Institut für klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm
Ärztlicher Direktor
Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier

Nekroseassoziiertes Protein S100A4 aus Tumoren induziert regulatorische T- Zellen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Denis Sebastian Adam geb. Wiegmann

Bad Dürkheim

2013

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	PD Dr. Ramin Lotfi
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Marion Schneider
Tag der Promotion:	09.05.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....I
Abkürzungsverzeichnis.....II
1. Einleitung.....1
1.1. Adaptives und angeborenes Immunsystem.....1
1.1.1. Dendritische Zellen.....1
1.1.2. Regulatorische T- Zellen (Tregs).....2
1.2. Damage associated molecular patterns - DAMPs.....3
1.2.1. Entstehung und Definition des DAMP- Konzeptes.....3
1.2.3. Komplexbildung als mögliche Interaktion von DAMPs im Tumormilieu.....5
1.2.4. S100 Protein- Familie und S100A4.....6
1.3. Fragestellung und Zielsetzung.....7
2. Material und Methoden.....8
2.1. Material.....8
2.2. Methoden.....14
2.2.1. Tumorzellkultur.....14
2.2.2. Zellisolation von Immunzellen für Stimulationsversuche.....14
2.2.3. Stimulation der unreifen dendritischen Zellen.....16
2.2.4. Ansetzen der Kokultur mit PBMC oder PBL.....16
2.2.5. Proliferationsassay mit CFSE- gefärbten Lymphozyten.....18
2.2.6. Anfärbung von Oberflächenmarkern und Parallelfärbung von FoxP3 und CD25 für die durchflusszytometrische Analyse.....19
2.2.7. Messung der Stoffwechselaktivität mittels WST-1 Assay.....21
2.2.8. Auswertung FACS.....23
2.2.9. Sequenzielle Messung mittels WST-1 und FACS.....25
2.2.10. Quantitative Real- Time- PCR (qRT-PCR) 25
2.2.11. Statistische Auswertung der Messdaten.....25
3. Ergebnisse.....26
3.1. Proliferationsinduzierende Wirkung von Tumorlysat und DAMPs auf Lymphozyten.....26

3.1.1. Mit HCT-116 Tumorlysat stimulierte DCs steigern den Metabolismus in einer autologen Kokultur mit Lymphozyten....26
3.1.2. HCT-116 Tumorlysat und rekombinantes S100A4 Protein steigern den Zellmetabolismus einer autologen Kokultur vergleichbar stark, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten....27
3.2.1. Mit DAMPs stimulierte DCs induzieren die Proliferation autologer Lymphozyten....29
3.3. Nachweis von S100A4 in verschiedenen Tumorlysaten mittels quantitativer RT-PCR....31
3.4. Die Proliferationsinduzierende Wirkung von HCT-116 Tumorlysat lässt sich durch Zugabe von Anti-S100A4 verringern....32
3.5. Proliferationsinduzierende Wirkung von verschiedenen Tumorlysaten in einem allogenen System....33
3.6. Nachweis einer erhöhten Anzahl von CD4+CD25+FoxP3+ Lymphozyten (regulatorische T-Zellen/ Tregs) in einer autologen Kokultur von stimulierten DCs mit CD4+ Lymphozyten....34
3.7. Anstieg des IL-10 Gehaltes im Überstand einer Kokultur von stimulierten DCs mit CD4+ Lymphozyten....36
4. Diskussion....37
4.1. DAMPs induzieren eine phenotypische und funktionelle Maturierung von dendritischen Zellen (DCs)....37
4.2. Ein DAMP- Prototyp: HMGB1 zeigt keine Wirkung....38
4.3. Nachweis von S100A4 in Tumorzelllysat....39
4.4. Antagonisierung der Lysatwirkung mittels Anti-S100A4....40
4.5. Semi- mature DCs induzieren regulatorische T- Zellen....40
4.6. Nachweis von IL-10 und IL-2 im Überstand der Kokultur....42
4.7. Mögliche Bedeutung von S100A4 in der Entwicklung von Tumoren....42
5. Zusammenfassung....43
6. Literaturverzeichnis....45
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis....51
Lebenslauf....52
Veröffentlichungen....53

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Beta-actin
Anti-S100A4	IgG1 Antikörper gegen S100A4
APCs	Antigen presenting cells= Antigen präsentierende Zellen
aTreg	Adaptive regulatory T- Cell
B7	CD80/ CD86
Ca2+	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CSF	Colony stimulating factor
DAMP	Damage associated molecular pattern
DC	Dendritic cell, dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FACS	Flourescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1-3	Flourescence 1-3 (Floureszenskanäle an einem Durchflusszytometer)
FoxP3	Forkhead box P3= Scurfin
FSC	Forward scatter
G	Gravitation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM- CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB1	High mobility group protein B1
HSP-70	Heat shock protein 70
IC	Isotype control

ICD	Immunogenic cell death
iDC	Immature dendritic cell
IgG1	Immunglobulin vom Typ G1
IL	Interleukin
iTreg	Induced regulatory T- cell
MACS	Magnetic activated cell sorting
MACC1	Metastasis-Associated in Colon Cancer 1
mDC	Mature dendritic cell
MHC II	Major histocompatibility complex class 2
Mio.	Millionen
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MMP	Matrixmetalloproteinasen
moDC	Monocyte derived dendritic cell
mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
nTreg	Natural regulatory T- cell
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBL	Peripheral blood Lymphocytes
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Pen Strep	Penicillin Streptomycin
PGRP-S	Peptidoglycan recognition protein short = Tag7
PI	Propidium iodide
p- Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
RA	Rheumatoide Arthritis
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
rcf	Relative centrifugal force
RN18S1	18S ribosomal RNA
RNA	Ribonucleic acid
RT q-PCR	Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction
S100A4	Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4

SD	Standard deviation= Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean= mittlerer Fehler des Mittelwertes
siRNA	Small interfering RNA
S-Med	Standardmedium = DMEM High Glucose
SSC	Side scatter
Tag7	Tag7 = PGRP-S = Peptidoglycan recognition protein short
tDC	Tolerogenic Dendritic Cell
Tconv	Conventional T- cell
Teff	Effector T-Cell
Th	T- Helfer- Zelle/ T- helper cell
Th1	Type 1 T- helper cell
Th2	Type 2 T- helper cell
Th17	Type 17 T- helper cell
TLR	Toll-like Receptor
TME	Tumour- microenvironment
Tr1	T regulatory type- 1 cell/ Type-1 regulatory T- cell
Treg	Regulatory T- cell
TTEST	Student t Test
WST	Water soluble tetrazolium

1. Einleitung

1.1. Adaptives und angeborenes Immunsystem

1.1.1. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und stellen eine Schnittstelle zwischen adaptiver und angeborener Immunität dar [20, 49]. Je nach Herkunft der DCs im Labor, verfügen sie auch über unterschiedliche Eigenschaften [50]. Eine im Labor häufig verwendete DC- Art wird aus Monozyten generiert, die in vitro für mehrere Tage mit GM-CSF und IL-4 behandelt wurden. Die erhaltenen Zellen werden als "monocyte derived DCs" (moDCs) bezeichnet. Für moDCs sind unter anderem die Neuexpression von CD80, sowie die Hochregulation von CD40, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DR beschrieben [37]. CD86 bleibt auf niedrigem Niveau exprimiert. CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) werden auch als B7 kostimulatorische Moleküle bezeichnet. Neben der Expression von MHC- Molekülen und kostimulatorischen B7 Molekülen wird zur Charakterisierung von DCs zusätzlich die Zytokinproduktion genannt [19, 31, 59].
Sind MHCII und B7 hoch exprimiert, spricht man von phänotypisch reifen DCs. Sind MHCII und B7 niedrig exprimiert, handelt es sich um unreife DCs. Wenn MHCII und B7 hoch exprimiert werden, die Zytokinproduktion jedoch im Vergleich zu reifen DCs geringer ist, sprechen die Autoren von Lutz et al. von einem sogenannten "Semi- mature Status" [31]. Dieser gilt als Zwischenstadium. Laut Lutz et al. ist der phänotypische Status von moDCs bereits direkt nach deren Generierung ähnlich dem der Semi-mature DCs [31]. Der Reifegrad von generierten moDCs *in vitro*, sowie von DCs *in vivo* hängt laut Kvistborg et al. bei Tumorpatienten maßgeblich von der Art und der Aggressivität der Tumoren ab [28]. Je aggressiver der zugrundeliegende Tumor ist, desto weniger sind die DCs bzw. moDCs empfänglich für Reifungssignale, die eine gerichtete T-Zellantwort hervorrufen können. Zusätzlich sind laut Kvistborg et al. bei Vorliegen einer malignen Erkrankung vermehrt unreife DCs im Körper der betroffenen Personen nachweisbar [28].

1.1.2. Regulatorische T- Zellen (Tregs)

Regulatorische T- Zellen (Tregs) sind nicht nur an der Hemmung von autoreaktiven Effektor-T-Zellen (Teff) beteiligt, sie unterdrücken auch Reaktionen des Immunsystems die gegen harmlose externe Antigene oder Autoantigene gerichtet sind [2]. Über ihre Herkunft werden verschiedene Arten unterschieden. Neben den natürlichen Tregs (nTregs), die dem Thymus zugerechnet werden, werden unter anderem auch thymusunabhängige Tregs beschrieben die in der Körperperipherie aus naiven CD4+ T-Zellen entstehen [53]. Diese werden je nach Autor auch als induzierte Tregs (iTregs) bezeichnet. Ob und in welchem Ausmaß bei der Entstehung von regulatorischen T-Zellen auch kostimulatorische Moleküle auf DCs ein Rolle spielen, wird in der Arbeit von Pletinckx et al. diskutiert [40]. So kommt es laut den Autoren je nach Expressionsgrad der B7 kostimulatorischen Moleküle in Kombination mit weiteren Stimuli zur Induktion verschiedener Subpopulationen von T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften. Wird B7 nicht oder nur schwach exprimiert, kommt es in Kombination mit TGF-β und IL-2 zur Induktion von sogenannten iTregs, welche positiv für FoxP3 sind. Bei einer mittleren Expression von B7, kommt es bei zusätzlicher Stimulation mit IL-10 zur Induktion von "T regulatory type-1 cells" (Tr1). Diese sind negativ für FoxP3 und produzieren IL-10, wodurch sie ihre regulatorische Wirkung entfalten. Eine starke Expression der B7 kostimulatorischen Moleküle auf DCs führt zunächst zur Induktion von "T- helper cells" (Th) [40]. Weitere Untergruppen von Tregs können durch eine zusätzliche Stimulation mit Zytokinen entstehen [40]. Die Entstehung von regulatorischen T- Zellen (Tregs) ist also neben der Expression von B7 auf DCs auch von Zytokinen abhängig. Die Expression von FoxP3 als Alleinstellungsmerkmal von regulatorischen T- Zellen wird von mehreren Autoren in Frage gestellt, da auch aktivierte T- Zellen ebenfalls FoxP3 exprimieren können [2]. Die Entstehung von iTregs, die CD4+CD25+FoxP3+ sind, gliedert sich in mehrere Zwischenschritte. Zunächst exprimieren die iTregs CD25 neu auf ihrer Oberfläche. Zur Ausbildung ihrer immunsupressiven Eigenschaften ist jedoch laut den Autoren von Roncador et al. und Loser et al. zusätzlich die Expression von FoxP3 notwendig [30, 42]. Die Expression von FoxP3 kann über verschiedene Wege induziert werden. Eine Möglichkeit stellt zum Beispiel extrazelluläres IL-2 dar [24, 29, 60]. Dieses führt zu einer starken und dauerhaften Expression von FoxP3. Laut Yamazaki et al. sind ausreichende

Mengen an IL-2 und der Kontakt zu DCs die Grundvorraussetzungen für eine weitere Proliferation von iTregs *in vitro* [57, 58].

1.2. Damage associated molecular patterns - DAMPs

1.2.1. Entstehung und Definition des DAMP- Konzeptes

Noch vor dem Konzept der "Damage associated molecular patterns" (DAMPs) stand die Idee der Gefahrensignale [34]. Matzinger stellte ein Konzept zur Diskussion wonach das Immunsystem nicht hauptsächlich dichotom zwischen fremd und selbst unterscheidet, sondern vielmehr durch das Erkennen und Reagieren auf Gefahren, bzw. auf sogenannte Gefahrensignale, seine Funktionen ausübt. Diese Gefahrensignale können einen exogenen oder endogenen Ursprung haben [34]. Daraus entwickelte sich mit der Zeit als Analogie zu den externen Alarmsignalen, welche unter anderem auch als "Pathogen associated molecular patterns" (PAMPs) bezeichnet werden können, die Gruppe der DAMPs [54]. Die Gruppe der DAMPs ist eine sehr heterogene Gruppe endogener Proteine und Stoffe, die in ausreichender Konzentration eine Reaktion des Immunsystems hervorrufen können. Die Reaktionen können je nach DAMP- Art und Wirkort sehr unterschiedlich ausfallen. Eine physiologische Aktivierung durch DAMPs kommt beispielsweise bei der Wundheilung in der Haut vor. DAMPs können aber auch eine chronische Entzündung perpetuieren und mögliche Ursache für das Entstehen einer Rheumatoiden Arthritis sein [36]. Weitere ausgewählte Beispiele und Wechselwirkungen mit dem Immunsystem zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: DAMPs und Wechselwirkungen mit dem Immunsystem
(RA= Rheumatoide Arthritis, HMGB1= High-Mobility-Group-Protein B1, DCs= Dendritische Zellen, RAGE= Receptor for advanced Glycation Endproducts, TLR= Toll-like receptor , S100= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate, Tag7= Peptidoglycan recognition protein short, HSP= Hitzeschockprotein, APCs= Antigen präsentierende Zellen, NALP3= croypyrin, ECM= Extrazelluläre Matrix, MSC= Mesenchymale Stromazellen)

Krankheiten/ Modelle	**DAMP**	**Effekt/ Reaktion**	**Literatur**
• Sterile Entzündungen • RA • Sepsis	HMGB1	• Interaktion mit RAGE, TLR2, TLR4 • Chemotaxis von Immunzellen u.a. DCs • Reifung von DCs	[43] [39]
• Entzündung • Fibrose • Maligne Erkrankungen • Metastasierung • Betroffene Organe: Herz, Niere, Lunge, Darm, Gelenke, Brustdrüse,	S100-Proteine	• Bindung an RAGE, TLR4 • S100 A4: Komplexbildung mit HSP-70, Inaktivierung eines tumoriziden Komplexes (Tag7 + HSP-70) • Remodelling der ECM	[43] [35] [18] [9] [14]
• RA • Tumoren	HSP	• Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen • Reifung von APCs • Hemmung des Tumorwachstums durch Komplexbildung mit Tag7	[43] [36] [14]
• Gicht • Nekrose	Harnsäure	• Interaktion mit dem NALP3-Inflammasome • Reifung von DCs • Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten, autoreaktive B- Zellen • Beeinflussung der Proliferation von MSCs	[33] [46] [16]

Eine konsistente Terminologie bei der Einteilung der DAMPs gibt es bisher nicht. Die Autoren von Rosin et al. unterscheiden zusätzlich zwischen DAMPs und Adjuvantien um hervorzuheben, dass letztere Gruppe nicht *per se* eine akute Entzündung hervorruft [43]. Weiter sehen die Autoren die exogenen PAMPs als eine Untergruppe der endogenen DAMPs an [43]. Einigkeit besteht in der Annahme, dass Mitglieder der DAMP- Gruppe

mit dem Immunsystem über TLR und RAGE kommunizieren [6, 17, 43]. Zu einer Freisetzung von vielen verschiedenen DAMPs kommt es beim nekrotischen Zelltod. In Abgrenzung zur Apoptose, bei der Vesikel abgeschnürt werden, in denen sich ebenfalls potentielle DAMPs befinden können, werden die DAMPs bei der Nekrose direkt und ohne vorherige Modifikationen in die Umgebung entlassen [47]. Zu solchen Modifikationen gehören auch posttranslationale Modifikationen. Diese wiederum bestimmen, in welchem Zellkompartiment sich ein Protein aufhalten kann, oder ob es sezerniert wird [38]. Entfallen diese Modifikationen, kann die Wirksamkeit eines DAMPs auf das Immunsystem maßgeblich beeinflusst sein. Ein Beispiel hierfür ist eines der bekanntesten DAMPs, das "High mobility group protein B1" (HMGB1). Falls dieses von Monozyten oder Makrophagen aktiv sezerniert wird, hat es vorher eine Reihe von Modifikationen erfahren und kann Entzündungsreaktionen hervorrufen [7]. Entfallen diese Modifikationen, wie es bei rekombinant hergestelltem HMGB1 der Fall ist, kommt es zu einer schwächeren Reaktion des Immunsystems [7]. Als eine Kombination von Apoptose und Nekrose kann der sogenannte "Immunogene Zelltod" (ICD) gesehen werden. Hierbei handelt es sich um den Zelltod von Krebszellen während einer chemotherapeutischen Behandlung. Aus einer sterbenden Zelle werden aktiv DAMPs sezerniert. Dies führt zu einer Interaktion mit dem Immunsystem und wird in der Therapie zur Krebsbekämpfung als Wirkmechanismus angewendet [27].

1.2.3. Komplexbildung als mögliche Interaktion von DAMPs im Tumormilieu

Die Untersuchung einzelner Mitglieder der DAMP- Gruppe ergab in der Vergangenheit in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen widersprüchliche Ergebnisse [5]. HMGB1 wurde in diesem Zusammenhang sehr gut untersucht [47]. Als Ursache für die kontroversen Ergebnisse kann eine Komplexbildung der verwendeten DAMPs untereinander oder die Komplexbildung mit PAMPs und anderen Stoffen angesehen werden [38]. Diese Komplexbildungen und je nach Bindungspartner ihre zum Teil sehr unterschiedlichen Auswirkungen auf das Immunsystem werden in einer Reihe von Publikationen aktiv diskutiert [14, 38, 39, 47]. Eine Komplexbildung wurde auch für S100A4, ebenfalls ein Mitglied der DAMP- Gruppe von Dunkhanina et al. beschrieben. Je

nach Umgebung und vorhandenen Bindungspartnern, kann S100A4 pro- oder antitumorizide Eigenschaften aufweisen [13].

1.2.4. S100 Protein- Familie und S100A4

Die Familie der calciumbindenden S100 Proteine umfasst zur Zeit 21 Mitglieder, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Die S100 Proteine liegen häufig als Homo- oder Heterodimere mit anderen S100 Proteinen vor [12]. Intrazellulär sind sie unter anderem an der Regulation der Proteinphosphorylierung und Enzymaktivität beteiligt. Zudem haben sie Einfluss auf die Zellmotilität, das Zellwachstum, die Differenzierung und auf die Calcium-Homöostase. Die S100 Proteine werden ebenfalls als Mitglieder der DAMP- Gruppe angesehen [36]. Auch bei der Entstehung und im Verlauf von Tumorerkrankungen spielen die S100 Proteine und hier vor allem S100A4 eine grosse Rolle [48]. Untersuchungen an einem grossen Patientenkollektiv haben gezeigt dass eine kombinierte Bestimmung von S100A4 und "Metastasis-Associated in Colon Cancer 1" (MACC1) im Serum der Patienten mit neu diagnositiziertem Kolonkarzinom die grösste Aussagekraft in Bezug auf das Überleben der Patienten hat [48]. Waren in der Gruppe mit hohen Konzentrationen an S100A4 und MACC1 nach 20 Monaten bereits mehr als die Hälfte der Patienten verstorben, so lebten in der Gruppe mit niedrigen Konzentraionen an S100A4 und MACC1 noch über 90% der Patienten [48]. Speziell im Fall des Kolonkarzinoms ist der Zusammenhang zwischen einer hohen Expression, bzw. einer hohen Konzentration an S100A4 und einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten sehr gut in der Literatur belegt [10, 22, 26, 44, 52, 56]. Aber auch bei anderen Krebsarten wie Brust-, Speiseröhren-, Magen-, Blasen-, Gallenblasen- und Lungenkrebs ist eine Überexpression von S100A4 ein Prädiktor für eine schlechte Prognose [8]. Meist geht ein hoher S100A4 Gehalt mit weit fortgeschrittenen, metastasierten Tumoren einher. Auch bei der Metastasierung des malignen Melanoms scheint S100A4 eine Rolle zu spielen [51].

1.3. Fragestellung und Zielsetzung

Zellnekrose stellt ein wesentliches Merkmal fortgeschrittener Tumoren dar. Bestandteile der Nekrose, die unter anderem das Tumormilieu bilden, sind unter anderem DAMPs. Klinische Daten und *in vitro* Versuche zeigen, dass das Tumormilieu immunsuppressive Eigenschaften besitzt und die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Tumorerkrankungen mit der Zusammensetzung des Tumormilieus assoziiert ist. Aus diesen Beobachtung ergibt sich die Hypothese, dass DAMPs eine tragende Rolle in der immunsupressiven Eigenschaft des Tumormilieus spielen. Diese Hyptohese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Nachdem aus vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe bekannt war, dass DAMPs einen Einfluss auf das angeborene Immunsystem und auf mesenchymale Stammzellen haben, sollte nun deren Einfluss auf das adaptive Immunsystem bestimmt werden. Hier sollte vor allem die Wirkung von DAMPs auf DCs untersucht werden. Durch vorherige Untersuchungen war bereits bekannt dass DAMPs zu einer phänotypischen Maturierung von DCs führen. In Kokulturen von DCs mit Lymphozyten sollte die funktionelle Maturierung der DCs nachgewiesen werden. Falls möglich sollten einzelne Vertreter der DAMP- Gruppe als relevante Bestandteile von Tumorlysat identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Materialien Zellkultur

Zellkulturflaschen

Thermo Scientific
Nunclon Delta Surface

Nunc Multidishes Nunclon™ delta
Polystyrene. With Lid. Sterile
Culture Area/ Well: 1,8 cm²

BD Falcon®
Microtest™ Tissue Culture Plate, 96 Well,
Flat Bottom with Low Evaporation Lid
Growth Area 0,32 cm²

Zellpassage, Kryokonservierung

Greiner bio-one
CELLSTAR® TUBES
Polypropylen Röhrchen
50ml

CRYO.S™
2ml

Nunc Klebefolie:

DPBS, EDTA, Trypsin, Pen Strep

Lonza BioWhittaker®
DPBS
Dulbecco's Phosphate
Buffered Saline – 0,0095 M (PO4)
without Ca and Mg

SIGMA- ALDRICH – E8008
EDTA 0,02 % in DPBS (0,5mM)
Solution

Medium, AB- Serum

Invitrogen
GIBCO REF: 21063-029
+ DMEM High Glucose 1X
+ 4,5 g/L D- Glucose
+ L- Glutamine
+ 25 mM HEPES
- Sodium Pyruvate
- Phenol Red

Invitrogen
GIBCO
2,5% Trypsin
10X

GIBCO
Pen Strep
Penicillin Streptomycin

DRK Ulm, Helmholtzstr. 10, D-89081 Ulm
Humanes AB- Serum
Pooled, filtrated; For Research Use Only
Not for transfusion!
100 ml
Eingefroren..

Proteine, Zytokine für die Generierung von moDCs

R & D Systems
rhGM- CSF
Recombinant human (E. coli-derived)

rhIL-4
Interleukin 4
Recombinant human (E. coli-derived)

Isolierung CD14+ und CD4+ Zellen

BIOCHROM AG
Biocoll Separating Solution
Isotonic solution
Density 1,077 g/ml

Miltenyi Biotec GmbH
CliniMACS®
PBS/EDTA Buffer
Modifiziert

QuadroMACS™ Separator

Miltenyi Biotec GmbH
MACS® Separation Columns
LS Columns

CD 14 MicroBeads, human

CD4+ T- Cell Isolation Kit, human

FACS

Becton Dickinson:
FACScan

PC: MAC
Mac OS 9.2.2

BD CellQuest™
Version 3.3

Propidium Iodide, Calibrite Beads, Permeabilisierung der Zellen

SIGMA- ALDRICH – P4864- 10ML
Propidium iodide solution (1,0 mg/ml in water)

Calibration Beads:
BD Biosciences
CaliBRITE™3

BD Perm/Wash™
Perm/ Wash Buffer
Size: 100ml

BD Cytofix™
Fixation Buffer
Size: 100ml
BD FACSFlow™
BD FACSFlow Sheath Fluid

FACS- Antikörper

BD Pharmingen™

PE- Cy™5 Mouse IgG1 kappa isotype control

FITC Mouse IgG1 kappa isotype control

FITC anti-human CD8

PE-Cy™5 Mouse IgG1 kappa isotype control

PE-Cy™5 Mouse anti-human CD4

PE Mouse anti-Human FoxP3
(clone 259D/C7)

FITC Mouse anti-Human CD25

PE Mouse IgG1 kappa isotype control

PE anti-human CD80

FITC Mouse anti-human CD86

PE Mouse anti-human CD86

PE Mouse anti-human CD40

BD Pharmingen
Human FoxP3 Buffer Set

BD FACS™
BD FACSRinse Solution
5L

Fresenius Kabi
Ampuwa für Spülzwecke Plastipur®
1L

FACS- Stain
DPBS + 0,2% BSA (hitzeinaktiviert)

BSA (hitzeinaktiviert)

PE-Cy™5 Mouse anti-human CD40

Becton Dickinson U.K. Limited

Mouse IgG1 PerCP-CE (X40)
Mouse gamma 1

CD8 PerCP (SK1) -CE
Mouse IgG1 CD8

CFSE- Färbung

Invitrogen
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit

RT- PCR

QIAGEN®
RNeasy® Mini Kit

RNase- Free DNase Set

Onmiscript® RT Kit

Applied Biosystems®
TaqMan® Fast Universal Master Mix (2X),
No AmpErase® UNG

S100A4= Hs00243202_m1
GAPDH= Hs02758991_g1
7500 Fast Real-Time PCR System

WST-1- Assay:

Platereader
BMG Labtech
POLARstar Omega

WST-1- Reagenz
Roche
Cell Proliferation Reagent (WST-1)

Rekombinante Proteine, Antikörper

Rekombinantes S100 A4, HMGB1

PROSPEC
S100A4 His Human
Size 20µg/20µl

S100A4 Human
Size 10µg/100µl

rhS100-A4
recombinant human (E. coli- derived)

R & D Systems:
rhHMGB1
recombinant human (NSO- derived)

Antikörper

GENOVAC
Anti- S100A4
Clone: NJ-4F3-D1
V= 67µl C=1,5mg/ml

Anti- hTLR2
Purified Mouse Monoclonal IgG2B
Clone 383936

Isotypkontrollen

R & D Systems:
IgG1 Isotype control
Purified Mouse Monoclonal IgG1
Clone 11711

IgG2B Isotype control
Purified Mouse Monoclonal IgG2B
Clone 20116

Blutentnahme:

Nadeln

Terumo

SURFLO Winged Infusion Set

21G x ¾”

V=0,42ml

Adapter

Greiner bio-one

Vacuette®

HOLDEX®

EDTA- Röhrchen

Greiner bio-one

Vacuette® 9ml

K3EDTA

2.2. Methoden

2.2.1. Tumorzellkultur

Kultur von vier Tumorzelllinien:

- CACO 2 → humanes Kolon Adenokarzinom
- HCT- 116 → humanes Kolonkarzinom
- Colo-678 → humanes Kolonkarzinom
- Hela → humanes Zervixkarzinom

Die Tumorzelllinien wurden gemäß den Empfehlungen des Leibnitz- Institut DMSZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH alle 2 bis 3 Tage mit "Ethylenediaminetetraacetic acid" (EDTA)-Trypsin passagiert. Als Kulturmedium diente "Dulbecco's modified eagle medium" (DMEM) High Glucose mit einem 10% igen Zusatz von humanem Serum. Als Kulturflaschen kamen die drei Flaschengrößen der Firma Thermo Scientific – Nunclon Delta Surface 25, 75, 175 cm² zum Einsatz.

2.2.2. Zellisolation von Immunzellen für Stimulationsversuche

Gewinnung von Buffy- Coat/ "Peripheral blood mononuclear cells" (PBMC)

Zwischen 5 und 8 Röhrchen EDTA- Blut eines Spenders wurden 1:1 mit "Dulbecco's phosphate buffered saline" (DPBS) vermischt. 20 ml dieser Mischung wurden in je ein 50 ml Falcon- Röhrchen gegeben. Im sogenannten Underlay-Verfahren wurden jeweils 13 ml BioColl Separating Solution unter die Blut- DPBS- Mischung pipettiert. Anschließend wurde zur weiteren Gewinnung des Leukozytenfilms nach dem Isolationsprotokoll des Herstellers verfahren.

Isolierung von CD14+ Monozyten aus peripherem Blut

Zunächst wurde nach dem in 2.2.2. beschriebenen Verfahren PBMC aus dem Vollblut gewonnen. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte erneut die Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten bei 400 G. Anschließend wurde zur Isolierung der CD14+ Monozyten nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec verfahren. Das bei der

Isolierung aufgefangene Eluat wurde separat von den CD14+ Zellen in ein grosses 50 ml Falcon- Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 400G wurden alle Zellen in DMEM High Glucose mit 10%igem humanem Serum resuspendiert. Abschliessend erfolgte eine Zellzählung.

Generierung von moDC's mit IL- 4 und GM- CSF

Die in 2.2.3. erhaltenen CD14+ Zellen wurden anschließend in 20 ml DMEM- High-Glukose Medium mit einem 10%igen Zusatz an humanem Serum resuspendiert. Es wurde rekombinantes humanes Interleukin 4 der Firma R&D- Systems® in einer Konzentration von 500 U/ml und rekombinantes humanes GM- CSF der gleichen Firma in einer Konzentration von 1000 U/ml zugegeben. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Zellzahl, von 10 Mio. bis zu 20 Mio., in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit Nunclon Delta Oberfläche gegeben. Nach 2 bis 3 Tagen in einem Inkubator (relative Luftfeuchtigkeit von 100 %, Sauerstoffgehalt von 20 %, Kohlendioxidgehalt von 5%) wurden 10 ml des oben erwähnten Mediums, mit doppelter Zytokinkonzentration, vorgewärmt dazugegeben. Nach weiteren 2 bis 3 Tagen wurden die stimulierten Zellen als sogenannte unreife dendritische Zellen (iDCs) betrachtet und für die durchgeführten Versuche verwendet.

Anmerkung:
Ab dem Zeitpunkt der Generierung von iDCs wurden alle Versuchsschritte mit auf 37°C vorgewärmten Reagenzien durchgeführt. Dies sollte verhindern, dass ein zusätzlicher Maturierungsreiz bei den generierten iDCs ausgelöst wird. Ebenso wurde angestrebt, die Anzahl der Pipettierschritte möglichst gering zu halten.

Gewinnung von PBL/ CD14 negative PBMC

Das bei der Gewinnung von CD14+ Zellen aufgefangene Eluat, welches alle CD14- Zellen enthielt, wurde zusammengeführt und 5 Minuten bei 400 G zentrifugiert. Anschließend wurde es in DMEM High Glucose mit 10% igem Serum Zusatz resuspendiert. Bis zu 40 Mio. Zellen wurden in 30ml des oben angegebenen Mediums in 175cm² große Zellkulturflaschen gegeben. Diese Zellen wurden während der Generierung der moDCs

ebenfalls im Inkubator aufbewahrt und später für eine Kokultur verwendet. Es erfolgte kein Zytokinzusatz und kein Mediumwechsel.

Gewinnung von CD4+ T- Zellen zur Kokultivierung mit stimulierten Dendritischen Zellen

Analog zur Isolierung von CD14+ Monozyten wurde zuerst PBMC per Biocoll-Dichtegradient gewonnen. Dann wurde das CD4+ T Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Bei diesem Kit werden die CD4+ T- Zellen negativ selektiert. Alle unerwünschten Zellen wurden durch magnetische Microbeads entfernt. Die Durchführung erfolgte nach dem Isolationsprotokoll des Herstellers.

2.2.3. Stimulation der unreifen dendritischen Zellen

Es wurden jeweils 300.000 bis 400.000 iDC in jeweils 500µl DMEM- High- Glukose mit 10% Serumzusatz auf die Wells einer 24-Well Platte verteilt. Die äußeren Wells wurden mit jeweils 800µl DPBS gefüllt, um Volumenverluste durch Verdunstung im Inkubator zu verringern. Anschließend wurden die zu untersuchenden Stoffe zugegeben. Tumorlysate in den entsprechenden Verdünnungsstufen in je 5 µl Gesamtvolumen. Antikörper wurden in den entsprechenden Konzentrationen ohne vorherigen Verdünnungsschritt zugegeben, ebenso wie die entsprechenden Isotypkontrollen und alle verwendeten rekombinanten Proteine. Zu den unbehandelten Kontrollkonditionen wurde 5 µl DPBS zugegeben. Die zugegebenen Volumina der spezifischen Antikörper, rekombinanten Proteine, Isotypkontrollen betrugen weniger als 5 µl. Danach wurden die Zellkulturplatten für 3 bis 4 Tage in den Inkubator gegeben. Nach dieser Zeit wurden die DCs als stimuliert betrachtet.

2.2.4. Ansetzen der Kokultur mit PBMC oder PBL

Ernten der DCs zum Ansetzen einer Kokultur

Generierte unreife Dendritische Zellen (iDC) wurden für 3 Tage mit unterschiedlichen Tumorlysaten oder rekombinanten Proteinen stimuliert. Danach wurden die iDCs gewaschen, um Tumorlysat oder Proteine zu entfernen. Die iDCs wurden nach diesem

Arbeitsschritt als stimulierte/ maturierte Dendritische Zellen bezeichnet (mDC). Anschließend wurden sie zu Lymphozyten des gleichen Spenders (autologes System) oder zu Lymphozyten eines fremden Spenders gegeben (allogenes System). Eine Kokultur über unterschiedlich lange Zeiträume schloss sich an.
Um eine Kokultur ansetzen zu können, wurden die mDC in zwei Durchgängen mit vorgewärmtem EDTA geerntet und in 15 ml Falcon- Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 400 G wurde der Überstand verworfen und die mDCs in 1,2 ml DMEM High Glucose mit 10, 36, oder 70% Serumzusatz resuspendiert.

Kokultur mit "Peripheral blood lymphocytes" (PBL)

Die Zellkulturflasche mit den "Peripheral blood lymphocytes" (PBL) wurde in ein 50 ml Falcon überführt und erneut mit warmem EDTA ausgespült. Dieses wurde ebenfalls in das 50 ml Falcon gegeben. Eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 400G folgte. Es wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in DMEM High Glucose mit 10% Serumzusatz resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Falls parallel Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an Serum durchgeführt werden sollten, wurde die benötigte Anzahl an Zellen aufgeteilt. Erneut erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 400 G bei der anschließend der Überstand verworfen und in DMEM High Glucose mit dem entsprechenden Serumzusatz (10, 36, 70% Serum) resuspendiert wurde. Jeweils 100.000 PBL in 140µl Medium und 10.000 mDCs in 140 µl Medium wurden in die Wells einer 96 Well Platte gegeben. Es wurden 96-Well Platten mit einem flachen, und runden Boden verwendet.

Kokultur mit "Peripheral blood mononuclear cells" (PBMC)

Es erfolgte die Isolation von PBMC aus frischem Vollblut. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die PBMC in dem entsprechenden Medium resuspendiert. Analog zu den Kokulturen mit PBL wurden auch bei PBMC verschiedene Konzentrationen an Serum verwendet. Die Verteilung auf die 96- Well Platten erfolgte analog zu dem Vorgehen bei einer PBL- DC Kokultur. Hierbei fanden nur 96- Well Platten mit flachem Boden Verwendung.

2.2.5. Proliferationsassay mit CFSE- gefärbten Lymphozyten

Ansetzen und Färbung eines CSFE-Proliferationsassays

Es handelt sich um eine Abwandlung der in Hawkins et al. beschriebenen Vorgehensweise [21]. Zuerst wurden PBMCs per Biocoll-Dichtegradient gewonnen und die Zellzahl bestimmt. Dann wurden nach Herstellerangaben 5 Mio Zellen pro ml gefärbt. Das CFSE wurde in einer Hälfte des Färbemediums aufgelöst und mit den Zellen, welche bereits mit dem Rest des Färbemediums resuspendiert worden waren, vermischt. Dies sollte zum einen eine gleichmäßigere Färbung gewährleisten und zum anderen die Toxizität der Färbung verringern. Als Färbemedium diente DMEM High Glucose mit 10% Serumzusatz. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend in der 3 bis 4- fachen Menge des ursprünglichen Färbevolumens zweimal gewaschen. Zudem erfolgte die Zellzahlbestimmung und Einstellung der Konzentration auf 100.000 Zellen pro 140 µl. Die mDCs wurden in 140 µl Versuchsmedium (mit 10, 36, oder 70% Serumzusatz) in die Wells einer 96- Well Platte mit flachem Boden gegeben. Auf jede Kondition, bzw. in jedes Well mit mDCs wurde 140 µl der CFSE gefärbten PBMC- Zellsuspension gegeben. Die äußeren Reihen wurden mit 200 µl DPBS gefüllt um Verluste durch Verdunstung zu verhindern. Von jeder Stimulationskondition wurden Duplikate oder Triplikate erstellt. Es wurden eine bis sechs identische Platten erstellt. Sollte eine Oberflächenfärbung erfolgen, wurden auch ungefärbte Lymphozyten verwendet, welche in einer Kokultur mit mDCs ebenfalls auf die Platte gegeben wurden. Die beschickten Platten wurden während der gesamten Kokulturdauer im Inkubator für Zellkultur aufbewahrt. Während der gesamten Kokulturdauer fand kein Mediumwechsel statt.

Messung eines CFSE-Proliferationsassays

Zunächst wurde ein Tropfen Calibrite Beads auf 1 ml FACS- Flow gegeben und anschliessend die Bead- Konzentration auf 30.000 Beads pro 40 µl eingestellt. Von dieser Suspension wurde eine ausreichende Menge für die Messung aller Platten eines Versuches hergestellt. Zusätzlich wurde vor jeder Messung die Konzentration in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und schriftlich festgehalten. In 5 ml Falcon Round- Bottom Tubes wurden für jede Kondition jeweils 100 µl FACS- Flow vorgelegt und 40 µl (30000 Calibration Beads) zugegeben. Für die Zugabe der Calibration Beads wurde für alle

Röhrchen die gleiche Pipettenspitze verwendet. Die Zugabe der Beads erfolgte im Reverse pipetting- Verfahren, um die Genauigkeit der zugegebenen Flüssigkeitsmenge zu erhöhen. Die zu messende Platte wurde 5 Minuten bei 400 G zentrifugiert. Anschließend wurde 100 µl Überstand abgenommen und durch 100 µl EDTA ersetzt. Jede Kondition wurde einzeln in die vorbereiteten Messröhrchen pipettiert, das Well nochmals mit 100µl EDTA ausgespült und überführt. Nun erfolgte die Zugabe von 20 µl gebrauchsfertiger Propidium Iodide Lösung mit anschließender Messung. Die letzten Pipettierschritte wurden jeweils kurz vor der Messung durchgeführt.

Gating und Erfassung eines CFSE-Proliferationsassays

Die Datenerfassung erfolgte mit dem Programm Cell- Quest in der Version 3.3. Es wurden Gates für Lymphozyten und für Calibrite Beads erstellt. Zur Messung der Proben wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson verwendet. Die Probenmessung erfolgte so lange, bis im Gate der Calibrite Beads mindestens 1000 Events erfasst waren.

2.2.6. Anfärbung von Oberflächenmarkern und Parallelfärbung von FoxP3 und CD25 für die durchflusszytometrische Analyse

Anfärbung von Oberflächenmarkern

Die zu messende Platte wurde für 5 Minuten bei 400G zentrifugiert. Anschließend wurde 3/4 des Überstandes abgenommen und verworfen. Falls adährente Zellen untersucht werden sollten wurde 37°C warmes EDTA zugegeben und für 10 Minuten im Inkubator inkubiert. Danach wurde zentrifugiert und erneut 3/4 des Überstandes verworfen. Mit FACS- Stain wurde auf mindestens 200µl pro Kondition aufgefüllt und resuspendiert. Nun wurde mindestens ein Triplikat auf jeweils zweimal 100µl pro Well in einer neuen Platte aufgeteilt. Im Anschluss erfolgte die Anfärbung mit spezifischen Antikörpern oder mit der korrespondierenden Isotypkontrolle. Dabei wurde nur ein Viertel der vom Hersteller angegebenen Menge des Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 30 Minuten im Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellen mit FACS- Stain in zwei Durchgängen gewaschen, um zum Schluss eine durchflusszytometrische Untersuchung durchzuführen.

Parallelfärbung von CD25 und FoxP3, Permeabilisierung mit dem FoxP3 Buffer Set der Firma BD Pharmingen

Dieses Protokoll beruht auf dem Herstellerprotokoll und wurde modifiziert, sodass alle Schritte auf einer 96- Well Platte erfolgen konnten. Beim Ansatz des Experiments verfügte jedes Well der 96 Well Platte über 280 µl Gesamtvolumen. Bei jedem der nachfolgenden Schritte mit Volumenzugabe erfolgte die Resuspendierung der Zellen im Well. Die zu messende Platte wurde zunächst für 5 Minuten bei 400 G zentrifugiert. Dann wurden 140 µl Überstand abpipettiert und auf eine neue 96- Well Platte gegeben. Diese wurde eingefroren um später eine Zytokinbestimmung aus dem Überstand durchzuführen. Die Wells wurden mit 140 µl FACS- Stain erneut aufgefüllt und die Zellen in der Platte resuspendiert. Anschließend wurde ein Triplikat zu jeweils 100 µl auf 2 Wells in einer neuen Platte aufgeteilt. Die aufgeteilten Triplikate wurde mit 100 µl FACS- Stain aufgefüllt. Aus den restlichen Triplikaten wurden jeweils 200 µl entnommen und ebenfalls auf die neue Platte gegeben. Nun wurden zur Zellzahlbestimmung eine vorher bestimmte Anzahl an Calibrite Beads in jeweils 30 µl Volumen zugegeben. Es folgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 G mit anschließendem Abnehmen von 160 µl Überstand, welcher verworfen wurde. Dann wurden 60 µl FACS- Stain zugegeben und resuspendiert. Nun erfolgte die CD25 Färbung durch Zugabe von 3 µl Anti- CD25 Antikörper zu allen Konditionen, außer zu einer Reihe an Exemplaren die vorher auf zwei Wells aufgeteilt worden waren. In diese wurde 3 µl der korrespondierenden Isotypkontrolle gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Ein Waschschritt erfolgte, in dem 160 µl FACS- Stain ausgetauscht wurde. Es folgte die erneute Zentrifugation mit dem Verwerfen von 220 µl Überstand. Anschließend folgte die Resuspendierung der Zellen in 200 µl Fixation Buffer (Buffer A aus dem Human FoxP3 Buffer Set). Darauf folgte die erneute Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Nach diesem Schritt sank die Adhärenz der Zellen. Bei Abnahme der Überstände musste besonders vorsichtig vorgegangen werden. Im anschließenden Waschschritt wurden 200 µl FACS- Stain erstetzt und erneut zentrifugiert. Es folgte die Abnahme von 200 µl Überstand und die Resuspendierung der Zellen in 75 µl Buffer C mit anschließender Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung der Zellen. Dann wurden 125 µl FACS- Stain zugegeben,

anschließend erfolgte die Zentrifugation und die Abnahme von 200 µl Überstand mit nachfolgendem Ersatz durch 200 µl FACS- Stain. Eine weitere Zentrifugation und Abnahme von 200 µl Überstand folgte. Bevor intrazellulär mit FoxP3 gefärbt werden konnte erfolgte die zugabe von 60 µl FACS- Stain. Nun befanden sich etwas mehr als 100 µl Gesamtvolumen in jedem Well. Durch Zugabe von 3 µl FoxP3 Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle pro Well erfolgte nun die intrazelluläre Färbung und die Inkubation im Dunkeln bei Raumtemeperatur für 30 Minuten. Ein Waschschritt mit Zugabe von 100 µl FACS- Stain und anschließender Zentrifugation folgte. Noch weitere zwei Mal wurden jeweils 200 µl Überstand verworfen und mit FACS-Stain aufgefüllt, dazwischen erfolgte die Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen. Nach diesem Schritt waren die Zellen bereit um im Durchflusszytometer gemessen zu werden.

Anmerkung: Zur Anfärbung der Kombination von CD25 und FoxP3 sollte das entsprechende Färbe- Set des Herstellers verwendet werden. In dieser Arbeit wurde das Human FoxP3 Buffer Set von BD Pharmingen verwendet. Bei Verwendung von Cytofix/ Cytoperm zur Permeabilisierung kommt es zu einer wesentlich schwächeren Färbung die eine Diskriminierung der Zellen fast unmöglich macht. Dies ist in der Präsentation von Jurg Rohrer zu sehen und wurde während der Laborarbeiten zu der vorliegenden Arbeit mehrfach nachvollzogen [41]. Ebenso sollte zum Waschen der Zellen FACS- Stain verwendet werden.

2.2.7. Messung der Stoffwechselaktivität mittels WST-1 Assay

Messung mit dem WST-1 Assay

Die Stoffwechselaktivität von PBL- DC und PBMC- DC Kokulturen wurde bestimmt. Bei einigen Versuchen wurde zuerst die Stoffwechselaktivität bestimmt und anschließend die Proliferation mittels CFSE in der Durchflusszytometrie ermittelt. Am Tag der Messung wurde zu jeder Kondition 10µl WST-1 mit einer Mehrkanalpipette zugegeben. Dann wurden Messungen nach bestimmten Inkubationszeiten durchgeführt. Alternativ wurde über einen Zeitraum von 1 bis 4 Stunden bei 37°C kontinuierlich alle 10 Minuten gemessen. Es wurde die Absorption bei 440 nm mit einem POLAR- Star Omega Plate-

Reader der Firma BMG- Labtech gemessen. Falls Messungen über längere Zeiträume durchgeführt wurden, war die geräteinterne Heizfunktion auf 37°C eingestellt. Erfolgte nur eine Messung nach einer bestimmten Inkubationszeit wurden die Zellen bis zum Zeitpunkt der Messung bei 37°C im Inkubator für Zellkultur aufbewahrt.

Auswertung des WST-1 Assay

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit der Software MARS Data Analysis Software von BMG Labtech in der Version 1.10.
Als mögliche Auswertungsmodi kamen die folgenden zum Einsatz: Bei den Einzelmessungen wurden jeweils aus den Absorptionswerten der Triplikate das arithmetische Mittel gebildet. Diese Absorptionswerte wurden zu einem bestimmten Zeitpunkt als Rohdaten inklusive Standardabweichung angegeben oder es erfolgte eine Normierung auf unbehandelte Kontrollkonditionen. Die meisten Versuche wurden jedoch über einen Zeitraum von 1 bis 3 Stunden alle 10 Minuten gemessen. Dann wurde eine andere Methode zur Auswertung der Daten verwendet. Zunächst wurden im Programm die Absorptionswerte gegen die Zeit aufgetragen und ein Zeitraum von einer Stunde bestimmt, in dem die gezeigten Kurven einen annähernd linearen Verlauf hatten. Dieser Zeitraum wurde als Messzeitraum definiert und war für alle Konditionen eines Versuchs gleich. Aus den Triplikaten der entsprechenden Konditionen wurde das arithmetische Mittel für die jeweiligen Einzelmessungen berechnet. Anschließend wurde die Funktion „Slope/hr“ auf den Messzeitraum angewendet. Der erhaltene Wert gab somit die Änderung der Absorption pro Stunde innerhalb des Messzeitraumes an, was mathematisch der Steigung der vorher konstruierten Kurve nahe kommt. Danach wurde auf eine unbehandelte Kondition normiert und das Ergebnis als „Steigerung des Zellmetabolismus“ in Prozent angegeben.

2.2.8. Auswertung FACS

Auswertung durchflusszytometrischer Daten nach der Vorläufer Frequenz, Precursor Frequency, %dividing cells

Zur Auswertung der mittels FACS erhaltenen Daten wurde das Programm Summit V 4.2 der Firma DAKOCytomation verwendet. Auf alle Lymphozyten wurde ein Gate gesetzt. Es wurde so groß gewählt, dass auch die sich gerade teilende Population, welche etwas größer ist und einen höheren Wert für die Granularität aufweist, mit erfasst wurde. Diese Daten wurden in einem Histogramm für den Floureszenskanal 1 dargestellt. Um den Anteil der nicht proliferierten Zellen zu definieren wurde zunächst eine unbehandelte Kondition dargestellt. Die nicht proliferierten Zellen befanden sich auf der rechten Seite des Histogramms und hatten die höchste Floureszensintensität. Populationen mit einer niedrigeren Floureszensintensität wurden als proliferiert betrachtet. Ein Marker wurde auf diese Populationen gesetzt. Percent divided gibt somit den prozentualen Anteil einer Population an, die über eine geringere Floureszensintensität als eine vorher definierte Ausgangspopulation verfügt.

Abb. 1

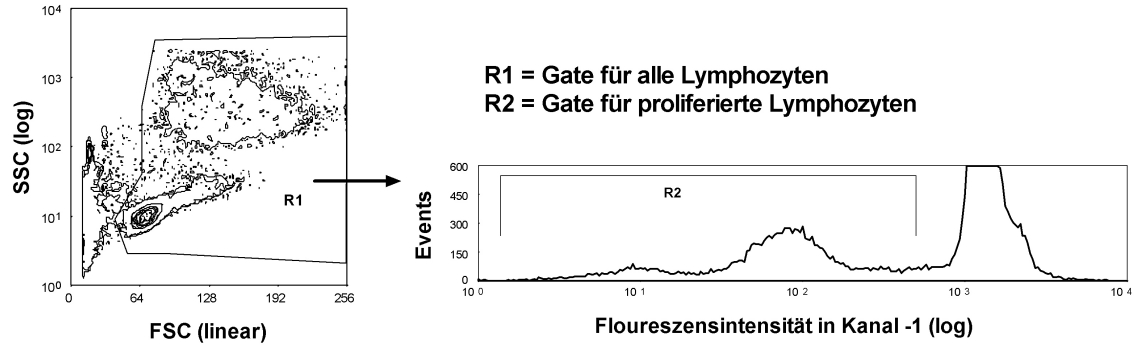

Abb.1.: FACS/ CFSE, Gates für Vorläufer Frequenz, Precursor Frequency, %dividing cells. Programm zur Auswertung: Summit V4.2. Gates wurden wie gezeigt definiert. R1 beinhaltet alle Lymphozyten. R2 beinhaltet Lymphozyten die sich mindestens einmal teilten. (FACS= Flourescence activated cell sorting, CFSE= Carboxyfluorescein succinimidyl ester, FSC= Forward scatter, SSC= Side scatter, log= logarithmische Skala)

Identifizierung von CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T- Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse

In einem "Forward scatter" - "Side scatter" FSC/ SSC Dot- Plot wurde ein Gate auf alle Lymphozyten gesetzt (R1) und ein zweites auf die Calibrite Beads (R2). Nun wurden alle Events aus R1 in einem Dot- Plot mit den Parametern FL-1 CD25/FITC und FL-2 FoxP3/PE dargestellt. Mit Hilfe der Isotypkontrolle wurden die Quadranten R3,R4,R5,R6 so bestimmt, dass die Events der Isotypkontrolle in R3,R4,R6 stets unter einem Prozent lagen. Dann wurden die eingestellten Quadranten für die komplette Auswertung einer Messreihe nicht mehr verändert.

Um die absolute Zellzahl angeben zu können wurde die Anzahl der zugegebenen Calibrite Beads durch R2 geteilt. Das Ergebnis wurde mit R1 multipliziert. Dieses Ergebnis gab an wieviele Lymphozyten sich insgesamt in einer Probe befinden, auch wenn nur ein Bruchteil der gesamten Probe in der Durchflusszytometrie gemessen wurde. Abschliessend wurde mit dem prozentualen Anteil der Zellen aus R4 die absolute Anzahl der CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T- Zellen errechnet.

Abb. 2

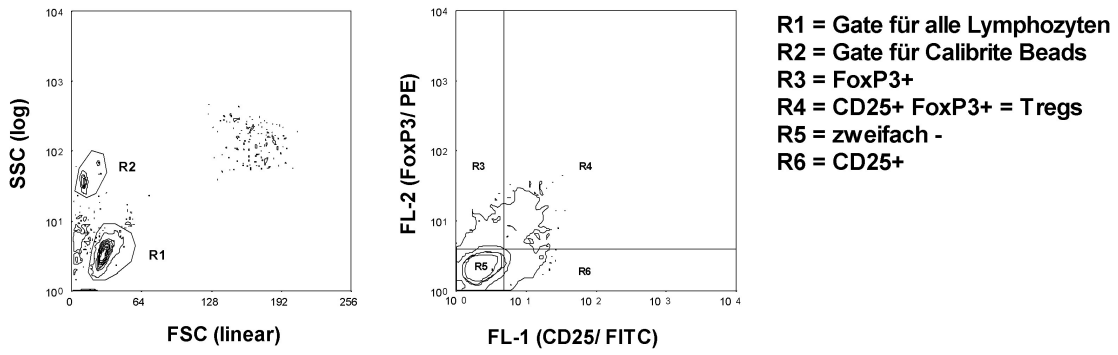

Abb.2.: FACS/CD25/FoxP3, Gates zur Erfassung von CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen. Programm zur Auswertung: Summit V4.2. Gates wurden wie gezeigt definiert. Als regulatorische T-Zellen wurden alle Events in R4 betrachtet. (FACS= Flourescence activated cell sorting, FSC= Forward scatter, SSC= Side scatter, log= logarithmische Skala, FL-1/2= Floureszensintensität in Kanal 1/2, FITC= Fluoresceinisothiocyanat, PE= Phycoerythrin, Tregs= Regulatorische T- Zellen, FoxP3= Forkhead box P3)

2.2.9. Sequenzielle Messung mittels WST-1 und FACS

Um per FACS erhaltene Daten für eine Lymphozytenproliferation zu verifizieren, bedienten wir uns des WST-1-Assays, welches gleichzeitig die Lebendigkeit der Zellen sicherstellte. Einige Versuche wurden also zuerst mit dem WST-1-Assay gemessen und anschließend mittels Durchflusszytometrie weiter untersucht.

2.2.10. Quantitative Real- Time- PCR (qRT-PCR)

Mittels des TaqMan Gene Expression Assays wurde die Genexpression von S100A4 (Entrez Gene ID 6275/ UniGeneHs.654444) und HMGB1 (Entrez Gene ID 3146) in den Tumorzelllinen COLO-2, CACO-678, HCT-116, HELA und in humanen Fibroblasten untersucht. Als Housekeeping Gene wurden ACTB, GAPDH und RN18S1 verwendet. Jede Probe wurde als Plus- und Minus- RT- PCR Ansatz angesetzt. Die RNA wurde mit den beiden Kits RNeasy® Mini Kit und dem RNase-Free DNase Set der Firma QIAGEN® nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Mit dem Omniscript® RT Kit wurde die cDNA für die weitere Analyse mittels des TaqMan Assays hergestellt. Es wurde das TaqMan® Gene Expression Assay FAM verwendet. Pro qPCR- Reaktion wurden 310ng (+/- 10%) cDNA eingesetzt. Die Datenanalyse erfolgte mit der Gerätesoftware von Applied Biosystems® 7500 System SDS v2.0.4 und Microsoft Office Excel 2003.

2.2.11. Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Auswertung von Messdaten erfolgte in Microsoft Office Excel 2003 mit den programminternen Formeln: "Student t Test" (TTEST) und "Standard Deviation" (SD). Als signifikant wurde ein p-Wert von unter 0,05, als hochsignifikant ein p-Wert von unter 0,03 betrachtet. Der "Standard Error of the Mean", bzw. der mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM) wurde berechnet, indem der Wert für SD durch die zweite Wurzel aus n geteilt wurde. Als n wurde die Anzahl der für die Berechnung verwendeten Versuche oder Konditionen eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Proliferationsinduzierende Wirkung von Tumorlysat und DAMPs auf Lymphozyten

3.1.1. Mit HCT-116 Tumorlysat stimulierte DCs steigern den Metabolismus in einer autologen Kokultur mit Lymphozyten

Für den Ansatz der Kokulturen wurden verschiedene Arten von Leukozytensubpopulationen verwendet. Zum einen wurden CD14 depletierte PBL verwendet, die nach der MACS-CD14+ Isolation aufgefangen wurden. Diese wurden 8 Tage *in vitro* kultiviert und anschließend mit DAMP- stimulierten DCs kokultiviert. Im weiteren Verlauf werden diese als PBL bezeichnet. Alternativ wurden am Tag der Kokultur frisch isolierte PBMC verwendet. Beide verwendeten Leukozytenpopulationen zeigten einen gesteigerten Zellmetabolismus, falls die DCs vor dem Ansatz der Kokultur mit HCT-116 Tumorlysat stimuliert wurden. Wurden frisch isolierte PBMC verwendet, war nach Stimulation mit der höchsten Konzentration an HCT-116 Tumorlysat die Steigerung des Zellmetabolismus signifikant erhöht im Vergleich zu den PBL die 8 Tage *ex vivo* kultiviert wurden.

Abb.3

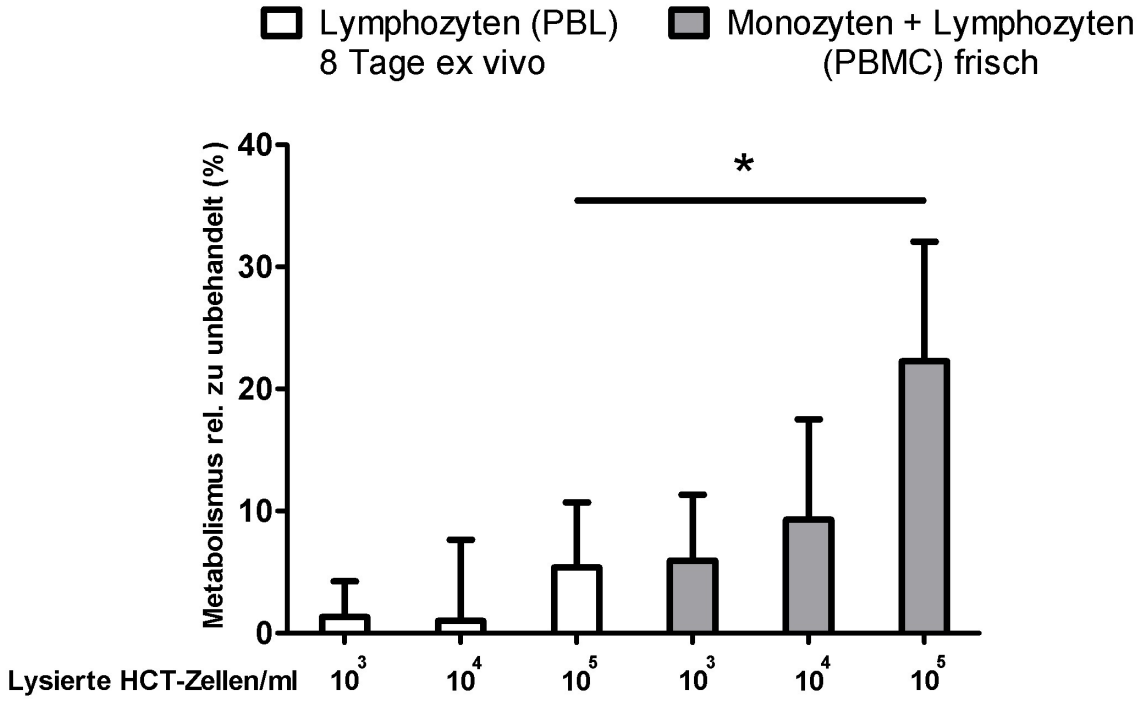

Abb.3. Frisch gewonnene PBMC und 8 Tage *ex vivo* kultivierte PBL zeigen ein vergleichbares Proliferationsverhalten bei gleichen Stimulationsbedingungen in einer autologen Kokultur mit stimulierten DCs. Die Stimulation der DCs erfolgte mit HCT-116 Tumorlysat. Eine Kokultur mit autologen frischen PBMC oder autologen PBL wurde angesetzt. Die Messung erfolgte nach 5-6 Tagen mittels WST-1 Assay. Gezeigt sind die Daten von 4 unabhängigen Versuchen. Mittelwerte +/- SEM, *= signifikant in einem zweiseitigen Student's T-test. (WST-1= Water soluble tetrazolium 1, DCs= Dendritische Zellen, PBL= Peripheral blood lymphocytes, PBMC= Peripheral blood mononuclear cells, rel. zu= relativ zu, SEM= mittlerer Fehler des Mittelwertes)

3.1.2. HCT-116 Tumorlysat und rekombinantes S100A4 Protein steigern den Zellmetabolismus einer autologen Kokultur vergleichbar stark, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Eine Stimulation der DCs mit dem Tumorlysat, das aus HCT-116 gewonnen wurde, bewirkte, dass diese DCs in der anschließenden 3-4 tägigen Kokultur mit autologen Lymphozyten eine Steigerung des Metabolismus der Lymphozyten bewirkten. Wurde mit S100A4 stimuliert, so kam es nach der gleichen Kokulturdauer zu einer wesentlich geringeren Steigerung des Lymphozytenmetabolismus. An den Tagen 5 bis 6 einer autologen Kokultur führte die Stimulation mit S100A4 zu einer höheren Steigerung des Zellmetabolismus im Vergleich zu einer Stimulation mit HCT-116 Tumorlysat.

Abb.4a

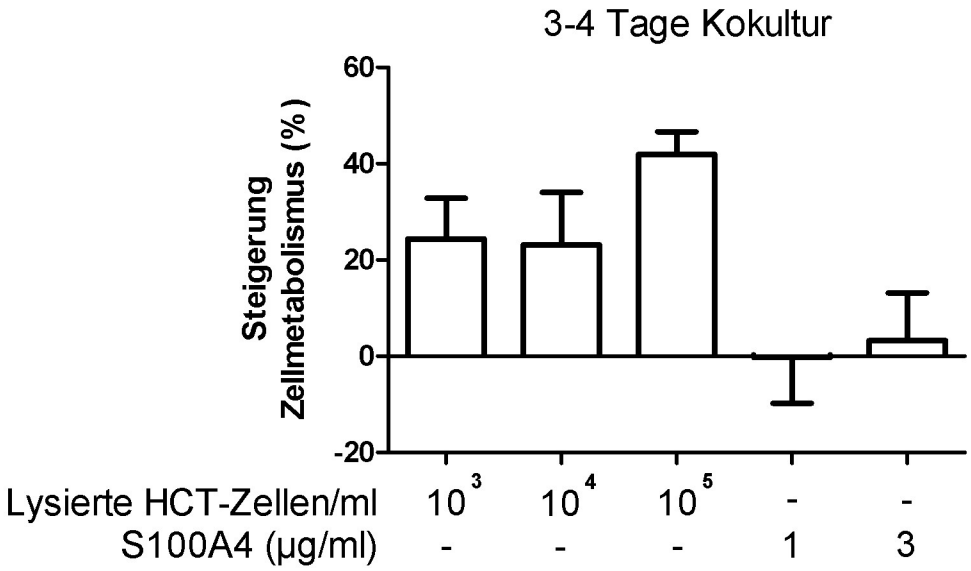

Abb.4b

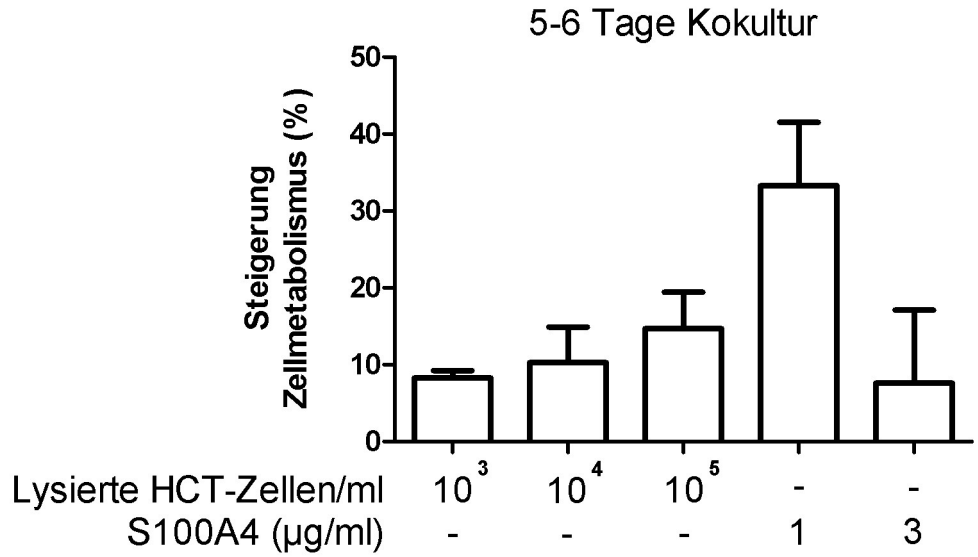

Abb.4a/b.: Metabolismus einer autologen DC- PBMC Kokultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten. DCs wurden mit HCT-116 Tumorlysat oder rekombinantem S100A4 stimuliert und in einer autologen PBMC Kokultur für 3- 4 Tage (4a) oder für 5- 6 Tage (4b) angesetzt. Die Messung des Stoffwechsels erfolgte mittels WST-1 Assay. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen +/- SEM. (WST-1= Water soluble tetrazolium 1, DCs= Dendritische Zellen, PBMC= Peripheral blood mononuclear cells, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, SEM= mittlerer Fehler des Mittelwertes)

3.2.1. Mit DAMPs stimulierte DCs induzieren die Proliferation autologer Lymphozyten

DCs, die zuvor mit HCT-116 Tumorlysat oder dem rekombinantem DAMP-Protein S100A4 stimuliert wurden, induzierten die Proliferation von autologen Lymphozyten in der Kokultur. Der gemessene Anstieg des Metabolismus wurde durch den durchflusszytometrischen Nachweis einer Lymphozytenproliferation bestätigt. Das ebenfalls verwendete DAMP-Protein HMGB1 zeigte keinen proliferationsinduzierenden Effekt.

Abb.5a

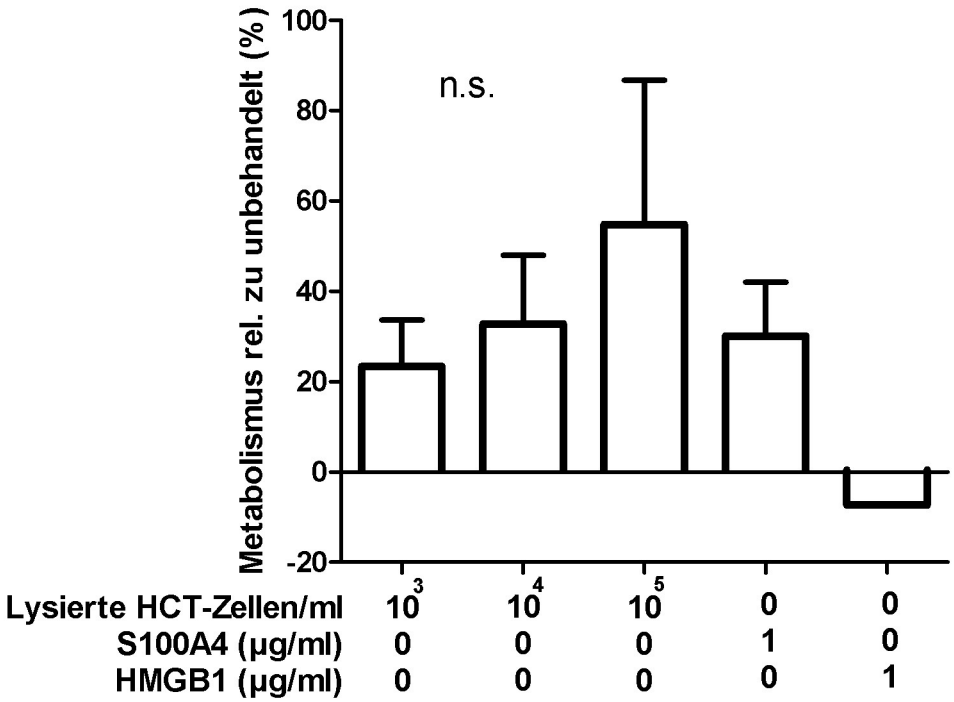

Abb.5a: HCT-116 Tumorlysat und S100A4 steigern den Zellmetabolismus einer autologen DC- PBMC Kokultur, HMGB1 hingegen nicht. DCs wurden mit HCT-116 Tumorlysat, rekombinantem S100A4 und rekombinatem HMGB1 stimuliert und anschließend mit autologen PBMC für 4-6 Tage kokultiviert. Angegeben sind die Messungen von 3 unabhängigen Versuchen welche mittels WST-1 Assay gemessen wurden. Angegeben ist die Steigerung des Zellmetabolismus im Vergleich zur unbehandelten Kondition (DPBS). Mittelwert +/- SEM. HMGB1 wurde nur in 2 Versuchen gemessen. (DPBS= Dulbecco's phosphate buffered saline, WST-1= Water soluble tetrazolium 1, HMGB1= High mobility group protein B1, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, DCs= Dendritische Zellen, PBMC= Peripheral blood mononuclear cells, rel. zu= relativ zu, n.s.= nicht signifikant in einem zweiseitigen Student's T-test, SEM= mittlerer Fehler des Mittelwertes)

Abb.5b

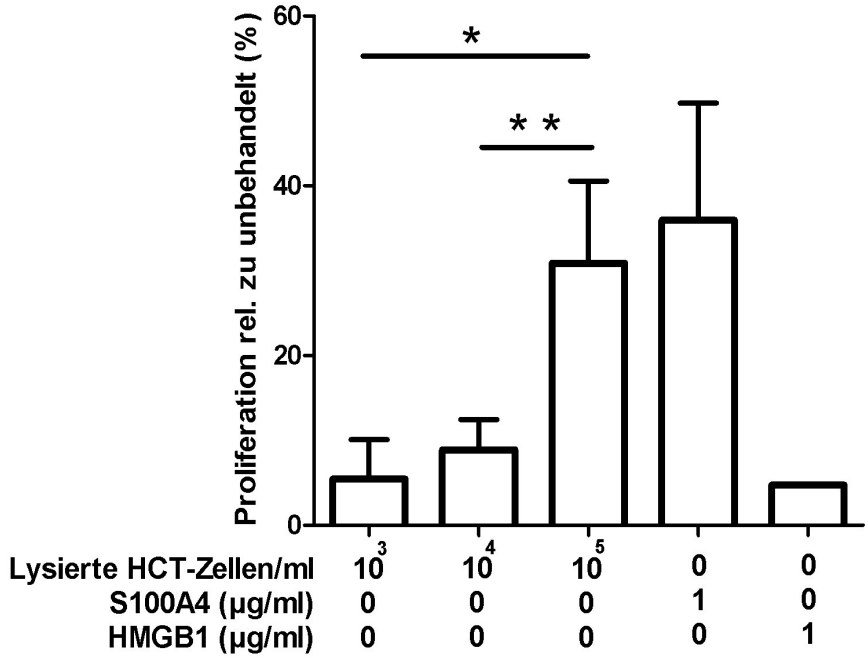

Abb.5b: HCT-116 Tumorlysat und S100A4 steigern die Proliferation einer autologen DC-PBMC Kokultur, HMGB1 hingegen nicht. DCs wurden mit HCT-116 Tumorlysat, rekombinantem S100A4 und rekombinatem HMGB1 stimuliert und anschließend mit autologen PBMC für 4-6 Tage kokultiviert. Angegeben sind die Messungen von 3 unabhängigen Versuchen welche mittels FACS gemessen wurden. Angegeben ist die Steigerung der Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kondition (DPBS). Mittelwert +/- SEM, *= signifikant, **= hoch signifikant jeweils in einem zweiseitigen Student's T-test. HMGB1 wurde nur in 2 Versuchen gemessen. (FACS= Flourescence activated cell sorting, DPBS= Dulbecco's phosphate buffered saline, HMGB1= High mobility group protein B1, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, DCs= Dendritische Zellen, PBMC= Peripheral blood mononuclear cells, rel. zu= relativ zu, SEM= mittlerer Fehler des Mittelwertes)

3.3. Nachweis von S100A4 in verschiedenen Tumorlysaten mittels quantitativer RT-PCR

Um S100A4 in den Tumorlysaten nachzuweisen, verwendeten wir zunächst ein semiquantitatives PCR Verfahren bei dem ein 133 Basenpaare großes Amplicon von S100A4 in HCT-116 Tumorlysat nachwiesen werden konnte. Als nächstes wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt, in der S100A4 mRNA in allen verwendeten Tumorlysaten nachgewiesen wurde. Den höchsten Gehalt an S100A4 mRNA enthielt HCT-116 Tumorlysat.

Abb.6

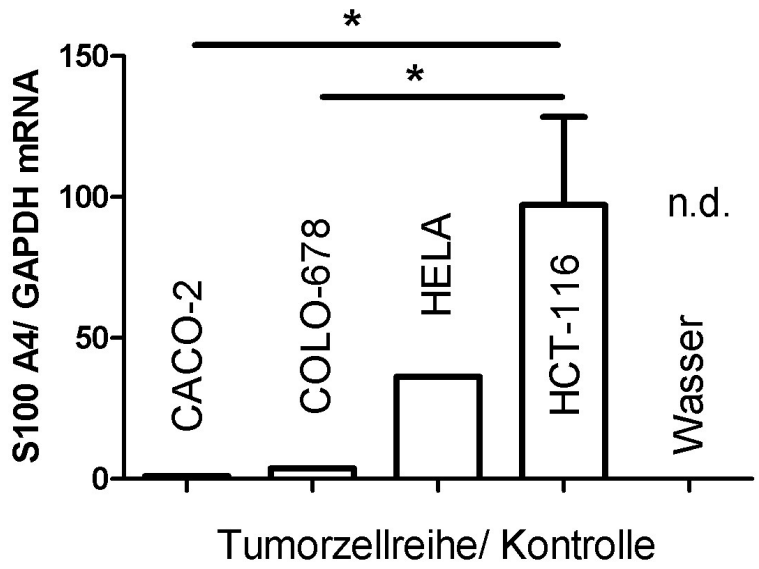

Abb.6.: Tumorzelllysate von HCT-116- und HELAzellen enthalten mehr S100 A4 mRNA als Lysate der Tumorzellreihen CACO-2 oder COLO-678. RT-qPCR; Referenzgen GAPDH. Untersuchte Zelllinien: Kolonkarzinomzelllinien HCT-116, CACO-2, COLO-678, Zervixkarzinomzelllinie HELA. Alle Zelllinien bis auf HELA wurden als Triplikate gemessen. Die Ergebnisse wurden auf die Werte von CACO-2 Tumorzelllysat normiert. Mittelwert +/- SEM, *= signifikant in einem einseitigen Students T-test. (GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, mRNA= Messenger RNA, RNA= Ribonucleic acid, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, n.d.= nicht detektierbar)

Eigene Abbildung aus: Lotfi R, Wiegmann DS, Asseck L, Erle A, Yildiz T, et al. (2012) Necrosis-Associated Factors (DAMPs) Including S100A4 Used to Pulse Dendritic Cells (DCs) Induce Regulatory T cells. J Cell Sci Ther 3:134. doi: 10.4172/2157-7013.1000134. (modifiziert)

3.4. Die Proliferationsinduzierende Wirkung von HCT-116 Tumorlysat lässt sich durch Zugabe von Anti-S100A4 verringern

Wenn DCs mit einem HCT-116 Tumorlysat stimuliert wurden, dessen S100A4-Konzentration durch den Einsatz spezifischer Anti- S100A4 Antikörper deutlich gesenkt wurde, zeigte sich mit ansteigender Antikörperkonzentration eine Abnahme des Metabolismus der Lymphozyten, die sich in der Kokultur mit den genannten DCs befanden.

Abb.7

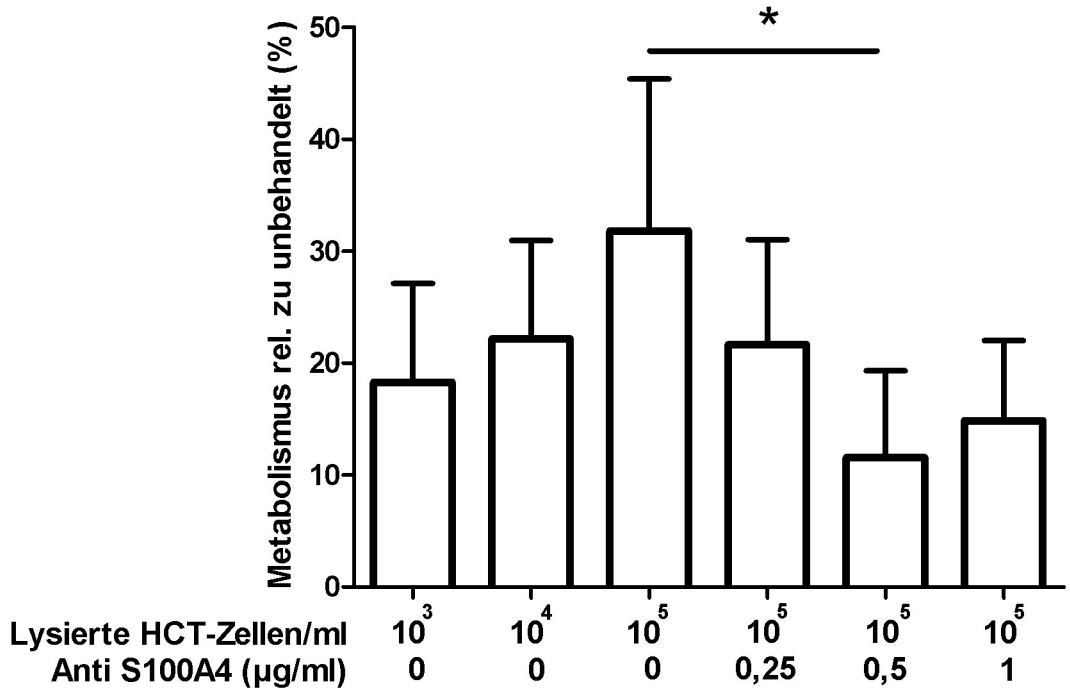

Abb.7.: Antikörper gegen S100A4 verringern konzentrationsabhängig einen durch HCT-116 Tumorlysat erhöhten Zellmetabolismus. Stimulation der DCs mit HCT-116 Tumorlysat in ansteigender Konzentration. Zusätzlich zur höchsten Konzentration von HCT-116 Tumorlysat ansteigende Konzentrationen eines Antikörpers gegen S100A4. Ansetzen einer autologen Kokultur. Der Zellmetabolismus wurde mittels WST-1 Assay ermittelt. Die Steigerung bezieht sich jeweils auf unbehandelte Konditionen (DPBS) . Gezeigt sind die Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. Zwei der Versuche wurden in der Kokultur parallel mit frischen PBMC und PBL (8 Tage ex vivo) angesetzt. Mittelwert +/- SEM, *= signifikant ein einem zweisetigen Students T-test. (Anti S100A4= IgG1Antikörper gegen S100A4, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, rel. zu= relativ zu, DPBS= Dulbecco's phosphate buffered saline, WST-1= Water soluble tetrazolium 1, DCs= dendritische Zellen, SEM= mittlerer Fehler des Mittelwertes)

3.5. Proliferationsinduzierende Wirkung von verschiedenen Tumorlysaten in einem allogenen System

CFSE markierte PBMC wurden mit allogenen DCs kokultiviert, die zuvor mit Tumolysat stimuliert wurden. Mittels FACS wurde nach 3-5 Tagen die Proliferation gemessen.Wenn die DCs mit HCT-116, bzw. HELA- Tumorlysat stimuliert wurden, zeigte sich nach 3 Tagen Kokultur ein leichter Anstieg der proliferierten Lymphozytenpopulation. Nach 5 Tagen Kokultur zeigte sich für die jeweils höchsten Konzentrationen von HCT-116 bzw. Hela- Tumorlysat starke Anstiege der Lymphozytenproliferation. Allogene DCs, die mit rekombinantem S100A4 stimuliert wurden bewirkten keine Proliferation allogener Lymphozyten in der Kokultur.

Abb.8

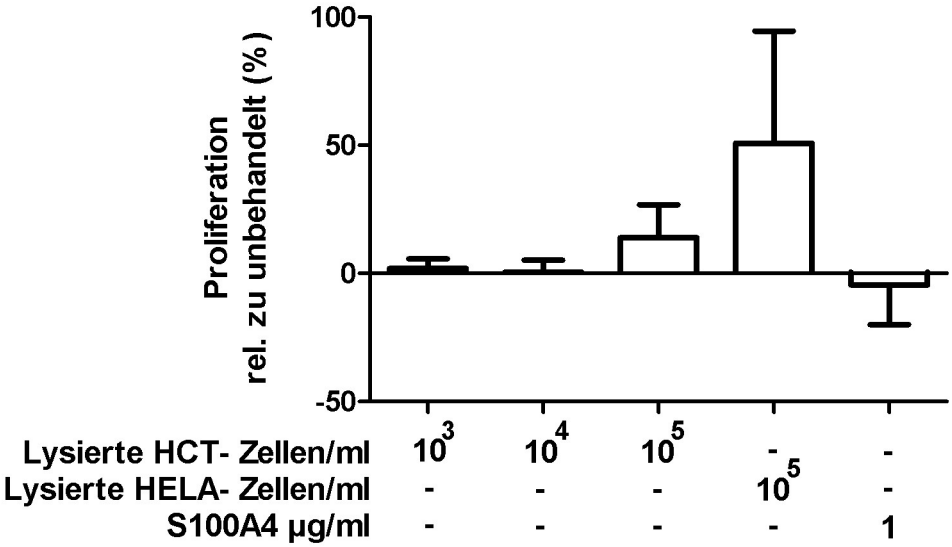

Abb.8.: Stimulation von allogenen DCs mit HCT-116- oder HELA- Tumorlysat zeigt eine proliferationsinduzierende Wirkung. Stimulation der DCs mit HCT-116-, HELA- Tumorlysat, oder S100A4. Ansetzen einer allogenen DC- PBMC Kokultur für 5 Tage. Die Proliferation wurde mittels FACS/ CFSE ermittelt. Gezeigt ist die Proliferation der Lymphozyten relativ zur unbehandelten Kondition (DPBS). Gezeigt sind Daten aus 2 unabhängigen Versuchen. Mittelwert +/- SD. (FACS= Flourescence activated cell sorting, CFSE= Carboxyfluorescein succinimidyl ester, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, rel. zu= relativ zu, DCs= dendritische Zellen, DPBS= Dulbecco's phosphate buffered saline)

3.6. Nachweis einer erhöhten Anzahl von CD4+CD25+FoxP3+ Lymphozyten (regulatorische T-Zellen/ Tregs) in einer autologen Kokultur von stimulierten DCs mit CD4+ Lymphozyten

Es wurde eine Kokultur mit CD4+ Lymphozyten und stimulierten DCs angesetzt. Die Stimulation der DCs erfolgte mit rekombinantem S100 A4-Protein. Diese Stimulation führte in der Kokultur zu einem erhöhten Anteil an CD4+CD25+ T-Zellen. Auch der Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen war erhöht, wenn die DCs vorher mit S100 A4 stimuliert wurden. Die Depletion von S100A4 durch die Zugabe von Anti-S100A4 zum Tumorlysat inhibierte die oben genannte Wirkung.

Abb.9

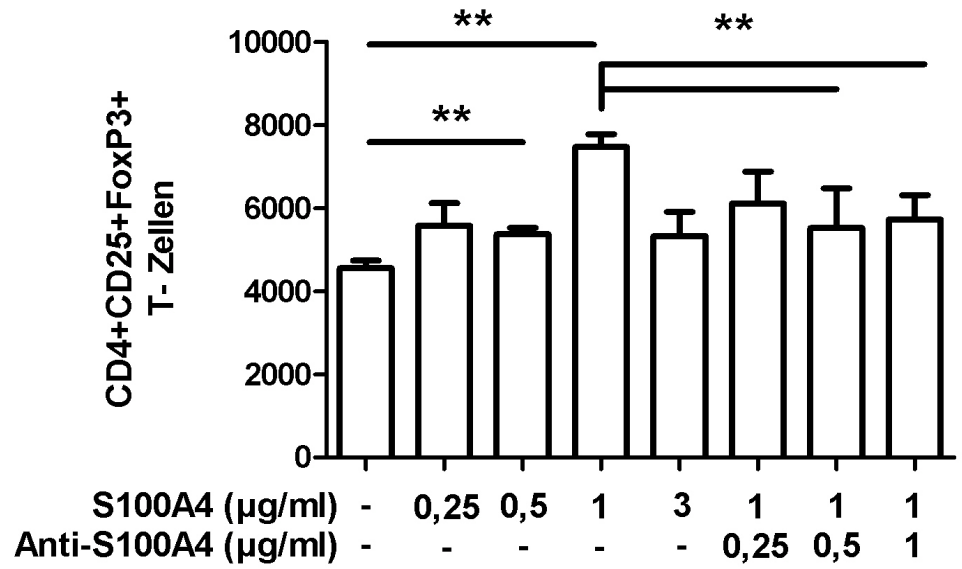

Abb.9.: Stimulation von DCs mit rekombinantem S100A4 steigert konzentrationsabhängig die Gesamtzahl an CD4+CD25+FoxP3+ T- Zellen in einer autologen DC- CD4+ Kokultur. Die Stimulation der DCs erfolgte mit rekombinantem S100A4, rekombinantem Anti- S100A4. Ansetzen einer autologen Kokultur für 4 Tage. Extrazelluläre Färbung mit CD25, intrazellulär mit FoxP3. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Versuches. Mittelwert +/- SD, **= hochsignifikant in einem zweiseitigen Students T-test. (FoxP3= Forkhead box P3, Anti-S100A4= IgG1 Antikörper gegen S100A4, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, DCs= dendritische Zellen, SD= Standardabweichung)

Abb.10

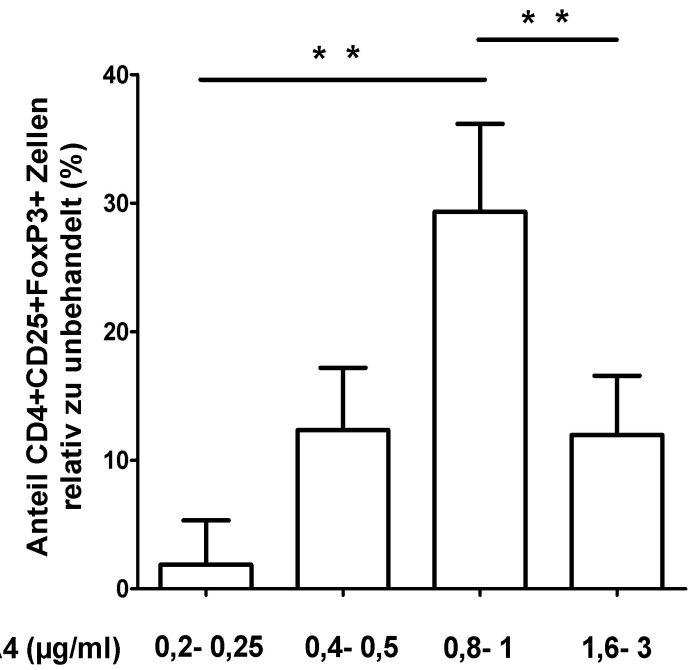

Abb.10.: Stimulation von DCs mit S100A4 induziert regulatorische T-Zellen in einer autologen DC- CD4+ Kokultur. Stimulation der DCs erfolgte mit rekombinantem S100A4. Ansetzen einer autologen Kokultur für 4 Tage. Die Färbung für die FACS- Messung erfolgte extrazellulär mit CD25 und intrazellulär mit FoxP3. Gezeigt sind die Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. Mittelwert +/- SEM, **= hochsignifikant in einem zweiseitigen Students T-test. (DCs= Dendritische Zellen, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, FoxP3= Forkhead box P3, SEM= mittlerer Fehler des Mittelwertes)

Eigene Abbildung aus: Lotfi R, Wiegmann DS, Asseck L, Erle A, Yildiz T, et al. (2012) Necrosis-Associated Factors (DAMPs) Including S100A4 Used to Pulse Dendritic Cells (DCs) Induce Regulatory T cells. J Cell Sci Ther 3:134. doi: 10.4172/2157-7013.1000134. (modifiziert)

3.7. Anstieg des IL-10 Gehaltes im Überstand einer Kokultur von stimulierten DCs mit CD4+ Lymphozyten

Eine Stimulation von DCs mit S100A4 führt nach 6 Tagen in einer Kokultur mit autologen CD4+ Lymphozyten zu einer Erhöhung von IL-10 im Kulturmedium.

Abb.11

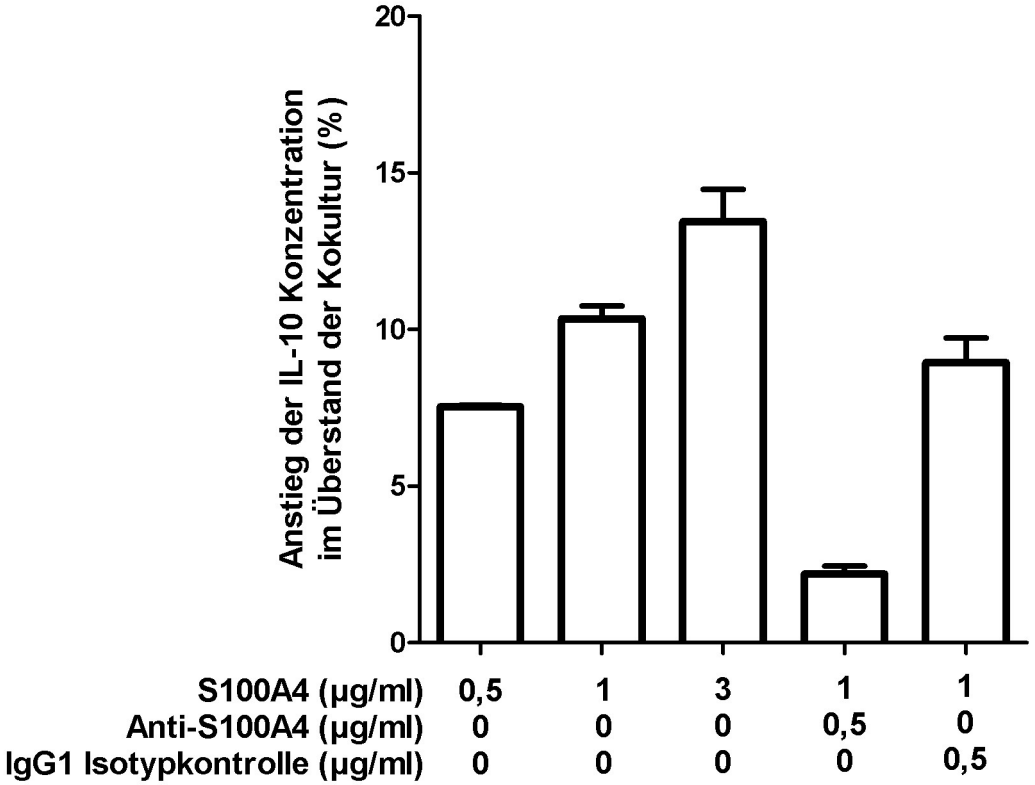

Abb.11. Stimulation von DCs mit S100A4 erhöht den IL-10 Gehalt im Überstand einer autologen Kokultur von DCs mit CD4+ Lymphozyten. Messung von Duplikaten eines Versuches mittels Milliplex Assay. Angegeben sind die Messwerte eines Versuchs mit den zugehörigen Standardabweichungen. (DCs= Dendritische Zellen, S100A4= Soluble in 100% saturated ammonium sulfate A4, IL-10= Interleukin 10, IgG1= Immunglobulin vom Typ G1)

Eigene Abbildung aus: Lotfi R, Wiegmann DS, Asseck L, Erle A, Yildiz T, et al. (2012) Necrosis-Associated Factors (DAMPs) Including S100A4 Used to Pulse Dendritic Cells (DCs) Induce Regulatory T cells. J Cell Sci Ther 3:134. doi: 10.4172/2157-7013.1000134. (modifiziert)

4. Diskussion

4.1. DAMPs induzieren eine phenotypische und funktionelle Maturierung von dendritischen Zellen (DCs)

Wir konnten bereits nachweisen, dass durch die Stimulation von DCs mit HCT-116 Tumorlysat ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Maturierungsmarker CD40, CD80 und CD86 auf den stimulierten DCs induziert wird [23]. Konsistent mit dem reifungsinduzierenden Effekt des Tumorlysats auf DCs, wird in der vorliegenden Dissertation gezeigt, dass DCs, die mit HCT-116 Tumorlysat bzw. rekombinantem S100A4 stimuliert wurden, einen deutlichen proliferationsinduzierenden Effekt auf kokultivierte Lymphozyten haben. In der Arbeit von Steinman et al. wird darauf hingewiesen, dass viele Autoren eine Maturierung von DCs nur an der verstärkten Expression von Oberflächenmarkern wie zum Beispiel CD40, CD80 und CD86 festmachen. Diese phänotypische Maturierung geht jedoch laut Steinman et al. nicht notwendigerweise mit einer funktionellen Maturierung einher [49]. Die hier vorliegenden Daten, in Zusammenschau mit den von Herzog et al. publizierten bestätigen, dass eine Stimulation mit HCT-116 Tumorlysat zu einer phänotypischen sowie zu einer funktionellen Maturierung von DCs führt. Die mittels Tumorlysat maturierten DCs sind dazu in der Lage Lymphozyten zu einer Proliferation anzuregen. Das verwendete WST-1 Assay, das als Bestätigung für die mittels FACS ermittelten Daten diente, ist zugleich ein Nachweis für die Viabilität der proliferierten Zellen [11]. Ein alternativer Nachweis der Viabilität wäre zum Beispiel auch mit Hilfe einer 7-Aminoactinomycin- oder einer Propidium Idodid Färbung in der Durchflusszytometrie möglich gewesen. Durch die Verwendung des WST-1 Assay konnte zunächst der Stoffwechsel der Zellen bestimmt werden und in einem nächsten Schritt bei den gleichen Zellen eine Oberflächenfärbung oder eine Proliferationsmessung mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Bezüglich der verwendeten Lymphozyten lässt sich aus den vorliegenden Daten herauslesen, dass es zumindest keinen qualitativen Unterschied macht ob zum Ansatz der Kokultur frisch isolierte PBMC oder PBL verwendet werden, die zuvor 8 Tage *ex vivo* kultiviert wurden. Ein quantitativer Unterschied ist sehr wohl auszumachen, proliferieren die PBMC in einer

autologen Kokultur doch signifikant stärker. Unklar bleibt ob dieser Unterschied auf die in PBMC enthaltenen Monozyten oder auf die 8 Tage dauernde *in vitro* Kultivierung der PBL zurückzuführen ist. Die Messung des Stoffwechsels erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Kokultur. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus dass eine Stimulation mit HCT-116 Tumorlysat und eine Stimultation mit rekombinantem S100A4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu einem scheinbaren Proliferationsmaximum führten. Dies war zunächst unerwartet da wir davon ausgingen dass S100A4 als relevanter Bestandteil von HCT-116 Tumorlysat ebenfalls einen vergleichbaren proliferationsinduzierenden Effekt hat. Möglicherweise werden durch eine Stimulation mit Tumorlysat zunächst mehr konventionelle T-Zellen (Tconv) zur Proliferation angeregt als bei einer Stimulation mit S100A4. Die Arbeit von Zou et al. legt dar dass zu einer Proliferation von Tregs die Interaktion von DCs, Tconv und Tregs notwendig sind [61]. Die Autoren beschreiben dass durch eine Interaktion von DCs mit Tconv die letzteren zur Ausschüttung von IL-2 angeregt werden das laut den Autoren für eine Proliferation von Tregs notwendig ist [61]. Das Verhältnis von DCs zu Tconv liegt in der Arbeit von Zou et al. zwischen 1,4:1 und 7,1:1. In der vorliegenden Arbeit jedoch wurden Verhältnisse von DCs zu Tconvs von 1:10 verwendet, also hier sind die Lymphozyten im Überschuss. Dies mag auch der Grund für den nicht nachweisbaren IL-2 Gehalt in der vorliegenden Arbeit sein. Laut Zou et al. brauchen die Tconv den direkten Kontakt zu DCs um ausreichend IL-2 zu produzieren [61]. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von CD4+CD25+FoxP3+ Tregs aber nur in einer Kokultur mit CD4+ Lymphozyten durchgeführt. So kann die Frage ob in einer Kokultur mit PBMC parallel Tregs und Tconv zur Proliferation angeregt wurden mit den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

4.2. Ein DAMP- Prototyp: HMGB1 zeigt keine Wirkung

Der Einsatz von rekombinantem HMGB1 führte in den durchgeführten Versuchen nicht zu einer Proliferationssteigerung. Wir führen diesen Umstand darauf zurück, dass es sich um rekombinantes HMGB1 handelt welches laut Pisetsky et al. auch bei anderen Arbeitsgruppen nur eine schwache oder gar keine immunologische Wirkung aufweist [38]. Im Gegensatz dazu steht HMGB1, das aus nekrotischen Zellen entstanden ist [7]. Laut Bianchi et al. führt es zu einer Maturierung von DCs die in der Folge allogene T-Zellen zu

einer Proliferation anregen [7]. Laut den Autoren von Pisetsky at al. ist die immunologische Wirkung von rekombinantem HMGB1 auf Komplexbildungen mit IL-1, LPS und anderen HMGB1- Molekülen zurückzuführen, sie werden dann DAMP-DAMP, oder DAMP-PAMP- Komplexe genannt [38].
In der vorliegenden Arbeit wurden alle Arbeitsschritte unter sterilen und pyrogenfreien Bedingungen durchgeführt. In den erwähnten Arbeiten in Bianchi et al., bei denen rekombinantes HMGB1 eine Wirkung zeigte, wurden entweder die Versuche an Tieren durchgeführt was eine Vermeidung von LPS sicherlich unmöglich machte [55]. Oder es kam rekombinantes HMGB1 mit einem angegebenen Endotoxingehalt von unter 600 pg/µg zum Einsatz [1]. In der vorliegenden Arbeit wurde rekombinantes HMGB1 mit einem Endotoxingehalt von unter 10 pg/µg verwendet. Somit ist denkbar, dass das verwendete HMGB1 in der Arbeit von Andersson et al. eine bis zu 60 fache Menge an Endotoxinen enthielt. Dennoch ist es durchaus vorstellbar, dass ein Teil der gezeigten HCT-116 Tumorlysatwirkung auf HMGB1 zurückzuführen ist, das rekombinante Protein alleine, jedoch keinen oder zumindest nur einen sehr schwachen Effekt hatte.

4.3. Nachweis von S100A4 in Tumorzelllysat

Nachdem wir herausgefunden hatten dass HCT-116 Tumorlysat und S100A4 jeweils getrennt voneinander zu einer Maturierung von DCs führten, stellte sich nun die Frage ob S100A4 vielleicht in HCT-116 Tumorlysat enthalten ist. Es wurde mehrere Tumorlysate untersucht, jedoch speziell in HCT-116 Tumorlysat wurde ein hoher Gehalt an S100A4 mRNA gefunden. Dass S100A4 in HCT-116 Tumorlysat enthalten ist, wird auch durch die Ergebnisse von Sack et al. bestätigt [44]. Die Autoren machen eine Funktionsgewinn-Mutation von β-catenin und die damit verbundene Intranukleäre Erhöhung des β-catenin-Gehaltes für die massive Überexpression von S100A4 in HCT-116 Tumorzellen verantwortlich [44]. Die Promotorregion von S100A4 zeigt laut Sack et al. eine direkte Regulation durch den β-catenin/ TCF Komplex [44]. Laut den Autoren hängt bei HCT-116 Tumorzellen die Zellmotilität und die Invasion direkt vom S100A4 Gehalt ab und konnte signifikant durch die Gabe von S100A4siRNA reduziert werden [44]. Als Referenzgen für die RT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit GAPDH gewählt, da es selbst unter

Hypoxiebedingungen stabil in Karzinomzelllinien exprimiert wird. Speziell für die Kolonkarzinomzellinie HCT-116 ist dies in der Arbeit von Said et al. beschrieben [45].

4.4. Antagonisierung der Lysatwirkung mittels Anti-S100A4

Nachdem nachgewiesen wurde, dass S100A4 in relevanten Mengen in HCT-116 Tumorlysat enthalten ist, galt es die immunologische Wirkung auf DCs zu antagonisieren. Dies gelang durch den Einsatz von rekombinanten Antikörpern. Es kann mit Hilfe dieser Informationen vermutet werden, dass es sich bei S100A4 um einen relevant wirksamen Bestandteil von HCT-116 Tumorlysat handelt. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch die Möglichkeit, dass es sich bei der Antagonisierung der Tumorlysatwirkung um einen unspezifischen Effekt des rekombinanten Antikörpers handelt. Die Autoren der Studie von Bayry et al. beschreiben einen hemmenden Effekt von IgG Antikörpern auf die Maturierung von DCs [3]. Ab einer bestimmten Konzentration von IgG können die DCs, laut den Autoren, nur noch eine schwache Lymphozytenproliferation induzieren [3]. Genau wie in der vorliegenden Arbeit wurden die generierten DCs mit Antikörpern des IgG Typs stimuliert, gewaschen und erst anschließend in eine Kokultur mit allogenen oder autologen Lymphozyten gegeben. Es handelt sich bei den verwendeten Antikörpern in der Arbeit von Bayry et al. jedoch nicht um rekombinante monoklonale Antikörper, sondern um humane polyklonale IgG Antikörper, die aus dem Blut von vielen Spendern gepoolt wurden und normalerweise als intravenöse Immunglobuline verwendet werden [3]. Auch sind die verwendeten Konzentrationen von IgG in Bayry et al. viel höher als in der vorliegenden Arbeit (20-35 mg/ml bei Bayry et al. und 0,25-3 µg/ml in der vorliegenden Arbeit) [3]. Ein unspezifischer Effekt der IgG Antikörper lässt sich so nicht ausschließen, jedoch erscheint diese Möglichkeit aufgrund der geringen Mengen an IgG Antikörper die zum Einsatz kamen, eher unwahrscheinlich.

4.5. Semi- mature DCs induzieren regulatorische T- Zellen

Bisher wurde beschrieben, dass DCs bei suboptimaler Stimulation Tregs induzieren [31]. Lutz et al. bezeichneten diese als sogenannte semi mature DCs [31]. In der Arbeit von Maldonado et al. wird eine ähnliche Gruppe von DCs besprochen, die sogenannten

tolerogenen DCs (tDCs), die ebenfalls Tregs induzieren [32]. Diese entstehen laut den Autoren aus iDCs, die *per se* als tolerogen beschrieben werden [32]. Diese iDCs stellen den Ausgangspunkt für die Stimulationsversuche in der vorliegenden Arbeit dar. Hier wurden sie zunächst als moDCs bezeichnet und nach der Stimulation mit Tumorlysaten oder rekombinanten Proteinen wurde von mDCs gesprochen. Eine weitere Maturierung von iDCs kann laut Maldonado et al. über DAMP- oder PAMP Rezeptoren erfolgen [32]. Falls diese Maturierung unterschwellig erfolgt, bilden sich laut den Autoren tDCs. Bei den so induzierten tDCs kommt es zu einer Präsentation von Antigen per MHCII, jedoch mangelt es in der Folge an kostimulatorischen Molekülen oder an der Ausschüttung von Zytokinen [32]. Analog zu der Arbeit von Herzog et al. wurde in dieser Arbeit bei der Stimulation der DCs verfahren [23]. Erkennbar ist bei Herzog et al. eine geringe Hochregulation der B7 kostimulatorischen Moleküle bei Stimulation der DCs mit HCT-116 Tumorlysat. Dennoch ist diese Hochregulation von der Konzentration des HCT-116 Tumorlysates abhängig. Als Positivkontrolle diente in der Arbeit von Herzog et al. LPS, das eine starke Hochregulation der B7- Moleküle bewirkte [23]. Somit scheinen die hier verwendeten Tumorlysate konzentrationsabhängig zu einer unvollständigen Maturierung der DCs zu führen, die dann als tDCs im Sinne von Maldonado et al. verstärkt Tregs induzieren. Auch die Autoren in Janikashvili et al. diskutieren die Rolle von unreifen/ tolerogenen DCs, die durch tumorassoziierte Faktoren in ihrer Differenzierung und Maturierung beeinflusst werden [25]. Janikashvili at al. sprechen auch davon, dass DCs von Tregs in einer Art negativem Rückkoppelungsmechanismus in ihrer weiteren Maturierung beeinflusst werden. So kommt es laut Janikashvili et al. bei fortschreitender Tumorerkrankung zu einem gehäuften Auftreten von Tregs bei den betroffenen Patienten [25]. Auch das gehäufte Auftreten von dysfunktionalen und unreifen DCs ist bei Tumorpatienten beschrieben [28]. Einen Anstieg von regulatorischen T- Zellen in einer DC-Lymphozyten-Kokultur, die vorher mit S100A4 stimuliert wurden, konnte bisher nicht mit Angaben aus der Literatur belegt werden (Stand: 28.10.2012). In der Arbeit von Betts et al. wurden in histologischen Schnitten von Kolonkarzinomen ein erhöhter Anteil an Tregs nachgewiesen [4]. Betts et al. fanden die Tregs vor allem im sogenannten Tumorstroma in der Nähe der Kolonkarzinome [4]. Leider wurde in der Arbeit von Betts et al. keine Aussage bezüglich der S100A4 Expression der untersuchten Kolonkarzinome getroffen [4].

4.6. Nachweis von IL-10 und IL-2 im Überstand der Kokultur

In der hier vorliegenden Arbeit wurden IL-10 und IL-2 bestimmt. Der Gehalt von IL-2 war in dem gemessenen Versuch unterhalb der Nachweisgrenze. Der Gehalt von IL-10 im Überstand der Kokultur korrelierte teilweise mit der Anzahl der regulatorischen T- Zellen. Da nur ein Versuch gemessen wurde kann jedoch keine sichere Aussage bezüglich des IL-10 Gehaltes in einer DC-Lymphozyten Kokultur getroffen werden. Weitere Wiederholungen sind nötig. Unklar bleibt auch, welche Zellpopulation maßgeblich für die IL-10 Produktion verantwortlich ist.

4.7. Mögliche Bedeutung von S100A4 in der Entwicklung von Tumoren

Hohe S100A4 Konzentrationen in Blut oder Histologie stellen sicherlich ein sehr schlechtes Zeichen für den weiteren Verlauf einer Tumorerkrankung dar. Dennoch wäre es meiner Meinung nach falsch S100A4 als Schlüsselelement in der Sequenz einer Tumorerkrankung zu sehen. Vielmehr kann ein hoher S100A4 Gehalt ein Hinweis auf grosse Nekroseareale einerseits, oder auf eine erhöhte Expression in den Tumorzellen andererseits sein. In beiden Fällen wurde in der Tumorevolution ein weiterer Schritt hin zum sog. "Tumour- Escape" getan [15]. Möglicherweise ist es letzlich egal ob S100A4 oder ein anderes Protein der DAMP-Gruppe dazu beiträgt DCs in ihrer Maturierung zu hemmen und in der Folge Tregs zu induzieren. In der Phase des "Equilibrium" einer Tumorerkrankung ist theoretisch alles und jegliche Kombination denkbar. Mit den vorliegenden Daten und der anhängigen Veröffentlichung kann vielleicht ein Zusammenhang hergestellt werden zwischen der Beobachtung dass hohe S100A4 Konzentrationen mit einem schlechten Überleben assoziiert sind und dem Vorkommen von Tregs im Tumorstroma von weit fortgeschrittenen Kolonkarzinomen.

5. Zusammenfassung

Nekrotischer Zelltod stellt ein Hauptmerkmal von fortgeschrittenen soliden Tumoren dar, wobei intra- und extrazelluläre Bestandteile in unphysiologischen Konzentrationen in die Umgebung der zugrunde gegangenen Zelle gelangen. Einige dieser Bestandteile können der Gruppe der "Damage associated molecular patterns" (DAMPs) zugerechnet werden und tragen maßgeblich zur Bildung und Veränderung des Tumormilieus bei. S100A4 und "High mobility group protein B1" (HMGB1) sind zwei Vertreter der DAMP- Gruppe und ersteres ist, wenn es in Biopsien von Kolonkarzinompatienten gefunden wird, ein prognostisch schlechtes Zeichen für die Tumorträger. Eine davon bisher unabhängige Beobachtung ist das gehäufte Auftreten von regulatorischen T- Zellen (Tregs) in Biopsien von Kolonkarzinomen. Auch ihr gehäuftes Vorhandensein ist schlecht für die Prognose der Tumorträger. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage in wiefern die Gruppe der DAMPs zur Veränderung des Tumormilieus und der beteiligten tumorassoziierten Zellen beitragen. Aus vorherigen Untersuchungen war bekannt dass DAMPs einen Einfluss auf die Zellen der angeborenen Immunität haben. So war es nun Ziel dieser Arbeit die Auswirkungen der DAMPs auf die Zellen der adaptiven Immunantwort zu untersuchen. Es wurden humane dendritische Zellen (DCs) mit Tumorlysaten oder rekombinanten Proteinen der DAMP- Gruppe stimuliert und anschließend in einer Kokultur mit allogenen oder autologen Lymphozyten über mehrere Tage beobachtet. Die Proliferation und der Zellstoffwechsel wurde mittels durchflusszytometrischer und kalorimetrischer Verfahren ermittelt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde zusätzlich die Expression von intra- und extrazellulären Markern der eingesetzten Lymphozyten bestimmt. Eine quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion diente dem Nachweis von S100A4 Messenger Ribonukleinsäure in verschiedenen Tumorlysaten. Im Lysat der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 konnte S100A4 als relevant wirksamer Bestandteil identifiziert werden. S100A4 führte zu einer unvollständigen Maturierung von DCs, welche in der Folge Tregs induzierten. Somit besteht die Möglichkeit dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von S100A4 und Tregs in den Biopsien von Kolonkarzinomen besteht. Die folgende Sequenz ist mit Hilfe der hier vorliegenden Daten denkbar. Die Nekrose eines Kolonkarzinoms setzt DAMPs, darunter S100A4 frei. Diese löslichen Bestandteile treffen

in der Nähe des Tumors auf unreife DCs welche in der Folge weiterhin einen unreifen Status aufweisen und diesen verfestigen. Sie sind im weiteren Verlauf die Ursache für die Induktion von Tregs, welche in der Nähe der Tumoren etwaige Immunreaktionen verhindern. Auch Zellen der angeborenen Immunität wie zum Beispiel eosinophile Granulozyten, welche mit ihren reaktiven Sauerstoffspezies zur Inaktivierung der DAMPs beitragen könnten, werden nun in einen inaktiven Zustand versetzt. Einem weiteren Wachstum des Primärtumors steht nichts mehr im Wege. Die sehr vielfältigen beschriebenen Funktionen und Interaktionen von S100A4 mit der Umgebung machen es zu einem interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen an der heterogenen DAMP-Gruppe mit ihren Auswirkungen auf das Immunsystem.

6. Literaturverzeichnis

[1] Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H & Tracey KJ: High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J. Exp. Med.* **192**: pp. 565-570 (2000)

[2] Bacchetta R, Gambineri E & Roncarolo M: Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**: p. 227-35; quiz 236-7 (2007)

[3] Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, Misra N, Donkova V, Pashov A, Chevailler A, Mouthon L, Weill B, Bruneval P, Kazatchkine MD & Kaveri SV: Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood* **101**: pp. 758-765 (2003)

[4] Betts G, Jones E, Junaid S, El-Shanawany T, Scurr M, Mizen P, Kumar M, Jones S, Rees B, Williams G, Gallimore A & Godkin A: Suppression of tumour-specific CD4+ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* : (2011)

[5] Bianchi ME: HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.* **86**: pp. 573-576 (2009)

[6] Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* **81**: pp. 1-5 (2007)

[7] Bianchi ME & Manfredi AA: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **220**: pp. 35-46 (2007)

[8] Boye K & Maelandsmo GM: S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am. J. Pathol.* **176**: pp. 528-535 (2010)

[9] Cabezón T, Celis JE, Skibshøj I, Klingelhöfer J, Grigorian M, Gromov P, Rank F, Myklebust JH, Maelandsmo GM, Lukanidin E & Ambartsumian N: Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int. J. Cancer* **121**: pp. 1433-1444 (2007)

[10] Cho Y, Kim C, Nam S, Yoon S, Lee S, Yoo N, Lee J & Park W: Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **11**: pp. 4852-4856 (2005)

[11] Cook JA & Mitchell JB: Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* **179**: pp. 1-7 (1989)

[12] Donato R: Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* **60**: pp. 540-551 (2003)

[13] Dukhanina EA, Kabanova OD, Lukyanova TI, Shatalov YV, Yashin DV, Romanova EA, Gnuchev NV, Galkin AV, Georgiev GP & Sashchenko LP: Opposite roles of metastasin (S100A4) in two potentially tumoricidal mechanisms involving human lymphocyte protein Tag7 and Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: pp. 13963-13967 (2009)

[14] Dukhanina EA, Yashin DV, Galkin AV & Sashchenko LP: Unexpected deeds of familiar proteins: Interplay of Hsp70, PGRP-S/Tag7 and S100A4/Mts1 in host vs. cancer combat. *Cell Cycle* **9**: pp. 676-682 (2010)

[15] Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**: pp. 137-148 (2004)

[16] Eisenbacher J: (unveröffentlichte Befunde). : (2011)

[17] Foell D, Wittkowski H, Vogl T & Roth J: S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* **81**: pp. 28-37 (2007)

[18] Garrett SC, Varney KM, Weber DJ & Bresnick AR: S100A4, a mediator of metastasis. *J. Biol. Chem.* **281**: pp. 677-680 (2006)

[19] Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G & Ricciardi-Castagnoli P: Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* **2**: pp. 882-888 (2001)

[20] Granucci F, Zanoni I, Feau S & Ricciardi-Castagnoli P: Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO J.* **22**: pp. 2546-2551 (2003)

[21] Hawkins ED, Hommel M, Turner ML, Battye FL, Markham JF & Hodgkin PD: Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nat Protoc* **2**: pp. 2057-2067 (2007)

[22] Hemandas AK, Salto-Tellez M, Maricar SH, Leong AFPK & Leow CK: Metastasis-associated protein S100A4--a potential prognostic marker for colorectal cancer. *J Surg Oncol* **93**: pp. 498-503 (2006)

[23] Herzog GI, Solgi G, Wiegmann DS, Nienhaus C, Schrezenmeier H, Yildiz T & Lotfi R: Quality of tumor lysates used for pulsing dendritic cells is influenced by the method used to harvest adherent tumor cells. *BMC Res Notes* **4**: p. 153 (2011)

[24] Huehn J, Polansky JK & Hamann A: Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?. *Nat. Rev. Immunol.* **9**: pp. 83-89 (2009)

[25] Janikashvili N, Bonnotte B, Katsanis E & Larmonier N: The dendritic cell-regulatory T lymphocyte crosstalk contributes to tumor-induced tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**: p. 430394 (2011)

[26] Kang Y, Jung C, Lee A, Kang W, Oh S & Kang C: Prognostic significance of S100A4 mRNA and protein expression in colorectal cancer. *J Surg Oncol* **105**: pp. 119-124 (2012)

[27] Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P & Vandenabeele P: Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**: pp. 860-875 (2012)

[28] Kvistborg P, Bechmann CM, Pedersen AW, Toh HC, Claesson MH & Zocca MB: Comparison of monocyte-derived dendritic cells from colorectal cancer patients, non-small-cell-lung-cancer patients and healthy donors. *Vaccine* **28**: pp. 542-547 (2009)

[29] Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S, Zhang Z, Pihoker C, Sanda S, Greenbaum C & Buckner JH: Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes* **59**: pp. 407-415 (2010)

[30] Loser K & Beissert S: Regulatory T cells: banned cells for decades. *J. Invest. Dermatol.* **132**: pp. 864-871 (2012)

[31] Lutz MB & Schuler G: Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?. *Trends Immunol.* **23**: pp. 445-449 (2002)

[32] Maldonado RA & von Andrian UH: How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* **108**: pp. 111-165 (2010)

[33] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A & Tschopp J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**: pp. 237-241 (2006)

[34] Matzinger P: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: pp. 991-1045 (1994)

[35] Oslejsková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovsky J, Pavelka K, Klingelhöfer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchy D & Senolt L: Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **48**: pp. 1590-1594 (2009)

[36] Piccinini AM & Midwood KS: DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* **2010**: (2010)

[37] Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stöckl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C & Knapp W: Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **157**: pp. 3850-3859 (1996)

[38] Pisetsky D: Cell death in the pathogenesis of immune-mediated diseases: the role of HMGB1 and DAMP-PAMP complexes. *Swiss Med Wkly* **141**: p. w13256 (2011)

[39] Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H & Andersson U: High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* **10**: p. 209 (2008)

[40] Pletinckx K, Döhler A, Pavlovic V & Lutz MB: Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front Immunol* **2**: p. 39 (2011)

[41] Rohrer J: http://www.bdbiosciences.com/documents/webinar_2010_10_intracellular_flow.pdf . : (21.03.2013)

[42] Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecuadrada JL, Ling K, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F & Banham AH: Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* **35**: pp. 1681-1691 (2005)

[43] Rosin DL & Okusa MD: Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**: pp. 416-425 (2011)

[44] Sack U & Stein U: Wnt up your mind - intervention strategies for S100A4-induced metastasis in colon cancer. *Gen. Physiol. Biophys.* **28 Spec No Focus**: p. F55-64 (2009)

[45] Said HM, Polat B, Hagemann C, Anacker J, Flentje M & Vordermark D: Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions in - vitro. *BMC Res Notes* **2**: p. 8 (2009)

[46] Shi Y, Evans JE & Rock KL: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**: pp. 516-521 (2003)

[47] Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R & Coyle AJ: HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **28**: pp. 367-388 (2010)

[48] Stein U, Burock S, Herrmann P, Wendler I, Niederstrasser M, Wernecke K & Schlag PM: Circulating MACC1 transcripts in colorectal cancer patient plasma predict metastasis and prognosis. *PLoS ONE* **7**: p. e49249 (2012)

[49] Steinman RM: Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* **30**: pp. 1-22 (2012)

[50] Steinman RM & Idoyaga J: Features of the dendritic cell lineage. *Immunol. Rev.* **234**: pp. 5-17 (2010)

[51] Tandler N, Mosch B & Pietzsch J: Protein and non-protein biomarkers in melanoma: a critical update. *Amino Acids* **43**: pp. 2203-2230 (2012)

[52] Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS & Barraclough R: S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br. J. Cancer* **86**: pp. 409-416 (2002)

[53] Valzasina B, Piconese S, Guiducci C & Colombo MP: Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res.* **66**: pp. 4488-4495 (2006)

[54] van Eden W, Spiering R, Broere F & van der Zee R: A case of mistaken identity: HSPs are no DAMPs but DAMPERs. *Cell Stress Chaperones* **17**: pp. 281-292 (2012)

[55] Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A & Tracey KJ: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**: pp. 248-251 (1999)

[56] Wang H, Zhang J, Cui J, Tan X, Li W, Gu J & Lu Y: Expression status of S100A14 and S100A4 correlates with metastatic potential and clinical outcome in colorectal cancer after surgery. *Oncol. Rep.* **23**: pp. 45-52 (2010)

[57] Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K & Steinman RM: Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**: pp. 235-247 (2003)

[58] Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, Tarbell KV, Talmor M, Ravetch JV, Inaba K & Steinman RM: Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: pp. 2758-2763 (2006)
[59] Yanagawa Y & Onoé K: Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J. Immunol.* **178**: pp. 6173-6180 (2007)
[60] Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ, Frank DA & Ritz J: IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **108**: pp. 1571-1579 (2006)
[61] Zou T, Satake A, Ojha P & Kambayashi T: Cellular therapies supplement: the role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and dendritic cells in regulatory T-cell homeostasis and expansion. *Transfusion* **51 Suppl 4**: p. 160S-168S (2011)

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: FACS/ CFSE, Gates für Vorläufer Frequenz, Precursor Frequency, % dividing cells.....23
Abbildung 2: FACS/CD25/FoxP3, Gates zur Erfassung von CD25+FoxP3+ regulatorischen T- Zellen.....24
Abbildung 3: Frisch gewonnene PBMC und 8 Tage *ex vivo* kultivierte PBL zeigen ein vergleichbares Proliferationsverhalten bei gleichen Stimulationsbedingungen in einer autologen Kokultur mit stimulierten DCs.....27
Abbildung 4a/b: Metabolismus einer autologen DC- PBMC Kokultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....28
Abbildung 5a: HCT-116 Tumorlysat und S100A4 steigern den Zellmetabolismus einer autologen DC- PBMC Kokultur, HMGB1 nicht.....29
Abbildung 5b: HCT-116 Tumorlysat und S100A4 steigern die Proliferation einer autologen DC- PBMC Kokultur, HMGB1 hingegen nicht.....30
Abbildung 6: Tumorzelllysate von HCT-116- und HELAzellen enthalten mehr S100A4 mRNA als Lysate der Tumorzellreihen CACO-2 oder COLO-678.....31
Abbildung 7: Antikörper gegen S100A4 verringern konzentrationsabhängig einen durch HCT-116 Tumorlysat erhöhten Zellmetabolismus.....32
Abbildung 8: Stimulation von allogenen DCs mit HCT-116- oder HELA- Tumorlysat zeigt eine proliferationsinduzierende Wirkung.....33
Abbildung 9: Stimulation von DCs mit rekombinantem S100A4 steigert konzentrationsabhängig die Gesamtzahl an CD4+CD25+FoxP3+ T- Zellen in einer autologen DC- CD4+ Kokultur.....34
Abbildung 10: Stimulation von DCs mit S100A4 induziert regulatorische T- Zellen in einer autologen DC- CD4+ Kokultur.....35
Abbildung 11: Stimulation von DCs mit S100A4 erhöht den IL-10 Gehalt im Überstand einer autologen Kokultur von DCs mit CD4+ Lymphozyten.....36

Tabelle 1: DAMPs und Wechselwirkungen mit dem Immunsystem.....4

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Veröffentlichungen

Herzog GI, Solgi G, Wiegmann DS, Nienhaus C, Schrezenmeier H, Yildiz T & Lotfi R. Quality of tumor lysates used for pulsing dendritic cells is influenced by the method used to harvest adherent tumor cells. *BMC Res Notes* (2011) **4**: p. 153.

Lotfi R, Wiegmann DS, Asseck L, Erle A, Yildiz T, et al. (2012) Necrosis-Associated Factors (DAMPs) Including S100A4 Used to Pulse Dendritic Cells (DCs) Induce Regulatory T cells. J Cell Sci Ther 3:134. doi:10.4172/2157-7013.1000134

Eisenbacher JL, Schrezenmeier H, Jahrsdörfer B, Kaltenmeier C, Rojewski MT, Yildiz T, Beyer T, Erle A, Wiegmann DS, Grassl S, Hang R, Körper S, Wiesneth M, Lotze MT, Lotfi R. (2014) S100A4 an Uric Acid Promote Mesenchymal Stromal Cell Induction of IL-10+/IDO+ Lymphocytes. J Immunol. 2014 May 2. [Epub ahead of print]