 Jahre, mittleres Alter der Patienten mit Malignomen 60,1 Jahre) wurden die Daten der gesunden Probanden untereinander untersucht. Beim Vergleich der Messdaten älterer Probanden (Alter ≥ 50 Jahre, n = 7) mit den Daten jüngerer Probanden (Alter ≤ 25 Jahre, n = 8) zeigten sich ähnliche Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen (3,0 ± 1,5% und 2,5 ± 1,2% doppelpositive Monozyten). Des Weiteren wurden die Messergebnisse hinsichtlich gleichen Alters der Probanden verglichen (mittleres Alter der gesunden Probanden 33,2 ± 1,5 Jahre, n = 20; mittleres Alter der Tumorpatienten 33,3 ± 2,1 Jahre, n = 6). Während die gesunde Kontrollgruppe durchschnittlich 2,6% CD14⁺/CD56⁺ Monozyten aufwies, zeigten sich bei Tumorpatienten 8,8% (p = 0,0168) doppelpositive Zellen. Altersabhängige Unterschiede konnten somit ausgeschlossen werden. Bei den eingeschlossenen Patienten mit Malignomen

handelte es sich sowohl um solide Tumoren als auch um hämatologische Erkrankungen. Die unterschiedlichen Diagnosen und Patientenzahlen können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Eingeschlossene Tumorentitäten, Geschlecht und Alter der Patienten sowie gemessene Anzahl CD14⁺/CD56⁺ Monozyten.

	Anzahl Patienten (n)	Weiblich/Männlich (n/n)	Mittleres Alter (Jahre)	CD14 ⁺ /CD56 ⁺ Monozyten (% aller Monozyten ± SD)
Gesunde Kontrollgruppe	40	20/20	33,2	2,6 ± 0,3
Tumorpatienten	55	26/29	60,1	9,5 ± 1,6
Solide Tumoren	18	4/14		
Endokrine Tumoren	13	2/11	66,5	13,8 ± 4,9
Neuroendokriner Tumor des GIT	4	1/3		
Nebennierenkarzinom	2	0/2		
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	5	1/4		
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	2	0/2		
Nicht-endokrine Tumoren	5	2/3	65,6	9,2 ± 2,3
Kolonkarzinom	2	0/2		
Liposarkom	1	1/0		
Plattenepithelkarzinom	1	1/0		
CUP-Syndrom	1	0/1		
Hämatologische Erkrankungen	37	21/16	59,4	8,0 ± 1,8
Multiples Myelom	18	9/9		
Myelodysplastisches Syndrom	4	3/1		
Akute Leukämie	6	5/1		
Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom	7	2/5		
Chronisch myeloproliferative Erkrankung	2	2/0		

Eine detaillierte Analyse der Tumorsubgruppen zeigte bei Patienten mit endokrinen Tumoren ($13,8 \pm 4,9\%$) ähnliche Resultate wie bei anderen soliden, nicht-endokrinen Tumoren ($9,2 \pm 2,3\%$) (Abb. 6).

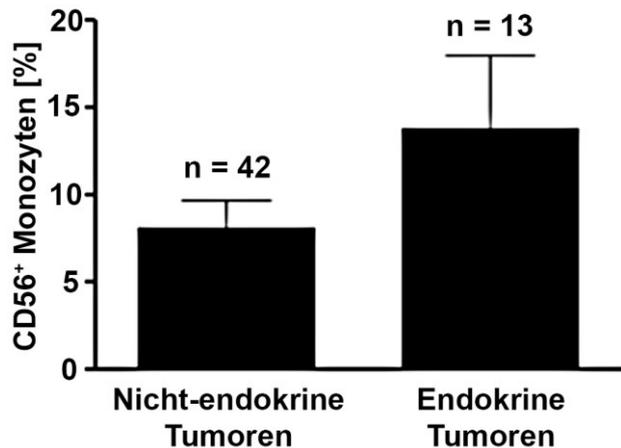


Abb. 6: Anteil CD14⁺/CD56⁺ Monozyten im peripheren Blut von Patienten mit soliden Tumoren. Die Anzahl von CD14⁺/CD56⁺ Monozyten bei Patienten mit nicht-endokrinen Tumoren war nicht signifikant unterschiedlich zu endokrinen Tumoren.

Zu den eingeschlossenen Tumorentitäten der Gruppe der endokrinen Tumoren zählten das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (n = 2), neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes (GIT) (n = 4), das Nebennierenkarzinom (n = 2) sowie das papilläre Schilddrüsenkarzinom (n = 5).

Auffällig war eine weite Messbreite der doppelpositiven Zellen bei endokrinen Tumoren von 0,2% bis hin zu 53,5% (Tabelle 6). Bei der Mehrzahl der Patienten mit endokrinen Tumoren konnte jedoch eine erhöhte Anzahl doppelpositiver Zellen nachgewiesen werden. So waren bei 8 von 13 Patienten (61,5%) mehr als 5% aller Monozyten positiv für CD56. Bei sechs der Patienten konnten sogar über 10% der Monozyten mit dieser Eigenschaft detektiert werden. Die höchsten Werte wurden bei Patienten mit einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom gemessen (53,5% und 33,2% CD14⁺/CD56⁺ Zellen, Patient Nr. 10 und 13). Ein weiterer Patient mit einem hohen Wert doppelpositiver Zellen litt unter einem neuroendokrinen Tumor des Gastrointestinaltraktes (22,2% doppelpositive Zellen, Patient Nr. 7).

Tabelle 6: Detaillierte Auflistung der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten bei Patienten mit endokrinen Tumoren. Durchflusszytometrische Analysen zeigten eine weite Breite von 0,2% bis zu 53,5% CD14⁺/CD56⁺ Monozyten.

Patienten mit endokrinen Tumoren	Diagnose	CD14⁺/CD56⁺ Monozyten (% aller Monozyten)
Patient 1	Nebennierenkarzinom	4,2
Patient 2	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	2,9
Patient 3	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	0,8
Patient 4	Neuroendokriner Tumor des GIT	0,2
Patient 5	Neuroendokriner Tumor des GIT	1,0
Patient 6	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	17,2
Patient 7	Neuroendokriner Tumor des GIT	22,2
Patient 8	Nebennierenkarzinom	9,6
Patient 9	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	12,4
Patient 10	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	53,5
Patient 11	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	9,8
Patient 12	Neuroendokriner Tumor des GIT	12,4
Patient 13	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	33,2

Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein CD14⁺/CD56⁺ doppelpositiver Zellen und der Tumorlast gezeigt werden. Bei allen Patienten mit einer hohen Anzahl doppelpositiver Zellen handelte es sich um fortgeschrittene Tumorstadien mit Vorliegen einer ausgedehnten Metastasierung (insbesondere Leber-, Knochen- und Lungenmetastasen). Demgegenüber konnten bei nur vier von acht Patienten mit geringer Tumorlast erhöhte Mengen CD14⁺/CD56⁺ doppelpositiver Zellen detektiert werden.

Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (Krankheitsentitäten siehe Tabelle 5) besaßen eine ähnlich hohe Anzahl doppelpositiver Zellen wie Patienten mit soliden Tumoren ($8,0 \pm 10,8\%$ vs. $12,5 \pm 13,2\%$, $p = 0,1851$). Besonders hohe Werte konnten bei Patienten mit multiplen Myelom (Plasmozytom) sowie bei akuten Leukämien gemessen werden. Bei Analyse des Krankheitsstatus konnte festgestellt werden, dass Patienten mit multiplen

Myelom mit Progress der Erkrankung eine tendenziell höhere Anzahl doppelpositiver Monozyten aufwiesen als Patienten, die sich in Remission befanden (10,5% vs. 4,6%, Abb. 7).

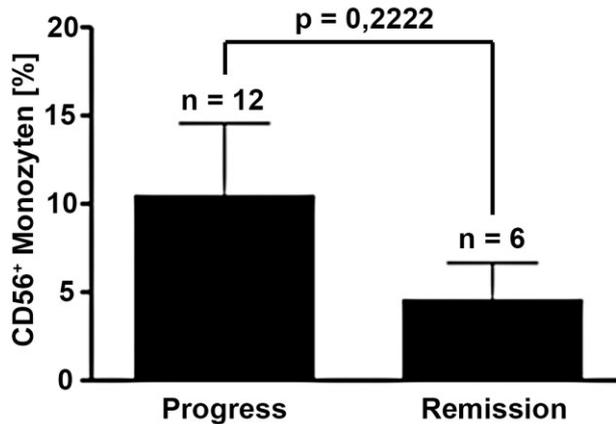


Abb. 7: CD14⁺/CD56⁺ Monozyten bei Patienten mit Plasmozytom. Bei Patienten mit Progress konnten höhere Zahlen doppelpositiver Zellen festgestellt werden (10,5%) als bei Patienten in Remission (4,6%).

Bei der Gegenüberstellung von soliden und hämatologischen Malignomen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 8).

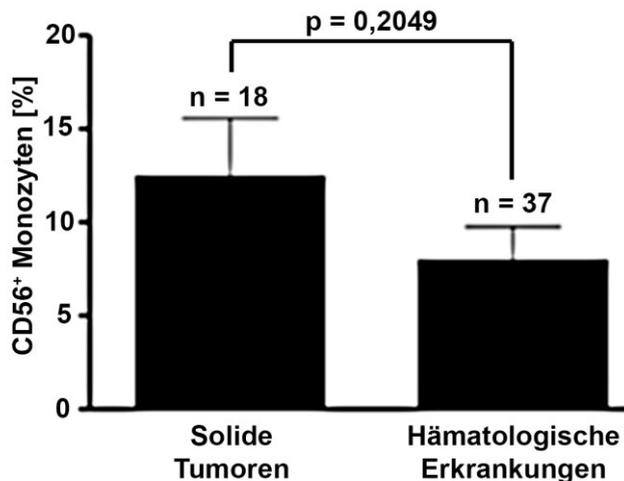


Abb. 8: CD14⁺/CD56⁺ Monozyten bei Patienten mit soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen. Bei der Gegenüberstellung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2 Phänotypisierung der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten

3.2.1 NK-Zell-Oberflächenmarker

Zur genaueren Phänotypisierung der CD14⁺/CD56⁺ co-exprimierenden Zellen schlossen sich weiterführende durchflusszytometrische Untersuchungen an. Hierbei wurden verschiedene Oberflächenmoleküle untersucht, die charakteristischerweise auf DCs oder NK-Zellen zu finden sind (Tabelle 4). Bei der Untersuchung der Expression verschiedener NK-Zell-Oberflächenmarker wurden jeweils Vertreter einzelner NK-Rezeptorsubgruppen analysiert, wie CD16, CD161, CD337, CD94 (NKG2A), CD314 (NKG2D), CD159a sowie TRAIL. Abb. 9 zeigt eine repräsentative Analyse einer solchen Untersuchung.

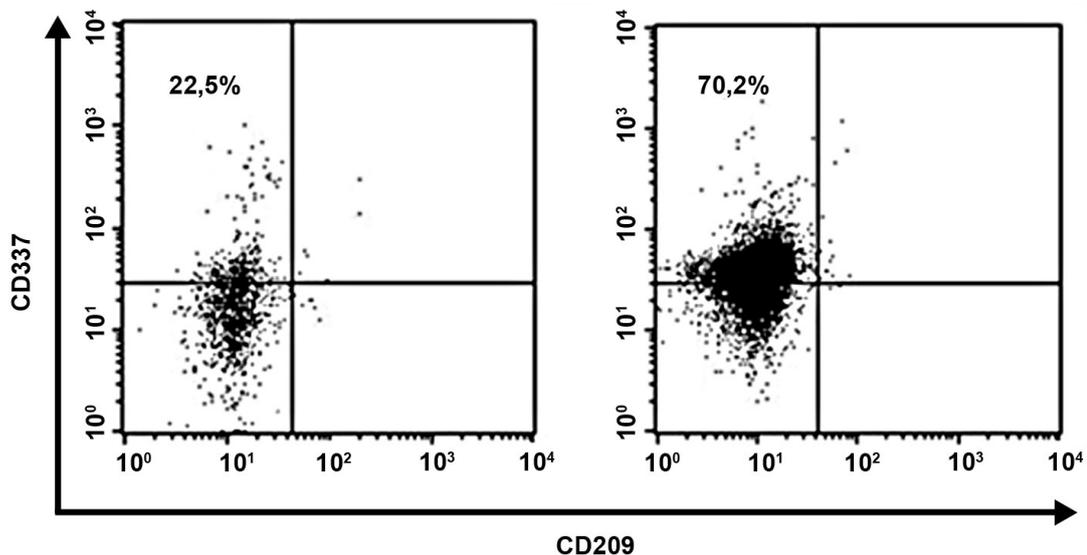


Abb. 9: Beispiel einer FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD209 und CD337. CD14⁺/CD56⁺ Monozyten wurden nach Setzen der Quadranten anhand der Isotyp- und Positivkontrollen auf die Expression verschiedener NK-Zell- und DC-Marker untersucht.

Bei der Untersuchung der für NK-Zellen typischen Oberflächenmarker fand sich eine große Variabilität in der Ausprägung. Bei den untersuchten Tumorpatienten waren durchschnittlich $15,9 \pm 2,1\%$ der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten ebenfalls positiv für den NK-Zell-Marker CD16, während bei gesunden Probanden $21,2 \pm 2,9\%$ dieser Zellen den Oberflächenmarker CD16 exprimierten (Abb. 10). Weitere Unterschiede konnten bezüglich des NK-Zell-Markers CD337 erhoben werden. Bei Tumorpatienten waren durchschnittlich

56,8 ± 4,6% der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten ebenfalls positiv für CD337, während bei gesunden Probanden nur 39,3 ± 5,2% eine Positivität für diesen Oberflächenmarker zeigten (p = 0,015). Andere NK-Zell-spezifische Oberflächenmarker (z.B. CD161 und CD94) konnten auf den untersuchten Zellen nur in geringem Ausmaß nachgewiesen werden (Abb. 10). Nur bei CD314 (NKG2D), bei CD337 und bei TRAIL konnten signifikante Unterschiede gezeigt werden.

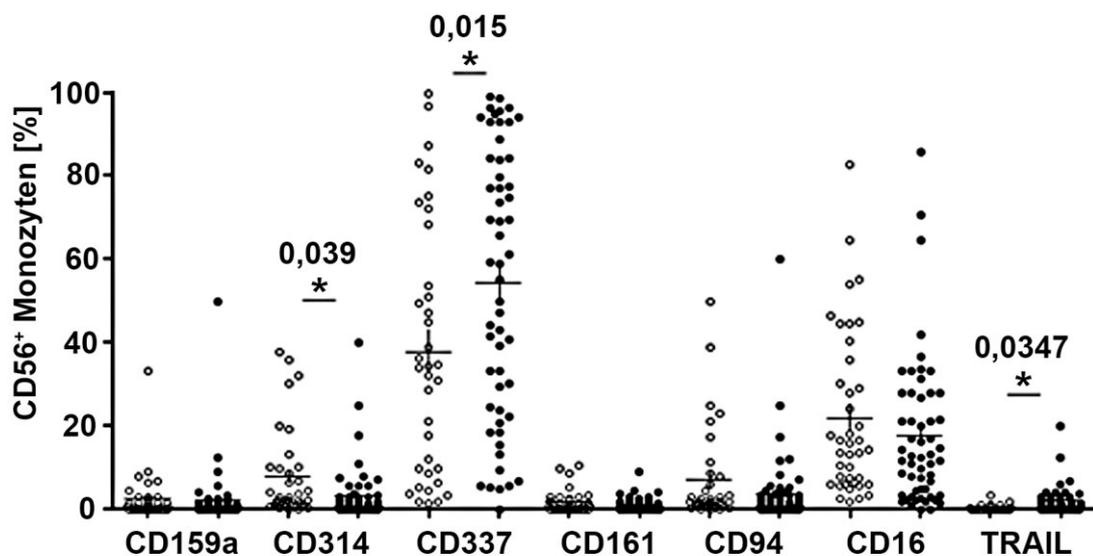


Abb. 10: Expression von NK-Zell-Oberflächenmarkern auf CD14⁺/CD56⁺ Monozyten. Die große Streuung der Expression der NK-Rezeptoren von Tumorpatienten (schwarz) und gesunden Probanden (weiß) wurden in einem Plot gegenübergestellt. CD16, CD314 und CD94 waren bei Tumorpatienten vermindert, CD337 vermehrt exprimiert. Bei CD314, CD337 und TRAIL konnten signifikante Unterschiede in der Expression nachgewiesen werden.

3.2.2 Oberflächenmarker dendritischer Zellen

Analysiert wurden co-stimulatorische Moleküle wie CD80, CD86, CD1a, CD40 und CD83 sowie verschiedene spezifische Marker für plasmazytoide DCs (CD123, BDCA-2/CD303) bzw. myeloide DCs (CD209, BDCA-1/CD1c).

Die Messungen zeigten sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Probanden einen vergleichbar hohen Anteil an CD86 und HLA-DR (> 92%). Darüber hinaus konnte keine erhöhte Expression der anderen co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD83 festgestellt werden. Ebenso waren spezifische Marker für plasmazytoide oder myeloide DCs nicht signifikant höher exprimiert (< 5%).

Abb. 11 zeigt die Analyse und den Vergleich der Zellen von Tumorpatienten und gesunden Probanden.

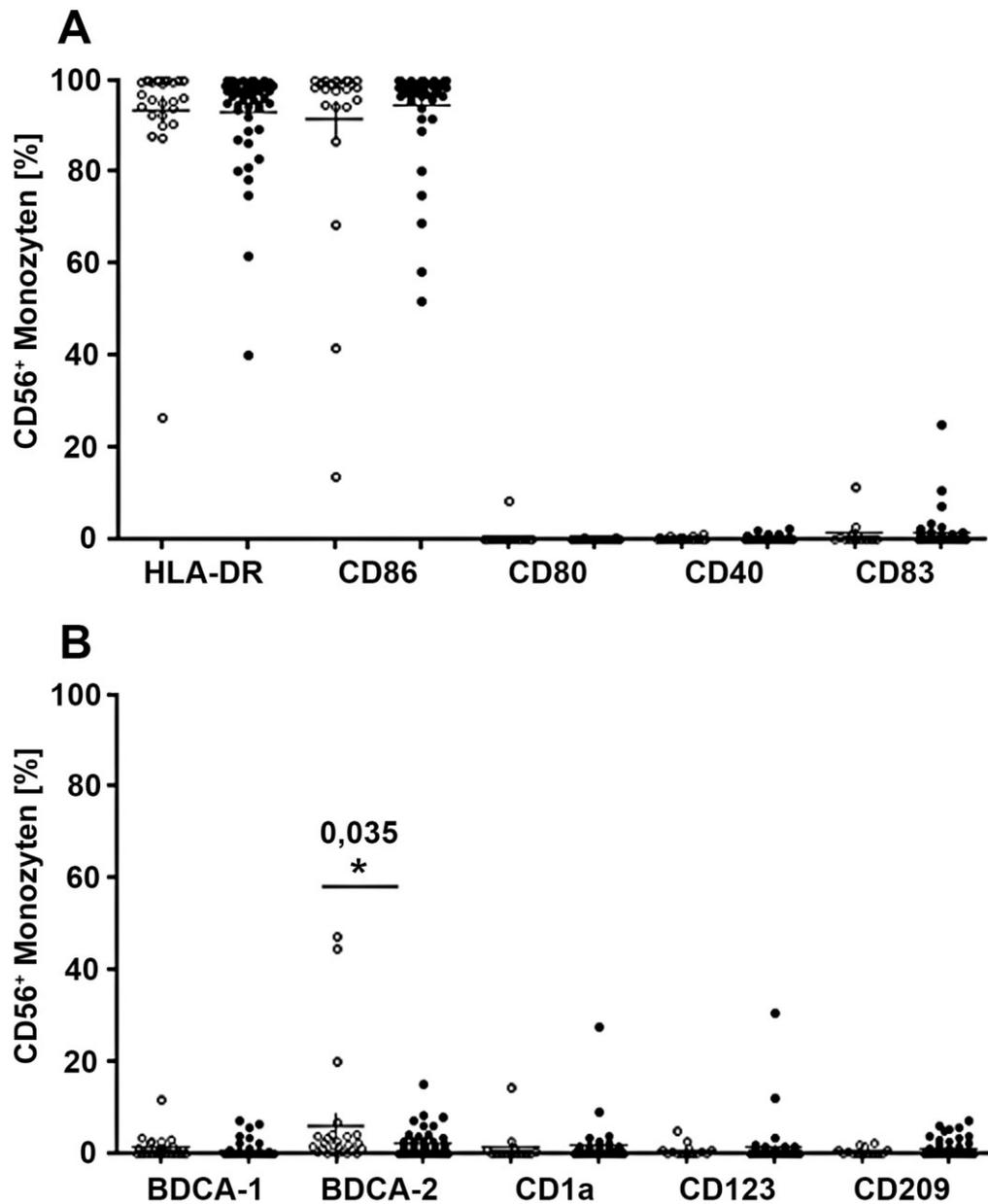


Abb. 11: Expression von DC-Oberflächenmarkern auf CD14⁺/CD56⁺ Monozyten. (A, B) Die individuelle Expression der Rezeptoren und co-stimulatorischen Moleküle von Tumorpatienten (schwarz) und gesunden Probanden (weiß) wurden in einem Plot zusammengefügt. Spezifische Marker für plasmazytoide oder myeloide DCs waren mit Ausnahme von BDCA-2 nicht signifikant höher exprimiert (< 5%).

3.3 Funktionelle Analysen von CD14⁺/CD56⁺ Monozyten

3.3.1 Apoptosedetektion

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass Monozyten die Fähigkeit zur direkten zytolytischen Aktivität besitzen⁴⁵. Um diese funktionelle Eigenschaft bei den CD14⁺/CD56⁺ Monozyten zu untersuchen, erfolgte die Durchführung eines Apoptose-Assays mit der Sichtbarmachung apoptotischer Zellen (Anti-Annexin-FITC) sowie toter Zellen (Propidiumiodid) mit der Analyse frühapoptotischer (Annexin-positiver) und spätapoptotischer (PI-positiver) Zellen. Dazu wurden Jurkat-Zellen als Targetzellen mit frisch isolierten und IFN- α -stimulierten Monozyten inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Färbung mit dem Apoptoseinduktor Camptothecin. In Abbildung 12 ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse dargestellt.

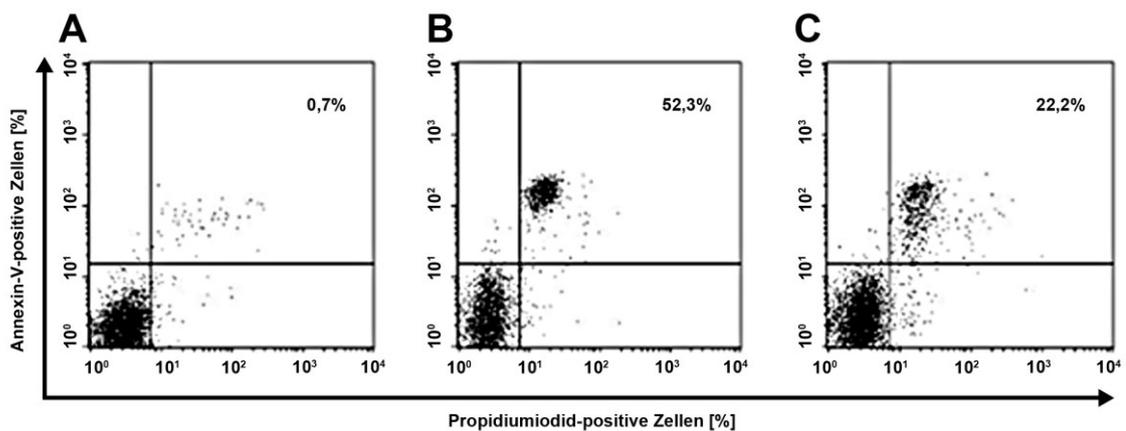


Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse einer Annexin-V-Färbung. (A) Die Färbung der unbehandelten Jurkat-Targetzellen weist nur wenige spätapoptotische Zellen auf. (B) Als Positivkontrolle diente der Apoptoseinduktor Camptothecin (6 μ M für 4 Stunden bei 37°C). (C) Eine repräsentative Färbung nach Co-Inkubation mit IFN- α -stimulierten Monozyten zeigt lediglich spätapoptotische Zellen (22,2% Annexin-V- und Propidiumiodid-positiv).

In den durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass frisch isolierte CD14⁺/CD56⁺ Monozyten eine Apoptoseinduktion von $5,0 \pm 0,3\%$ aller Targetzellen bewirken konnten (Abb. 13). Dies stellte eine signifikant höhere Apoptoseinduktion verglichen mit der spontanen Apoptoserate von $2,5 \pm 0,5\%$ bei Jurkat-Zellen dar. Eine vorherige Stimulation der Monozyten durch

Hinzugabe von IFN- α erhöhte die Apoptoseinduktion auf $19,8 \pm 4,7\%$ ($p = 0,0065$).

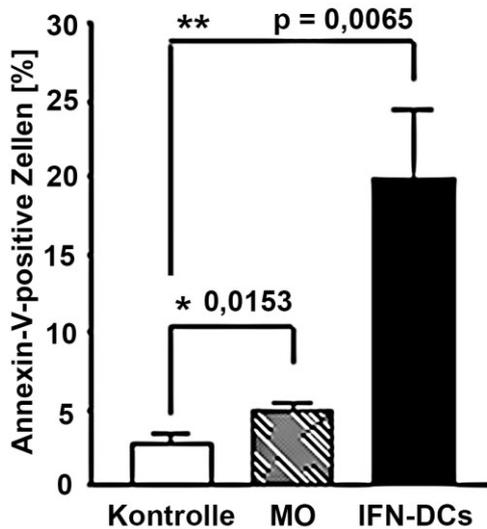


Abb. 13: Apoptose-Nachweis mittels Annexin-V-Färbung. In einer Co-Kultivierung mit Jurkat-Zellen wurde die zytotoxische Aktivität von frisch isolierten Monozyten (Mo) sowie von mit IFN- α stimulierten Monozyten (IFN-DCs) verglichen. Als Kontrolle diente die spontane Apoptoserate dieser Zellen. Die Co-kultivierung mit Monozyten konnte die Apoptoseinduktion signifikant erhöhen, insbesondere durch Stimulation der Monozyten mit IFN- α .

3.3.2 Bestimmung der zytolytischen Aktivität

Zur weiterführenden funktionellen Charakterisierung und Ermittlung der zytotoxischen Aktivität der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten wurde ein ⁵¹Chrom-Freisetzungstest durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit fungierten K562-Zellen und PC3-Zellen als Targetzellen. Als Effektorzellen dienten frisch isolierte oder mit IFN- α stimulierte Monozyten. Nach Markierung der Targetzellen mit radioaktivem ⁵¹Chrom erfolgte die Co-Kultivierung und eine Quantifizierung der spezifischen Zytotoxizität durch Messung des freigesetzten Chroms. Aufgrund ihrer Sensitivität für TRAIL und Fas-Ligand waren insbesondere die PC3-Zellen von Interesse⁴⁶. PC3-Zellen wurden mit frisch isolierten Monozyten und mit IFN- α -stimulierten Monozyten in verschiedenen Effektor-Target-Verhältnissen (80:1, 40:1, 20:1) zusammengebracht ($n = 3$). Hierbei zeigte sich nach Co-Kultivierung der PC3-Zellen mit IFN- α -stimulierten Monozyten eine starke, dosisabhängige Zytolyse von bis zu $20,9 \pm 3,3\%$ (Abb. 14, Effektor-Target-Verhältnis von 80:1). Der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest von frisch isolierten CD14⁺/CD56⁺ Monozyten hat keine direkte Zytolyse nachweisen können (Abb. 14).

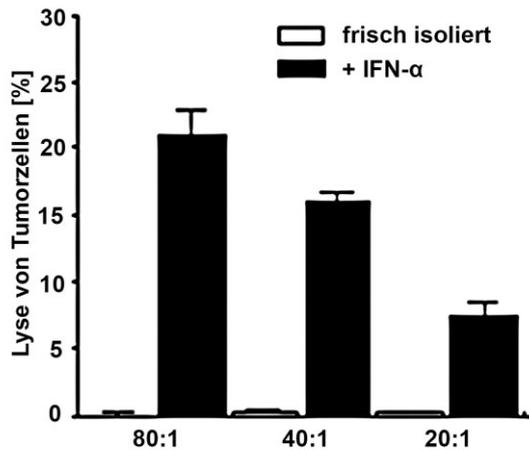


Abb. 14: Zytotoxizitätsnachweis mittels ^{51}Cr -Freisetzungstest. PC3-Zellen wurden mit frisch isolierten Monozyten und mit IFN- α -stimulierten Monozyten in unterschiedlichen Effektor-Target-Verhältnissen zusammengebracht ($n = 3$). Eine Stimulation der Monozyten mit IFN- α bewirkte eine deutliche Zunahme der zytotoxischen Fähigkeit auf bis zu $20,9 \pm 3,3\%$. Bei den frisch isolierten Monozyten konnte hingegen keine direkte Zytolyse der Targetzellen festgestellt werden.

3.3.3 Analyse der co-stimulatorischen Moleküle und T-Zell-Aktivierung

Wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, weisen CD56^+ DCs eine erhöhte T-Zell-stimulierende Kapazität auf⁴⁴. Zur Stimulation von T-Zellen spielen co-stimulatorische Moleküle eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der funktionellen Charakterisierung der $\text{CD14}^+/\text{CD56}^+$ Monozyten eine Analyse der Oberflächenmarker – insbesondere der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 – vor und nach Stimulation mit IFN- α durchgeführt. In den durchflusszytometrischen Messungen konnte gezeigt werden, dass mit IFN- α stimulierte Monozyten eine deutlich erhöhte Expression von CD80 und CD86 aufwiesen (Abb. 15). Beim Oberflächenmarker CD80 zeigte sich nach Stimulation mit IFN- α ein 3,8-facher Anstieg der Fluoreszenzintensität von $113,8 \pm 21,5$ zu $431,5 \pm 42,7$ ($p = 0,0314$, Abb. 15). Für CD86 konnte nach Stimulation mit IFN- α ein 5,1-facher Anstieg der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, mit Zunahme von $201,1 \pm 30,2$ auf $1043 \pm 132,9$ ($p = 0,0005$).

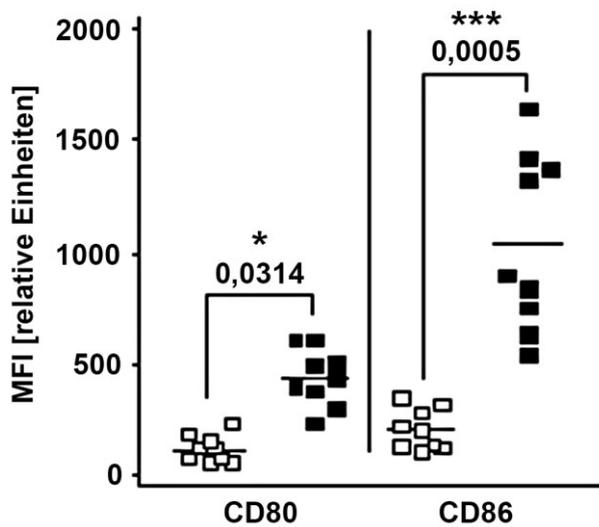


Abb. 15: Expression der co-stimulatorischen Moleküle vor und nach Stimulation mit IFN- α . Eine Stimulation der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten mit IFN- α (1000 U/ml für 18h) bewirkte einen Anstieg der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, dargestellt als sich erhöhende mittlere Fluoreszenzintensität (MFI).

3.4 Immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebeschnitten

Da immunologische Reaktionen im Rahmen der natürlichen Anti-Tumor-Immunantwort insbesondere beim papillären Schilddrüsenkarzinom beobachtet wurden, kamen in der vorliegenden Arbeit für die immunhistochemischen Färbungen Gewebeschnitte von Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom zur Anwendung (Abb. 16 A, B).

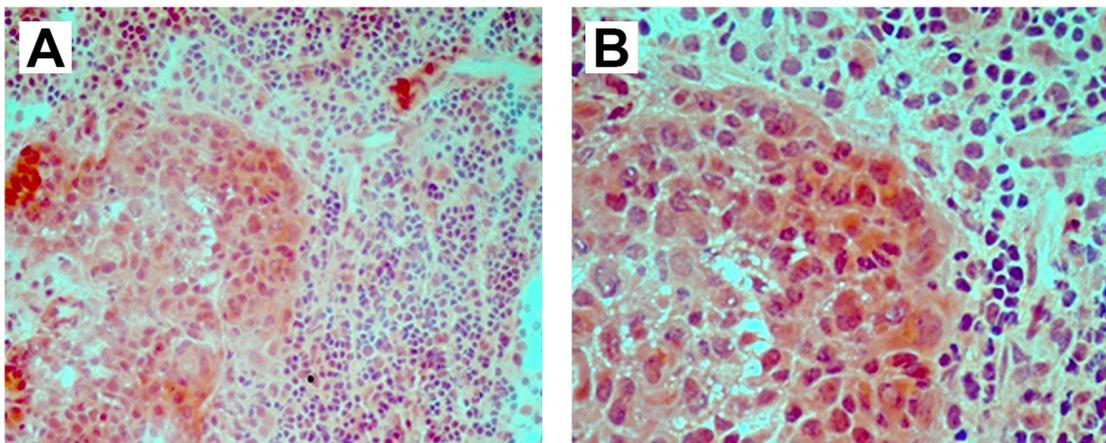


Abb. 16: HE-Färbung eines papillären Schilddrüsenkarzinompräparates. 7 μ m Schnitte eines kryokonservierten Präparates wurden mit Hämatoxylin gefärbt und in 400x (A) und in 800x Vergrößerung (B) aufgenommen.

Wie in den Abbildung 17 und 18 gezeigt, ließ sich in allen Tumorgewebeschnitten eine ausgeprägte Infiltration mit CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen darstellen. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde der blau fluoreszierende Farbstoff DAPI angewendet.

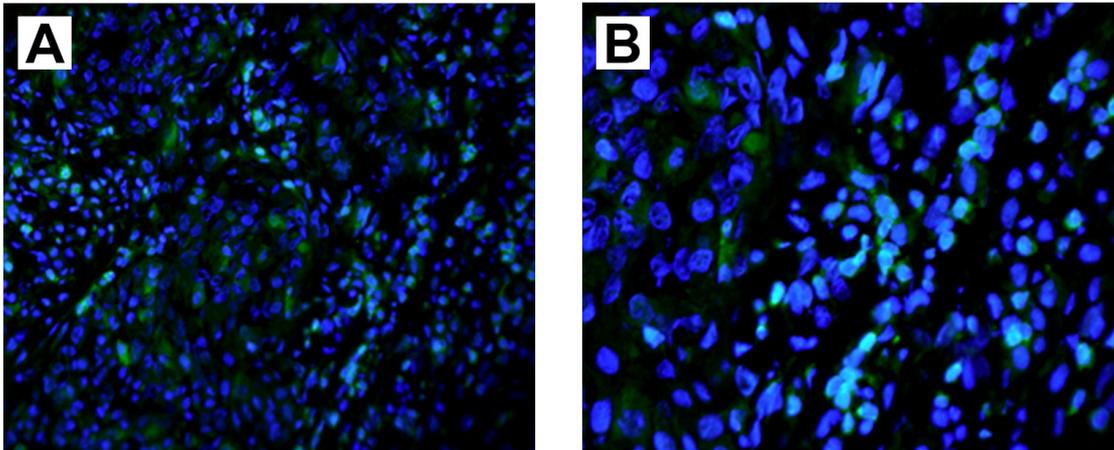


Abb. 17: Konfokalmikroskopische Darstellung CD3-positiver Zellen im Gewebepreparat eines papillären Schilddrüsenkarzinoms. 7 µm-Schnitte eines kryokonservierten Präparates wurden mit einem grün-markierten Anti-CD3-Antikörper inkubiert und danach mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Konfokal-Fluoreszenzmikroskops in 400x (A) und 800x Vergrößerung (B) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm und wurden zeitgleich elektronisch zusammengeführt.

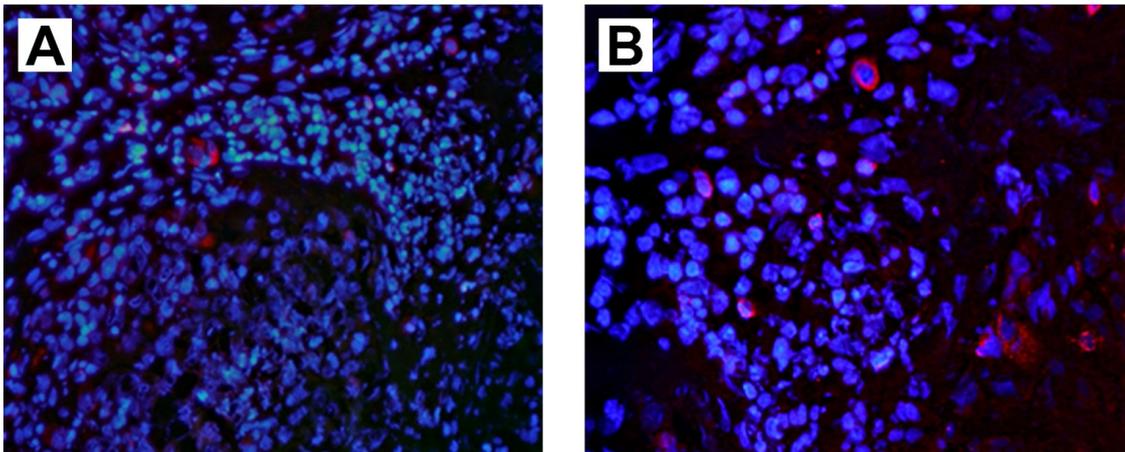


Abb. 18: Konfokalmikroskopische Darstellung CD8-positiver Zellen im Gewebepreparat eines papillären Schilddrüsenkarzinoms. 7 µm-Schnitte eines kryokonservierten Präparates wurden mit einem rot-markierten Anti-CD8-Antikörper inkubiert und danach mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Konfokal-Fluoreszenzmikroskops in 400x (A) und 800x Vergrößerung (B) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 594$ nm und wurden zeitgleich elektronisch zusammengeführt.

Um zu untersuchen, ob sich CD14⁺/CD56⁺ doppelpositive Zellen ebenfalls im Tumorgewebe nachweisen lassen, erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-CD14- (Abb. 19) und Anti-CD56-Primärantikörpern (Abb. 20) sowie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörpern. Als Sekundärantikörper kamen ein rot-fluoreszierender Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege sowie ein grün-fluoreszierender Anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege zur Anwendung.

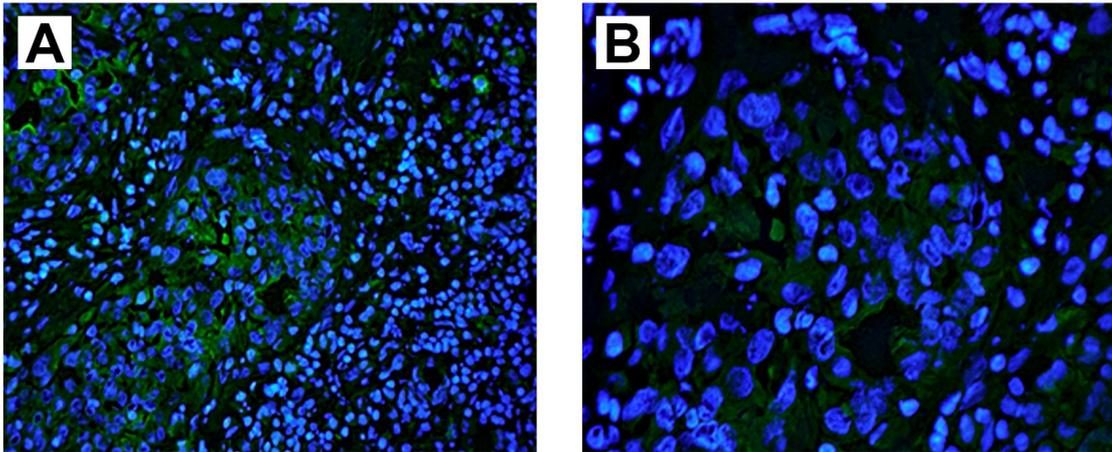


Abb. 19: Konfokalmikroskopische Darstellung CD14-positiver Zellen im Gewebepreparat eines papillären Schilddrüsenkarzinoms. Schnitte eines kryokonservierten Präparates wurden mit einem grün-markierten Anti-CD14-Antikörper inkubiert und danach mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Konfokal-Fluoreszenzmikroskops in 400x (A) und 800x Vergrößerung (B) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm und wurden zeitgleich elektronisch zusammengeführt.

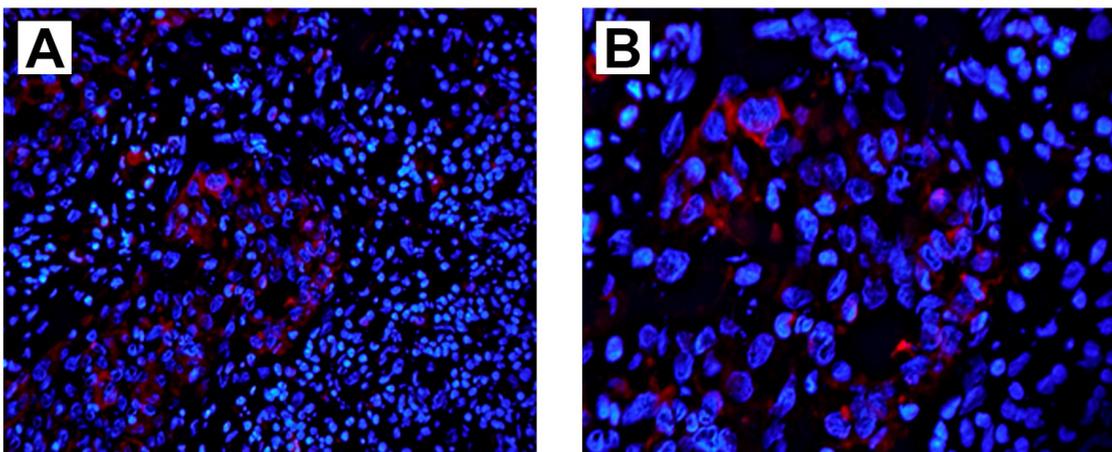


Abb. 20: Konfokalmikroskopische Darstellung CD56-positiver Zellen im Gewebepreparat eines papillären Schilddrüsenkarzinoms. Schnitte eines kryokonservierten Präparates wurden mit einem rot-markierten Anti-CD56-Antikörper inkubiert und mit DAPI gegengefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Konfokal-Fluoreszenzmikroskops in 400x (A) und 800x Vergrößerung (B) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 594$ nm und wurden zeitgleich elektronisch zusammengeführt.

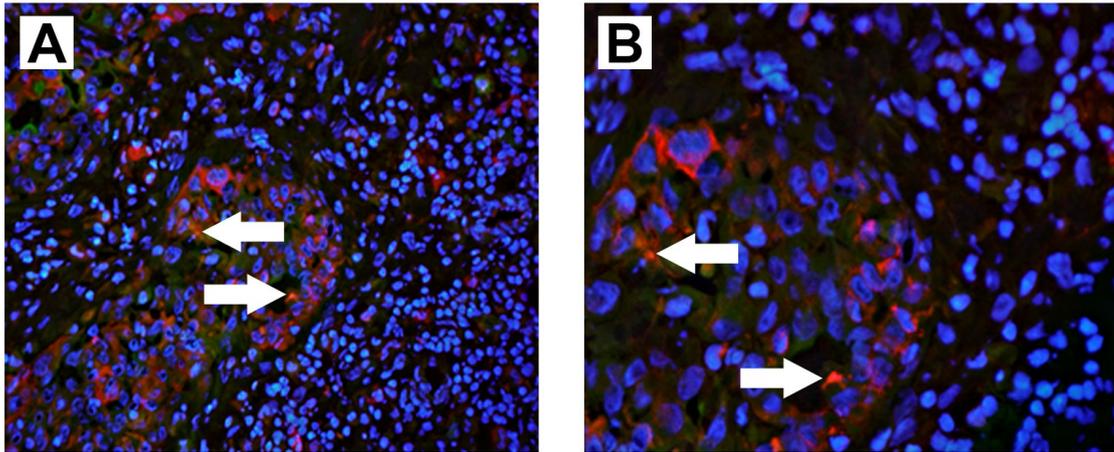


Abb. 21: Konfokalmikroskopische Darstellung $CD14^+/CD56^+$ Zellen im Gewebepreparat eines papillären Schilddrüsenkarzinoms. Schnitte eines kryokonservierten Präparates wurden mit einem grün-markierten Anti-CD14-Antikörper, einem rot-markierten Anti-CD56-Antikörper und DAPI gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten in 400x (**A**) und 800x Vergrößerung (**B**) und wurden zeitgleich elektronisch zusammengeführt. Die Pfeile zeigen die $CD14^+/CD56^+$ doppelpositiven Zellen.

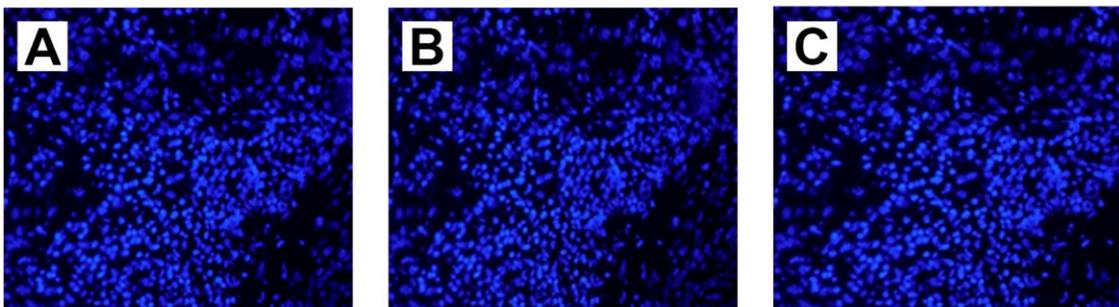


Abb. 22: Ermittlung der unspezifischen Färbung (Negativkontrollen). Parallelschnitte wurden mit den Sekundärantikörpern Anti-rabbit-488 (**A**), Anti-mouse-594 (**B**) und Anti-rabbit-594 (**C**) und zur Sichtbarmachung der Zellen mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. (Vergrößerung: 400x). Es konnten keine unspezifischen Färbungen detektiert werden.

Die in Abbildung 21 (A, B) dargestellten Fluoreszenzaufnahmen zeigen $CD14^+/CD56^+$ Monozyten nach Markierung mit rot- und grünfluoreszierenden Sekundärantikörpern sowie dem blau fluoreszierenden DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Es konnte eine erhöhte Anzahl $CD14^+/CD56^+$ doppelpositiver Zellen im Tumorgewebe insbesondere in direkter Nähe von Tumorzellen nachgewiesen werden, welche in den vorliegenden Aufnahmen durch eine Überlappung der Fluoreszenzen eine Orangefärbung zeigten (Abb. 21). Durch die mitgeführten Negativkontrollen konnten durch Inkubation mit den verwendeten Sekundärantikörpern unspezifische Färbereaktionen ausgeschlossen werden (Abbildung 22); hier wurden durch Anwendung von DAPI lediglich die Zellkerne blau gefärbt.

4 Diskussion

Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten erstmalig CD56⁺ DCs identifizieren, die Eigenschaften von NK-Zellen und damit zytotoxische Fähigkeiten aufweisen⁴⁴. In der vorliegenden Arbeit galt es, CD14⁺/CD56⁺ Monozyten im peripheren Blut und Tumorgewebe zu erfassen und ihre Rolle zu untersuchen. Hierzu wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut von Tumorpatienten sowie von gesunden Probanden nach Färbung mit Anti-CD14- und Anti-CD56-Antikörpern durchflusszytometrisch quantifiziert und auf verschiedene charakteristische Oberflächenmoleküle von DCs und NK-Zellen untersucht. Des Weiteren wurden im Rahmen von funktionellen Analysen Annexin-Apoptose-Assays sowie ⁵¹Chrom-Freisetzungstests zur Zytotoxizitätsbestimmung durchgeführt. Durch immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten von Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom konnte geprüft werden, ob CD14⁺/CD56⁺ Monozyten ins Tumorgewebe einwandern und dort gegebenenfalls eine Immunantwort induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Tumorpatienten im peripheren Blut eine signifikant höhere Anzahl von CD14⁺/CD56⁺ Monozyten aufweisen als gesunde Kontrollprobanden. Der Anteil doppelpositiver Monozyten im Blut von Patienten war allerdings keiner besonderen Tumorentität zuzuschreiben. Bei Patienten mit soliden Tumoren fanden sich weder Unterschiede zwischen endokrinen und anderen Tumoren, noch gab es einen signifikanten Unterschied zu Patienten mit hämatologischen Erkrankungen. Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Anzahl CD14⁺/CD56⁺ Monozyten und der Tumorlast festgestellt werden. Bei allen Patienten mit einer hohen Anzahl doppelpositiver Zellen handelte es sich um ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Vorliegen einer ausgedehnten Metastasierung. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die untersuchten Zellen im Rahmen eines neoplastischen Geschehens eine wichtige Rolle einnehmen könnten.

Die Phänotypisierung der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten ergab sowohl bei den Tumorpatienten als auch den gesunden Probanden eine große Streuung der Expression von Reifungsmarkern dendritischer Zellen sowie von NK-Rezeptoren. Hinsichtlich der DC-Marker zeigte sich bei beiden untersuchten

Gruppen, also auch bei gesunden Probanden, ein vergleichbar hoher Anteil von nahezu 100% an CD86 und HLA-DR. Darüber hinaus wurde keine erhöhte Expression anderer co-stimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD83) festgestellt, einschließlich spezifischer Marker für plasmazytoide (CD123, BDCA-2/CD303) oder myeloide DCs (CD209, BDCA-1/CD1c).

Monozyten (CD14⁺) stellen eine Zellpopulation dar, die im peripheren Blut als Vorläuferzellen verschiedener Immunzellen gelten. Durch Kontakt mit diversen Zytokinen und/oder Antigenen reifen unterschiedliche aktive Immunzellen heran. Zum Beispiel gelten CD16⁺ Monozyten gegenüber CD16⁻ Monozyten als „reifer“, weil sie schneller in einen funktionsfähigen Status überführbar sind. In Untersuchungen der vergangenen Jahre wurde bereits mehrfach beschrieben, dass CD16 als Oberflächenmarker auch auf Monozyten zu finden ist, die im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen stehen (sogenannte „*inflammatory monocytes*“)⁴⁷. Diese können nach Kontakt mit mikrobiellen Produkten große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen freisetzen und im Rahmen des Entzündungsprozesses nach Stimulation mit z.B. LPS einen Großteil des Zytokins TNF- α im peripheren Blut beisteuern⁴⁸. Das Zytokin IL-10 wird dann nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß gebildet⁴⁷. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bei Patienten mit Sepsis nachweisen, dass auch hier vermehrt inflammatorische Monozyten ausgeschwemmt werden⁴⁹⁻⁵¹. Interessanterweise weisen inflammatorische CD16⁺ Monozyten ein höheres Potenzial zur Antigenpräsentation auf, indem sie im Gegensatz zu CD16⁻ Monozyten hohe Level an HLA-DR exprimieren⁴⁷. Sie stellen somit „reifere“ Monozyten dar, die eine höhere T-Zell-stimulatorische Kapazität aufweisen⁴⁷. Neben ihrer Rolle im Entzündungsprozess konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass CD16⁺ Monozyten bei Patienten mit malignen Tumoren vermehrt auftreten⁵²⁻⁵⁴. Über die Sekretion des Zytokins IL-12 können diese Zellen an der Anti-Tumorabwehr beteiligt sein⁵⁵, indem die Produktion von IFN- γ und TNF- α induziert wird und eine Stimulation von T-Zellen erfolgt. Diese finden sich im Tumorentzündungsinfiltrat sowie in der Nähe von Tumorzellen^{55,56}. Eine Arbeit der Arbeitsgruppe von Said et al. konnte zeigen, dass mikrobielle Bestandteile bei Patienten mit HIV-Infektion eine Hochregulierung von PD-1 auf Monozyten bewirken können⁵⁷. Hierdurch wird

vermehrt das inhibitorische, immunregulatorische Zytokin IL-10 durch Monozyten produziert und zusammen mit der erhöhten Expression von PD-1 eine T-Zell-Immunantwort verhindert⁵⁷. Die Expression von PD-1 ist dabei auf CD16⁺ Monozyten deutlich höher als auf CD16⁻ Monozyten⁵⁷. Möglicherweise kann ein solcher Mechanismus auch im Rahmen der Tumorentstehung von Bedeutung sein, wodurch Tumorzellen einer effektiven Immunantwort entgehen. Dies würde einen möglichen Erklärungsansatz darstellen, warum in der vorliegenden Arbeit die CD14⁺/CD56⁺ Monozyten im peripheren Blut von Tumorpatienten den Oberflächenmarker CD16 in geringerem Ausmaß exprimierten als die untersuchten gesunden Probanden.

In der durchflusszytometrischen Analyse CD14⁺/CD56⁺ Monozyten waren spezifische NK-Marker ebenfalls nicht nachzuweisen, es zeigte sich lediglich eine signifikante Erhöhung des Oberflächenmoleküls CD337 bei Tumorpatienten. CD337 (NKp30) ist ein aktivierender NK-Rezeptor aus der Gruppe der Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR)⁵⁸. CD337 spielt eine Rolle bei der Interaktion von DCs und NK-Zellen, indem über eine Erkennung von CD337 NK-Zellen durch DCs aktiviert werden und proliferieren⁵⁹. Nach Aktivierung erfolgt in einem anschließenden regulatorischen Schritt die Elimination von immaturren DCs⁵⁹. Das Ausmaß dieser Inhibierung hängt in besonderem Maße vom NK/DC-Verhältnis ab; so wird die DC-Aktivität bei einem niedrigen NK/DC-Verhältnis sogar verstärkt⁶⁰. Ob die in der vorliegenden Arbeit untersuchten CD337⁺ Monozyten ebenfalls immunregulatorische Fähigkeiten besitzen, ist noch unklar. Jedoch könnte die Tatsache, dass bei Tumorpatienten eine erhöhte Anzahl dieser Zellen detektierbar war, die Frage aufwerfen, ob diesen Zellen eine immunregulatorische oder sogar immunsuppressive Funktion zukommt.

Die natürliche Anti-Tumor-Immunantwort wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Immunzellen vermittelt, wie T- und B-Zellen, NK-Zellen und DCs. Dabei spielt die Antigenaufnahme und -präsentation der DCs bei der T-Zell-Aktivierung mit Induktion einer spezifischen Immunität eine zentrale Rolle^{19,40,41}. Verschiedene Arbeiten zeigten bereits, dass die Anwesenheit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten zum Zeitpunkt der

Diagnosestellung mit weniger ausgedehnten Krankheitsverläufen einhergeht sowie zu einem verbesserten krankheitsfreien Überleben (*disease-free survival*) führt. Dies wurde für nicht-endokrine Tumoren⁶¹⁻⁶³, wie auch für endokrine Tumoren (z.B. dem papillären Schilddrüsenkarzinom)⁶⁴⁻⁶⁶ gezeigt. In einer Studie von Gupta et al. wurden 63 Fälle von papillärem Schilddrüsenkarzinom bei Kindern und jungen Erwachsenen untersucht und die Anwesenheit einer lymphozytären Infiltration mit einem verbesserten Langzeitüberleben beschrieben⁶⁷.

Für die Kontrolle und Regulation dieser Anti-Tumor-Immunprozesse sind hierbei im Wesentlichen aktivierte DCs ausschlaggebend. Die Entstehung eines Tumors ist in dem Fall möglich, wenn Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen oder die Anti-Tumor-Immunantwort direkt zu verhindern⁶⁸. Die in diesem Rahmen entwickelten Mechanismen umfassen ein Herunterregulieren oder einen Verlust von MHC-Molekülen, den Verlust von Tumorantigenen^{69,70} sowie eine entwickelte Resistenz gegenüber Zelltod durch eine Überexpression von anti-apoptotischen Faktoren oder gestörte Apoptose-Signalwege⁷¹. Weitere Mechanismen sind die aktive Unterdrückung von Effektorzellen⁷¹ sowie die Erschaffung eines suppressiven Tumormikromilieus⁶⁹. Letzteres besteht neben Endothelzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten aus verschiedenen immunsuppressiven Zellen wie tolerogenen DCs, immunsuppressiven Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) sowie regulatorischen T-Zellen⁷². Über die Rekrutierung von immunsuppressiven Zellen sind Tumoren in der Lage, T-Zell-Immunantworten zu supprimieren und ein weiteres Tumorstadium voranzutreiben. Immunsuppressive Substanzen wie VEGF, IL-6, IL-10, TGF- β , löslicher Fas-Ligand und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) induzieren und unterstützen dieses Milieu^{69,73,74}. Es bewirkt eine gestörte Reifung von DCs und führt zu einer Akkumulation von unreifen DCs im Tumorgewebe⁷². Sogenannte tolerogene DCs stellen eine zentrale Säule der Tumorimmunologie dar, da sie die Proliferation von regulatorischen T-Zellen induzieren, die zytotoxische Immunantworten hemmen und das Tumorstadium fördern⁷⁵. Die Expansion von regulatorischen T-Zellen wird durch die oben beschriebenen immunsuppressiven Faktoren des Tumormikromilieus gefördert⁷¹. Tolerogene DCs exprimieren niedrige Level von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen sowie co-

stimulatorischen Molekülen und sind durch die Expression von TGF- β ⁷² gekennzeichnet. In einer Arbeit von Almand et al. wurden 93 Patienten mit Brust-, Kopf-, Hals- sowie Lungenmalignomen untersucht und es wurde gezeigt, dass Tumorpatienten einen deutlich höheren Anteil an unreifen DCs im peripheren Blut aufweisen. Dabei führte eine chirurgische Resektion der Tumoren zu einer signifikanten Reduktion unreifer DCs⁷⁶.

Neben der Antigenaufnahme und -präsentation sowie der T-Zell-Aktivierung mit Induktion einer spezifischen Immunität sind DCs somit auch grundlegend an der Entwicklung einer peripheren Toleranz beteiligt^{19,40,41}. So kann verallgemeinernd formuliert werden, dass unreife DCs Immuntoleranz vermitteln, während reife DCs die Entstehung einer spezifischen Immunantwort induzieren^{2,36,77}. Die immunregulatorische bzw. tolerogene Fähigkeit der DCs wird dadurch vermittelt, dass unreife DCs ins Tumorgewebe rekrutiert werden und bei Abwesenheit von Stimulationsfaktoren Antigene von nekrotischen oder apoptotischen Tumorzellen aufnehmen. Anschließend wandern sie in die drainierenden Lymphknoten und präsentieren hier – ohne die Expression von co-stimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 – die Tumorantigene den T-Zellen. Hierdurch wird eine Anergie oder Deletion von T-Zellen vermittelt² oder die Bildung von IL-10-sekretierenden regulatorischen T-Zellen gefördert⁷⁸. Die im Tumormikromilieu befindlichen immunsuppressiven Zellen hemmen die Anti-Tumor-Immunantwort über verschiedene Mechanismen, z.B. die Depletion von Arginin oder reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid⁷². Die im Tumormikromilieu befindlichen regulatorischen T-Zellen sind ferner in der Lage, über die Produktion von IL-10 und TGF- β die Funktion von zytotoxischen T-Zellen direkt zu inhibieren.

Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten CD14⁺/CD56⁺ Monozyten könnte vermutet werden, dass diese Monozyten je nach entstehendem Zytokinmilieu im Rahmen eines neoplastischen Geschehens, z.B. durch IFN- α , heranreifen und zytolytische Eigenschaften erwerben könnten, um in der Anti-Tumor-Immunantwort funktionell aktiv zu werden. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann vermutet werden, dass CD14⁺/CD56⁺ doppeltpositive Monozyten zwar einen Stimulus zur Expansion erfahren haben, jedoch von der Tumorumgebung gehemmt werden und somit nicht zu reifen DCs heranreifen.

Die dann dominierenden unreifen Monozyten wirken tolerogen durch die Limitierung von Effektor-T-Zellen^{76,79,80}.

Die funktionellen Analysen wurden mit CD14⁺/CD56⁺ Monozyten durchgeführt, die aus Probandenblut isoliert wurden. In einem Annexin-Apoptose-Assay, bei dem Jurkat-Zellen als Targetzellen fungierten, wurden frisch isolierte oder IFN- α -stimulierte Monozyten verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass frisch isolierte CD14⁺/CD56⁺ Monozyten eine signifikant höhere Apoptoseinduktion bewirken konnten, verglichen mit der spontanen Apoptoserate von Jurkat-Zellen. Eine vorherige Stimulation der Monozyten durch Hinzugabe von IFN- α erhöhte jedoch die Apoptoseinduktion in starkem Ausmaß. Der Annexintest zeigt als Endpunkt den Anteil veränderter Oberflächenstrukturen apoptotischer Zellen. Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten erfolgte daher die Durchführung eines ⁵¹Chrom-Freisetzungstests. Hierbei fungierten K562-Zellen und PC3-Zellen als Targetzellen. Dieser Test zeigt das zytotoxische Potenzial als direktes Maß der freigesetzten Radioaktivität. Hier wurde deutlich, dass die Stimulation der Monozyten mit IFN- α zu einer zytotoxischen Fähigkeit führt, frisch isolierte Monozyten hingegen keine direkte Zytolyse der Targetzellen induzieren. IFN- α scheint somit einen starken Stimulus zur funktionellen Aktivierung dieser Zellen darzustellen. So kann vermutet werden, dass die untersuchten CD14⁺/CD56⁺ Monozyten möglicherweise Vorläuferzellen von CD56⁺ IFN-DCs darstellen und erst durch Stimulation mit IFN- α zu reifen, zytolytisch aktiven Zellen heranreifen. Dabei reicht offenbar ein kurzzeitiger Stimulus aus, denn die Ausreifung erfolgte hierbei innerhalb eines Tages. Bisher wurde eine Ausreifung erst nach 3 Tagen beschrieben⁸¹. Durch Einwirkung von IFN- α könnten die möglicherweise immunregulatorisch wirkenden CD14⁺/CD56⁺ Vorläuferzellen zu aktiven Beteiligten der zytotoxischen Immunantwort in der Anti-Tumor-Immunabwehr werden. Bei den verwendeten Targetzellen handelte es sich um K562-Tumorzellen, die eine hohe Sensitivität gegenüber TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) aufweisen⁸². Die Co-Inkubation der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten mit den K562-Targetzellen bewirkte eine Zytolyse in ähnlichem Ausmaß wie mit PC3-Tumorzellen. Daraus kann

geschlussfolgert werden, dass der Zytolyse unter anderem ein TRAIL-abhängiger Mechanismus zu Grunde liegen könnte.

Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung der CD14⁺/CD56⁺ Monozyten wurde zudem die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 vor und nach Stimulation mit IFN- α untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die nötigen co-stimulatorischen Moleküle nach einem Nachreifen mit IFN- α sehr wohl vorhanden sind. Dabei ist wichtig anzumerken, dass nicht nur die Anzahl der positiven Zellen z.B. für das co-stimulatorische Molekül CD80 anstieg, sondern dass auch die Anzahl der Moleküle pro Zelle, ausgedrückt als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität), signifikant anstieg. Nur die mit IFN- α nachgereiften Zellen konnten auch effektiv Tumorzellen erkennen und eliminieren.

Das für die Stimulation verwendete Zytokin IFN- α stammt aus der Gruppe der Typ I-Interferone, zu denen auch IFN- β gezählt wird. IFN- α nimmt in vielfacher Weise eine zentrale Rolle in der Anti-Tumor-Immunantwort ein. Durch seine antitumorale Wirkung kommt es im Rahmen der Tumorthherapie bei verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren, zum Beispiel dem malignen Melanom, zum Einsatz. IFN- α entfaltet seine antitumoralen Effekte über eine Vielzahl von Mechanismen. Zum einen führt es zu einer Differenzierung in Richtung einer Th1-Immunantwort^{83,84}, zu einer vermehrten Bildung von zytotoxischen T-Zellen⁸⁵, erhöhtem T-Zell-Überleben⁸⁴⁻⁸⁶ sowie einer vermehrten Bildung von langlebigen CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen und kann so eine direkte hemmende Wirkung auf Tumorzellen ausüben⁸³. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IFN- α zu einer verstärkten Aktivität von Makrophagen, erhöhter Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen sowie zu einer NK-Zell-Aktivierung beiträgt^{83,87,88}. Im Mausmodell induziert IFN- α ferner eine erhöhte Expression antiapoptotischer Gene⁸⁹. Eine Schlüsselrolle nimmt IFN- α jedoch bei der Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen ein⁸⁹⁻⁹¹. Durch vermehrte Differenzierung von Monozyten zu aktiven, muren DCs (IFN-DCs) vermittelt IFN- α die vermehrte Kapazität zur T-Zell-Stimulation und Induktion einer spezifischen Anti-Tumor-Immunantwort⁸⁹. Hierdurch ist dieses Zytokin in den vergangenen Jahren in den Fokus der Anti-

Tumorthherapie gerückt und ist bereits in verschiedenen Therapieregimen etabliert. Wie bereits dargestellt, konnten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass IFN- α die Reifung und Aktivierung von Monozyten zu CD56⁺ DCs (CD56⁺ IFN-DCs) bewirkt, welche durch ihre zytolytischen und antigenpräsentierenden Eigenschaften eine wichtige Rolle in der Anti-Tumor-Immunantwort einnehmen können⁸¹.

Es kann somit vermutet werden, dass der Tumor durch sein spezielles Tumormikromilieu in der Lage ist, die CD14⁺/CD56⁺ Monozyten als mögliche Vorläuferzellen der CD56⁺ IFN-DCs umzumodulieren, so dass diese nicht heranreifen und tolerogen wirken.

Ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen im peripheren Blut könnte einen therapeutischen Marker darstellen, der einen Hinweis darauf gibt, dass ein neoplastisches Geschehen vorliegt. Eine Veränderung der Häufigkeit im Verlauf einer malignen Erkrankung könnte auf einen Progress hinweisen.

Um zu untersuchen, ob CD14⁺/CD56⁺ doppelpositive Zellen auch direkt das Tumorgewebe infiltrieren, wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebepreparaten eines papillären Schilddrüsenkarzinoms durchgeführt. Auch dort konnte eine erhöhte Anzahl CD14⁺/CD56⁺ Monozyten im Tumorgewebe, insbesondere in direkter Nähe von Tumorzellen, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die untersuchten Zellen möglicherweise als Vorläuferzellen von CD56⁺ IFN-DCs Antigene im Tumorgewebe aufnehmen und diese naiven T-Zellen präsentieren. Neben der Fähigkeit zur Antigenpräsentation sind sie auch in der Lage, bei Anwesenheit von IFN- α eine direkte Apoptose der Zielzellen zu induzieren und eine Zytolyse zu bewirken. Damit die untersuchten Zellen an den Ort des Tumors gelangen, sind verschiedene Signale erforderlich, die ein Anziehen dieser Zellen vermitteln. Welche Faktoren im Rahmen der Chemoattraktion eine Rolle spielen, welche Chemokine zum Beispiel exprimiert und von den untersuchten Monozyten erkannt werden, ist noch nicht untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinweisen, dass CD14⁺/CD56⁺ Monozyten möglicherweise als Vorläuferzellen

von CD56⁺ IFN-DCs eine wichtige Rolle in der natürlichen Anti-Tumor-Immunantwort einnehmen können.

Unstimuliert liegen sie in der Peripherie als unreife, vermutlich immunsuppressiv wirkende Monozyten vor, welche die Aktivität von Effektorzellen hemmen und das Tumorwachstum fördern könnten. Möglicherweise führt die Tumormikroumgebung dazu, dass diese Zellen nicht ausreifen und in der immunsuppressiven Form verbleiben, wodurch sie nicht zu zytolytisch aktiven Zellen ausreifen. Eine besondere Schlüsselrolle scheint IFN- α zuzukommen. Eine Stimulation der Zellen mit IFN- α führt zu aktiven, kompetenten Immunzellen, die in der Lage sind, direkt Zielzellen zu lysieren und in der Anti-Tumor-Immunantwort mitzuwirken.

5 Literaturverzeichnis

1. Papewalis C, Jacobs B, Baran AM, et al. Increased numbers of tumor-lysing monocytes in cancer patients. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2011**; 337(1-2): 52-61.
2. Schott M. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr Relat Cancer* **2006**; 13(3): 779-95.
3. Popov A, Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med (Berl)* **2008**; 86(2): 145-60.
4. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **2001**; 22(11): 633-40.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **2000**; 18: 767-811.
6. Karre K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* **2008**; 9(5): 477-80.
7. Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol* **2003**; 78(1): 7-17.
8. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* **2006**; 20(3): 123-37.
9. Kveberg L, Sudworth A, Todros-Dawda I, Inngjerdigen M, Vaage JT. Functional characterization of a conserved pair of NKR-P1 receptors expressed by NK cells and T lymphocytes in liver and gut. *Eur J Immunol*. **2015** Feb;45(2):501-12.
10. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2002**; 2(10): 735-47.
11. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* **1998**; 188(12): 2375-80.
12. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **2003**; 22(53): 8628-33.
13. Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells. *Front Oncol*. **2015** Apr 2;5:69.

14. Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM. Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep* **2009**; 10(10): 1103-10.
15. Saha P, Geissmann F. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* **2011**; 89(1): 2-4.
16. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* **2008**; 26: 421-52.
17. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* **2012**; 13(12): 1145-54.
18. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **1973**; 137(5): 1142-62.
19. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **1998**; 392(6673): 245-52.
20. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **1991**; 9: 271-96.
21. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **2007**; 449(7162): 564-9.
22. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* **2009**; 206(9): 1983-94.
23. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **1995**; 182(2): 389-400.
24. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2004**; 5(10): 987-95.
25. Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*. **2009**;214(7):554-61.
26. den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother* **2009**; 58(7): 1149-57.
27. Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* **2010**; 22(10): 1397-405.

28. Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **2002**; 418(6901): 988-94.
29. Forster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* **2008**; 8(5): 362-71.
30. Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **2002**; 296(5574): 1873-6.
31. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **2003**; 3(12): 984-93.
32. Longley J, Kraus J, Alonso M, Edelson R. Molecular cloning of CD1a (T6), a human epidermal dendritic cell marker related to class I MHC molecules. *J Invest Dermatol* **1989**; 92(4): 628-31.
33. Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* **2004**; 22: 817-90.
34. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* **2001**; 1(3): 220-8.
35. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* **1996**; 153: 85-106.
36. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol* **2013**; 4: 82.
37. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2002**; 2(2): 116-26.
38. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **2000**; 192(7): 1027-34.
39. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* **1996**; 184(1): 19-29.
40. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **2003**; 21: 685-711.
41. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* **2001**; 194(6): 769-79.

42. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2002**; 2(3): 151-61.
43. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* **2010**; 108: 111-65.
44. Papewalis C, Jacobs B, Wuttke M, et al. IFN-alpha skews monocytes into CD56+-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *J Immunol* **2008**; 180(3): 1462-70.
45. Mantovani A, Jerrells TR, Dean JH, Herberman RB. Cytolytic and cytostatic activity on tumor cells of circulating human monocytes. *Int J Cancer* **1979**; 23(1): 18-27.
46. Zisman A, Ng CP, Pantuck AJ, Bonavida B, Belldegrun AS. Actinomycin D and gemcitabine synergistically sensitize androgen-independent prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. *Journal of immunotherapy* **2001**; 24(6): 459-71.
47. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* **2007**; 81(3): 584-92.
48. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* **2002**; 168(7): 3536-42.
49. Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle-Rowson G. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* **1997**; 8(1): 73-5.
50. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* **1993**; 82(10): 3170-6.
51. Scherberich JE, Nockher WA. CD14++ monocytes, CD14+/CD16+ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin Chem Lab Med* **1999**; 37(3): 209-13.
52. Feng AL, Zhu JK, Sun JT, et al. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin Exp Immunol* **2011**; 164(1): 57-65.
53. Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, et al. Circulating CD14(+) CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol* **2010**; 161(3): 471-9.

54. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, et al. CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **1995**; 85(10): 2910-7.
55. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp Hematol* **2004**; 32(8): 748-55.
56. van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. *Lab Invest* **1992**; 67(2): 166-74.
57. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* **2010**; 16(4): 452-9.
58. Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* **1999**; 190(10): 1505-16.
59. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* **2002**; 195(3): 343-51.
60. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* **2002**; 195(3): 335-41.
61. Adams SF, Levine DA, Cadungog MG, et al. Intraepithelial T cells and tumor proliferation: impact on the benefit from surgical cytoreduction in advanced serous ovarian cancer. *Cancer* **2009**; 115(13): 2891-902.
62. Dalerba P, Maccalli C, Casati C, Castelli C, Parmiani G. Immunology and immunotherapy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2003**; 46(1): 33-57.
63. Jorkov AS, Donskov F, Steiniche T, et al. Immune response in blood and tumour tissue in patients with metastatic malignant melanoma treated with IL-2, IFN alpha and histamine dihydrochloride. *Anticancer Res* **2003**; 23(1B): 537-42.
64. Matsubayashi S, Kawai K, Matsumoto Y, et al. The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* **1995**; 80(12): 3421-4.

65. Ozaki O, Ito K, Mimura T, Sugino K, Hosoda Y. Papillary carcinoma of the thyroid. Tall-cell variant with extensive lymphocyte infiltration. *Am J Surg Pathol* **1996**; 20(6): 695-8.
66. Ugolini C, Basolo F, Proietti A, et al. Lymphocyte and immature dendritic cell infiltrates in differentiated, poorly differentiated, and undifferentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* **2007**; 17(5): 389-93.
67. Gupta S, Patel A, Folstad A, et al. Infiltration of differentiated thyroid carcinoma by proliferating lymphocytes is associated with improved disease-free survival for children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**; 86(3): 1346-54.
68. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol* **2011**; 23(1): 42-9.
69. Hurwitz AA, Watkins SK. Immune suppression in the tumor microenvironment: a role for dendritic cell-mediated tolerization of T cells. *Cancer Immunol Immunother* **2012**; 61(2): 289-93.
70. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* **2002**; 3(11): 999-1005.
71. Janikashvili N, Bonnotte B, Katsanis E, Larmonier N. The dendritic cell-regulatory T lymphocyte crosstalk contributes to tumor-induced tolerance. *Clin Dev Immunol* **2011**; 2011: 430394.
72. Koido S, Homma S, Hara E, et al. Regulation of tumor immunity by tumor/dendritic cell fusions. *Clin Dev Immunol* **2010**; 2010: 516768.
73. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* **2003**; 9(10): 1269-74.
74. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* **2008**; 222: 206-21.
75. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* **2005**; 202(7): 919-29.
76. Almand B, Resser JR, Lindman B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* **2000**; 6(5): 1755-66.
77. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **2002**; 80(5): 477-83.
78. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* **2010**; 11(1): 7-13.

79. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **2006**; 25(3): 323-31.
80. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebt SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res* **2005**; 65(20): 9525-35.
81. Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C, et al. Characterization of monocyte-derived IFNalpha-generated dendritic cells. *Horm Metab Res* **2008**; 40(2): 117-21.
82. Park SJ, Kim MJ, Kim HB, et al. Cotreatment with apicidin overcomes TRAIL resistance via inhibition of Bcr-Abl signaling pathway in K562 leukemia cells. *Exp Cell Res* **2009**; 315(11): 1809-18.
83. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **2002**; 13(2): 119-34.
84. Sun S, Zhang X, Tough DF, Sprent J. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med* **1998**; 188(12): 2335-42.
85. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* **1999**; 189(3): 521-30.
86. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* **2005**; 202(5): 637-50.
87. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, et al. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res* **1998**; 58(12): 2489-99.
88. Trinchieri G, Santoli D. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J Exp Med* **1978**; 147(5): 1314-33.
89. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie* **2007**; 89(6-7): 884-93.
90. Radvanyi LG, Banerjee A, Weir M, Messner H. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell

maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Immunol* **1999**; 50(5): 499-509.

91. Luft T, Pang KC, Thomas E, et al. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* **1998**; 161(4): 1947-53.

6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Matthias Schott für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, die Aufnahme in das Forschungsteam sowie die sehr gute Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Roland Fenk danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Claudia Papewalis für Ihre ausgezeichnete Betreuung, die Hilfe bei der Auswertung der Daten und die Beantwortung all meiner Fragen. Insbesondere möchte ich für ihre Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation bedanken.

Ganz herzlichen Dank möchte ich ebenfalls Dr. rer. nat. Margret Ehlers und Dr. med. Benedikt Jacobs für die effektive Unterstützung und Einarbeitung in die Laborarbeit entgegenbringen. Ich möchte allen Labormitarbeitern, insbesondere Frau Roswitha Charko, für die wertvollen praktischen Ratschläge sowie das angenehme Arbeitsklima danken.

Prof. Dr. med. Roland Fenk danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinischen Immunologie Blutproben von Patienten mit hämatoonkologischen Erkrankungen zu akquirieren.

Bei Holger Schrupf möchte ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Von ganzen Herzen möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mir mit Ihrer Liebe und Geduld immerzu unterstützend zur Seite standen.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Schwester und besten Freundin Julia Baran. Für Ihre stetige Unterstützung, Stärke und ihren Beistand zu jeder Zeit bin ich unendlich dankbar.

7 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

08.03.2017, Anna Maria Baran

Unterschrift