# **INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

> vorgelegt von Diplom-Biologe Daniel Nummer aus Trier

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 2006

Thema

Akkumulation von T-regulatorischen Zellen im humanen Pankreaskarzinom durch selektive Tumorendothelvermittelte Adhärenz- und Transmigrationssteigerung

Gutachter: Prof. Dr. V. Schirrmacher Prof. Dr. M. Wink

Meinen Eltern

Gutta cavat lapidem non vi, sed saepe cadendo.

### Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der selektiven Akkumulation von Tregulatorischen Zellen (Tregs) im humanen Pankreaskarzinomgewebe durch ihre Adhäsionsmolekül-Expression und dem daraus resultierenden Mikromilieu, welches die Funktion zytotoxischer T-Zellen im Tumorgewebe supprimiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer selektiven Akkumulation von Tregs im Tumorgewebe kommt. Diese erschwerte wahrscheinlich durch Zell-Zellinteraktionen und Ausschüttung von TGF-ß die Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen durch tumorinfiltrierende zytotoxische T-Zellen.

Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass es zu einer gesteigerten Vaskularisierung im Tumorgewebe kam, welche der besseren Versorgung von hoch-proliferativen Tumorzellen diente.

Weitere Untersuchungen bewiesen die Tumormilieu-induzierte Modulation von endothelialen- und Treg- CAM-Expressionsmustern, welche *in vitro und in vivo* zu selektiv verstärkter Adhäsion und Transmigration von Tregs durch Tumorendothel führte. Die Treg selektive Tumorinfiltration wurde *in vitro* und *in vivo* unter anderem durch Bindung von CD62L, ß-7 Integrin und CD166 an ihre tumorendothelial exprimierten Bindungspartner MAdCAM-1, VCAM-1, CD62-E und CD166 vermittelt.

Die spezifische Blockade dieser Proteinbindungen mittels Antikörpern inhibierte *in vitro* und *in vivo* eine Treg-selektive Migration durch Tumorendothel und inhibierte nur schwach die Transmigration durch Kontrollendothel. Die notwendigen inhibitorischen Treg-Effekte in nichtpathologischen Geweben würden somit bei einer Treg selektiven Migrationsblockade erhalten bleiben. Dies könnte zur Steigerung der zytotoxischen Funktionalität im Tumor führen, ohne eine Auto-Immunität zu induzieren.

### Summary

This work defines selective accumulation of T regulatory cells (Tregs) in human pancreatic carcinoma tissue due to expression of adhesion molecules during Treg migration, establishing a tumour microenvironment which suppresses cytotoxic T cell function against tumour growth.

This work demonstrated selective accumulation of Tregs in tumour tissue. This Treg infiltration impeded recognition and destruction of tumour cells by cytotoxic T cells, using mechanisms of cell-cell interaction and/or secretion of TGF-B. We also showed that there was an increased vascularization in tumour tissue which lead to a nutritional environment supporting highly proliferative tumour cells. In addition, in vitro and in vivo, we showed modulation of Treg and endothelial cell adhesion molecule expression patterns in response to the tumour milieu, leading to selective and increased adhesion and trans-migration of Treqs through tumour endothelium. We showed that the selective infiltration of Treqs into tumour tissues is mediated by the binding of Treg-expressed CD62L, B7-integrin and CD166 to the tumour endothelial-expressed binding partners MAdCAM-1, VCAM-1, CD62-E and CD166. The *in vitro* and *in vivo* blocking of these binding interactions by monoclonal antibody lead to largely selective inhibition of Treg migration through tumour-endothelium but not through nonmalignant endothelium. This forms the basis for increased cytotoxic T cell function in tumour tissue while avoiding the major problem of concomitant activation of autoimmunity in nonmalignant tissue.

1

21

## 1 Einleitung

1.1	Das Immusystem	1
1.2	T-Zell vermittelte Immunität	2
	1.2.1 Antigenerkennung und Effektormechanismen der T-Zellen	2
	1.2.2 Die Effektormoleküle regulieren die Eigenschaften der Effektorzellen	4
	1.2.3 Das immunologische T-Zellgedächtnis	6
1.3	T-regulatorische Zellen (Treg) und ihre	
	Suppressionsmechanismen	7
1.4	T-Zell-Migration	10
	1.4.1 Das Endothelium	10
	1.4.2 Das Tumorendothelium	11
	1.4.3 T-Zell-Migrationswege	12
	1.4.4 T-Zell-Transmigration durch Gefäßwände	13
	1.4.5 T-Zell-Endothelzell Interaktionen	14
	1.4.6 Transendotheliale Migration als Regulator für T-Zell-Aktivierung	
	und Differenzierung	16
1.5	Tumorimmunologie	17
1.6	Das Pankreaskarzinom	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit	20

### 2 Material

2.1	Geräte	21
2.2	Gebrauchsmaterialien	22
2.3	Verbrauchsmaterialien	22
2.4	Chemikalien 2.4.1 Lösungen und Reagenzien	23 25
2.5	Medien und Mediensupplemente	26
2.6	Zytokine	26

Antikörper und Farbstoffe	27
2.7.1 Farbstoffe	27
2.7.2 Konjugierte anti-Human Antikörper	27
2.7.3 Unkonjugierte anti-Human Antikörper	28
2.7.4 Dynalbeads <sup>®</sup>	29
Enzyme	29
Kits	29
Proben und Zellen	29
	23
Software	30
Datenbanken	30
Mäuse	30
	Antikörper und Farbstoffe.   2.7.1   Farbstoffe.   2.7.2   Konjugierte anti-Human Antikörper.   2.7.3   Unkonjugierte anti-Human Antikörper.   2.7.4   Dynalbeads*   Finzyme. Kits Proben und Zellen. Software. Datenbanken. Mäuse.

31

### 3 Methoden

3.1	Zellb	iologische Methoden	31
	3.1.1	Lösungen und Puffer	31
	3.1.2	Medien und Mediensupplemente	31
	3.1.3	Isolierung von mononukleären Zellen	32
	3.1.4	Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen	32
	3.1.5	Disseminierung von Gewebeproben	33
	3.1.6	Einfrieren solider Gewebe	34
3.2	Kultiv	<i>v</i> ierung von Zellen	34
	3.2.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
	3.2.2	Beschichten der Zellkulturgefäße	34
	3.2.3	Zellaussaat	35
	3.2.4	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	37
	3.2.5	Ablösen der Zellen	37
3.3	Prote	inchemische Methoden	38
	3.3.1	Herstellung von Gewebslysat	38
	3.3.2	Herstellung von Zell-Lysaten	38
	3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	39

3.4	Analytische immunbiologische Methoden	39
	3.4.1 Lösungen und Medien	39
	3.4.2 Klinisches Material von Pankreasgewebsdonoren	39
	3.4.3 Isolierung spezifischer Immunzellpopulationen über	
	Zelloberflächenmoleküle	40
	3.4.4 Anreicherung von T-Lymphozyten mittels Dynabeads <sup>®</sup>	40
	3.4.5 Anreicherung von CD4+CD25- T-Zellen und Tregs mittels Dynabeads <sup>®</sup>	41
	3.4.6 Anreicherung mikrovaskulärer Endothelzellen mittels Dynabeads <sup>®</sup>	41
	3.4.7 Durchflusszytometrie	41
	3.4.8 Immunhistologische Antikörperfärbungen	43
	3.4.9 Immunzytologische Antikörperfärbungen	44
	3.4.10 ELISA-Test ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	44
3.5	Spheroid-Adhärenztests	46
3.6	<i>In vitro</i> Angiogenesetest	46
3.7	<i>In vitro</i> Transmigrationstest	47
3.8	<i>In vivo</i> Kammer Experimente	47
3.9	Darstellung der Meßergebnisse und Statistik	48
3.10	Ethikvoten	48
4	Ergebnisse	49

#### Ergebnisse 4

•••	4.1.1	Immunhistologische Bestimmung des Endothel-Anteils von	15
		Tumor- und Kontrollpankreasgeweben	49
	4.1.2	Durchflusszytometrische Bestimmung des Endothel-Anteils von	
		Tumor- und Kontrollpankreasgeweben	50
	4.1.3	Der Vergleich von histologisch- und durchflusszytometrisch	
		bestimmtem Vaskularisierungsgrad im Pankreasgewebe	52

4.2	Die endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen in		
	Tumor- und Kontrollpankreasgewebe		53
	4.2.1	Die immunhistologische Bestimmung der endothelialen Expression von	
		Zelladhäsionsmolekülen	53

	4.2.2	Die durchflusszytometrische Bestimmung der endothelialen	
		Expression von Zelladhäsionsmolekülen	56
	4.2.3	Der Vergleich von histologisch- und durchflusszytometrisch	
		bestimmten CAM-Expressionsmustern im Pankreas	59
43	Der \	/eraleich der endothelialen CAM-Expressionsmuster <i>ex viva</i>	
ч. <b>у</b>	und		60
	unu <i>i</i>	<i>11 VILI O</i>	60
4.4	Die M nank	forphologie von Endothelzellen aus Tumor- und Kontroll- reasgewebe	63
	4.4.1	Die differentielle Morphologie von Tumor- und Kontrollendothelzellen	63
	4.4.2	Die differentielle Morphologie von Tumor- und Kontrollendothelzellen nach Langzeitkultivierung (14d)	65
	4.4.3	Die morphologisch-lokomotorischen Eigenschaften von Tumor- und	05
		Kontrollendothelzellen	67
4.5	Die C	D3+ T-Zell Infiltration in Tumor- und	
	Konti	rollpankreasgewebe	72
4.6	Das (	CAM-Expressionsmuster der CD3+ T-Zellen	74
	4.6.1	Das CAM-Expressionsmuster von CD3+ T-Zellen im peripheren Blut	75
	4.6.2 4.6.3	Das CAM-Expressionsmuster von CD3+ T-Zellen im Pankreasgewebe Das Expressionsmuster der CD3+ T-Zellen im peripheren Blut im	76
		Vergleich mit dem Expressionsmuster im Pankreasgewebe	78
4.7	Die C	D4+ und CD8+ T-Zell Infiltration in Tumor- und	
	Konti	rollpankreasgewebe	79
_			
4.8	Das (	CAM-Expressionsmuster der CD4+ und CD8+ T-Zellen	82
	4.8.1	Das CAM-Expressionsmuster von CD4+ und CD8+ 1-Zellen im	ຊວ
	482	Das CAM-Expressionsmuster von CD4+ und CD8+ T-Zellen	02
	1.0.2	im Pankreasgewebe	84
	4.8.3	Das Expressionsmuster der CD4+- und CD8+ T-Zellen im peripheren	
		Blut im Vergleich mit dem Expressionsmuster im Pankreasgewebe	85
4.9	Die C	D4+CD25+ Population im peripheren Blut und die Infiltration	
	in Tu	mor- und Kontrollpankreasgewebe	88
	4.9.1	Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+ Population im peripheren Blut von Tumor- und Kontrolldonoren	89
	4.9.2	Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+ Population im Tumor- und	
		Kontrollgewebe	90

	4.9.3 Der Vergleich des CD4+CD25+ Anteils zwischen peripherem Blut und Pankreasgewebe	92
	4.9.4 Die immunhistologische Bestimmung des Anteils von FoxP <sub>3</sub>	-
	exprimierenden CD4+CD25+ Zellen im Gewebe	92
4.10	Die Zytokinexpression der gewebsresidenten Zellen	95
	4.10.1 Die Konzentration von TGF-ß und IL-10 im Tumor- und	05
	Kontrollgewebe	95
	Kontrollaewebe	96
	4.10.3 Die Zytokinexpression von Tregs im Tumor– und Kontrollgewebe	98
4.11	Der Aktivierungsstatus von zytotoxischen CD8+ T-Zellen in	
	Tumor– und Kontrollgewebe	100
4.12	Das CAM-Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der	
	CD4+CD25Populationen in Tumor- und Kontrolldonoren	102
	4.12.1 Das Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der	-
	CD4+CD25Populationen im Kontrolldonor	102
	4.12.2 Das Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der	
	CD4+CD25Populationen im Tumordonor	104
	4.12.3 Das Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der	
	CD4+CD25Populationen im Tumor- und Kontrolldonorgewebe	105
4.13	Die Adhäsion der CD4+CD25+- und der CD4+CD25-Zellen	
	an Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel <i>in vitro</i>	106
4.14	Die Transmigrationskapazität der T-Zellen durch Tumordonor-	
	und Kontrolldonor–Endothel <i>in vitro</i>	109
	4.14.1 Die Transmigrationskapazität der CD3+ T-Zellen durch	
	Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel <i>in vitro</i>	110
	4.14.2 Die Transmigrationskapazität der CD4+ und CD8+	
	T-Zellen durch Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel <i>in vitro</i>	113
	4.14.3 Die Transmigrationskapazität der CD4+CD25+ und CD4+CD25-	114
		114
4.15	Die Relevanz der CAMs bei der Treg-Transmigration	
	durch Iumordonor- und Kontrolldonor-Endothel <i>in vitro</i>	116
	4.15.1 Die Relevanz der Kontrollendothel-exprimierten CAMs bei	
	aer Ireg-Iransmigration <i>In vitro</i>	117
	4.15.2 Die Keievanz der Tumorendotnei-exprimierten CAMS	110
	berder freg fransningration <i>in vitro</i>	110

	4.15.3 Der Vergleich CAM-vermittelter transendothelialer Migration von Treas und CD4+CD25- T-Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel	119
	4.15.4 Die Relevanz der Treg-exprimierten CAMs bei der Transmigration	115
	durch Tumor– und Kontrollendothel <i>in vitro</i>	120
4.16	Das NOD-SCID <i>in vivo</i> Kammer-Mausmodell	121
	4.16.1 Die Transmigration von CD3+ T-Zellen durch Tumor- und	
	Kontrollendothel <i>in vivo</i>	123
	4.16.2 Die Transmigration von CD4+ und CD8+ T-Zellen durch	125
	10 I umor- und Kontrollendotnel <i>In VIVo</i>	125
	4.16.3 Die Transmigration von CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen	126
	durch Tumor- und Kontrollendothei <i>In VIVO</i>	126
4.17	Die Relevanz der Treg-exprimierten CAMs bei der	
	Transmigration durch Tumor- und Kontrollendothel <i>in vivo</i>	128
5	Diskussion	129
5.1	Das Mikromilieu im Pankreastumorgewebe unterstützt eine	
	ausgeprägte Angiogenese-Induktion	129
5.2	Die tumorabhängige Induktion endothelialer	
	CAM–Expressionsmuster	131
5.3	Die morphologisch-lokomotorischen Eigenschaften der Endothelzel	llen
	werden durch lösliche Faktoren im Tumormilieu beeinflusst	134
5.4	Die Anreicherung von T-Zellen im Pankreastumorgewebe	136
	5.4.1 Die CAM-Expressionsmuster der T-Zell Subpopulationen während der selektiven Infiltration in das Tumorgewebe	140
	5.4.2 Die Zytokine im Tumormikromilieu bestimmen den funktionellen	
	Kontext infiltrierender Zellen	147
	5.4.3 Der Treg Anteil im Gewebe korreliert invers zum CD8+ T-Zell	
	Aktivierungsstatus (CD69 Expression)	148
5.5	Die selektive Steigerung der Treg-Adhäsionskapazität an	
	Tumorendothel <i>in vitro</i>	150
5.6	Die selektive Steigerung der Treg-Transmigrationskapazität	
	durch Tumorendothel <i>in vitro</i>	151

5.7	Die funktionelle Relevanz der CAMs bei der Treg-Transmigration <i>in vitro</i>	153
5.8	Die funktionelle Relevanz der CAMs bei der Treg-Transmigration <i>in vivo</i>	155
5.9	Schlußfolgerung	156
6	Abkürzungsverzeichnis	158
7	Literaturverzeichnis	165
Dank	sagung	187

### 1 Einleitung

#### 1.1 Das Immunsystem

Über 400 Millionen Jahre hat die Evolution benötigt, um den hochdifferenzierten und anpassungsfähigen Abwehrapparat in Form unseres Immunsystems zu entwickeln.

Seit der Pionierarbeiten von "Gowans" in den Sechziger Jahren ist bekannt, dass die Zellmigration eine wichtige Rolle bei der Ausführung von Effektorfunktionen des Immunsystems darstellt. Das Repertoire von T-Zellen (TZ), die keinen Antigen-Kontakt hatten (naive T-Zellen), besteht im Erwachsenen aus 25 Millionen bis 100 Millionen verschiedenen Klonen (Arstila *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1998). Die Zahl der T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor (TZR) das gleiche Antigen erkennt, ist jedoch sehr klein (höchstens mehrere Hunderte). Daher ist die Wahrscheinlichkeit einer naiven T-Zelle (125 Femtoliter Volumen) im adulten humanen Organismus (75 Liter Volumen) auf ihr spezifisches Antigen zu stoßen, sehr gering. Diese Verhältnisse verdeutlichen die Notwendigkeit eines "Navigationssystems" für T-Zellen. Die Navigation von T-Zellen wird im Organismus hauptsächlich von Endothelzellen vermittelt (Marchesi und Gowans, 1964).

Ein Tumor steht unter dem Evolutionsdruck, für das Immunsystem unerkannt zu bleiben. Eine mögliche Evasionsstrategie des Tumors wäre die lokale Störung des "Navigations-" und "Effektor-Systems" tumor-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (ZTZ) durch verbesserte Migrations- und Effektor-Fähigkeiten suppressiver Zellen. Mögliche Evasionsmechanismen wären die lokale. tumorinduzierte Änderuna hierbei der Zvtokinund Adhäsionsmolekül-Expression, die einer verbesserten Infiltration zu inhibitorischer Tregs führt.

Tumormikromilieus Untersuchungen des und der transendothelialen Migration tumorspezifischer T-Zellen führen zum besseren Verständnis der Einflüsse auf Aktivierung, Differenzierung und Zytotoxizität von T-Zellen. Eine gezielte Beeinflussung des tumorgerichteten Migrationsverhältnisses von suppressiven und zytotoxischen T-Zellen könnte eine wirkungsvolle Krebstherapie darstellen. Hierbei könnte die Effektorfunktion von tumorspezifischen ZTZ durch eine spezifische Migrationsblockade der Tregulatorischen Zellen optimiert werden. Eine derartige Behandlung würde ein wesentlich geringeres Risiko an Nebenwirkungen darstellen, als unspezifisch wirkende Strahlen- und Chemotherapien.

1

#### 1.2 T-Zell vermittelte Immunität

T-Zellen entwickeln sich aus einer Population hämatopoetischer Vorläuferzellen Knochenmarks. des Sie wandern als sogenannte Vorläuferlymphozyten in den Thymus ein, um dort auszureifen. Hier findet die Bildung des T-Zell-Rezeptorrepertoires statt. Dazu werden die Zellen, deren T-Zell-Rezeptoren Bindungsaffinität für körpereigene Haupthistokompatibilitäts-Komplexe (*major histocompatibility complex*; MHC) zeigen, auf kortikalen Epithelzellen selektiert (Positivselektion). Im Anschluss werden autoimmune T-Zellen, welche nach Interaktion mit Dentritischen-Zellen (DC) eine hohe Affinität für Selbst-Peptid/MHCzeigen, durch Apoptose-Induktion in der Thymusmedulla Komplexe selektiert (Negativselektion). Diese Vorgänge hinterlassen eine T-Zell-Population, die eine schwache Affinität für körpereigene MHC hat. Sie bilden die Gesamtheit der T-Zellen, die aus dem Thymus exportiert werden. Diese ",naiven" T-Zellen zirkulieren durch periphere lymphatische Organe, um einen Komplex aus fremden Peptid und körpereigenem MHC zu detektieren. Diese Detektion und die gleichzeitige Kostimulation durch beispielsweise CD28 führt zur Aktivierung der Zellen, falls die Affinität der Interaktionen einen bestimmten Schwellenwert überschreitet.

Auf Grund ihrer verschiedenen Effektorfunktionen werden zwei Hauptklassen von T-Zellen unterschieden. 1. Zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL), welche intrazelluläre Pathogene zerstören. ZTL exprimieren neben dem T-Zell-Rezeptor den Korezeptor CD8 für MHC Klasse I-Moleküle. 2. T-Helfer-Zellen, die den Korezeptor CD4 für MHC Klasse II-Moleküle exprimieren. Sie werden in die beiden Subtypen Th1, die Makrophagen zur Eliminierung der von ihnen selbst phagozytierten Pathogene stimulieren und Th<sub>2</sub>, die B-Zellen zur Proliferation und zur Sezernierung von Antikörpern aktivieren, eingeteilt.

### 1.2.1 Antigenerkennung und Effektormechanismen von T-Zellen

Über den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) wird die Antigenerkennung vermittelt. Die T-Zelle geht zunächst über die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TZR eine Bindung in Form eines trimolekularen Komplexes ein, der aus TZR, Peptid und MHC besteht. Verstärkt wird diese Bindung durch das CD4- bzw. CD8-Molekül. Anschließend findet nach Stimulierung des TZR eine Signaltransduktion, vor allem über die assoziierten Homodimere aus  $\xi$ -Ketten des CD3-Komplexes, statt.

Die Präsentation der Antigene geschieht über MHC. Der Bindungspartner des TZR besteht aus einem Peptid, welches an ein membranständiges Glykoprotein, das MHC-Molekül der Klasse I oder II, gebunden ist. MHC Klasse I-Moleküle binden Peptide, welche im Proteasom innerhalb des Zytosols prozessiert wurden. MHC-I Komplexe werden spezifisch von CD8+ T-Zellen über den entsprechenden TZR erkannt. Proteine, die sich in Vesikeln innerhalb der Zellen befinden oder von außen z.B. über Phagozytose in diese hineingelangen, werden von Proteasen in Peptide geschnitten. Die Peptide fusionieren mit Vesikeln, die MHC-II Komplexe enthalten. Daraufhin binden sie an die Peptidbindungstasche des MHC-II, welcher dann an der Zelloberfläche relevanter Zellen präsentiert wird. Die MHC-II werden von CD4+ T-Zellen und deren spezifischem TZR erkannt.

Die Aktivierung naiver T-Zellen erfordert nicht nur die TZR-MHC-Komplex Interaktion, sondern auch die Kostimulation durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APZ). Die potenteste Antigenpräsentation wird durch Dentritische Zellen (DZ) ermöglicht, welche aus CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen im Knochenmark bzw. aus CD14<sup>+</sup> Monozyten im peripheren Blut entstehen. Sie zeigen starke Expression von MHC sowie von kostimulatorischen Molekülen (B7.1/CD80 und B7.2/CD86), die auf T-Zellen mit CD28 interagieren. Eine Aktivierung über den TZR führt durch eine zeitgleiche Kostimulation zur Differenzierung der naiven T-Zelle zu einer bewaffneten Effektorzelle (Paul *et al.*, 2003).

Die primäre Aktivierung der naiven T-Zellen findet vor allem in den peripheren lymphatischen Organen statt. Bei einer Infektion nehmen DZ Antigene in der Peripherie auf und migrieren in die peripheren lymphatischen Organe. Dort können sie eine adaptive Immunantwort induzieren. Eine primäre Aktivierung von naiven Zellen ist jedoch auch im Knochenmark möglich (Feuerer *et al.*, 2003).

#### 1.2.2 Die Effektormoleküle regulieren die Eigenschaften von Effektorzellen

Die bewaffneten T-Effektorzellen synthetisieren zwei große Gruppen von Effektormolekülen: 1. Zytotoxine, die in speziellen lytischen Granula gespeichert und von ZTZ freigesetzt werden, und 2. Zytokine sowie verwandte membrangebundene Proteine, die von allen T-Effektorzellen *de novo* synthetisiert werden und die entscheidenden Mediatoren der CD4-T-Effektorzellaktionen sind. Die Zytotoxine sind die Haupteffektormoleküle der zytotoxischen T-Zellen. Da sie unspezifisch reagieren, ist es wichtig, dass ihre Freisetzung genau reguliert wird. Sie können die Lipiddoppelschicht durchdringen und in der Zielzelle einen programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen. Zytokine und membrangebundene Proteine hingegen binden an spezifische Rezeptoren auf der Zielzelle. Daher sind die wichtigsten Effektorfunktionen der CD4+-Zellen gegen spezielle Zellen, die solche Rezeptoren exprimieren, gerichtet.

Die membrangebundenen Effektormoleküle gehören zur Proteinfamilie der Tumornekrosefaktoren (TNFs). Ihre Rezeptoren auf den Zielzellen gehören zur Familie der TNF-Rezeptoren (TNFR). TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  werden in gelöster und membranassoziierter Form von Th1-, einigen Th<sub>2</sub>-, sowie von ZTL gebildet. Das wichtigste membranassoziierte und mit TNF verwandte Molekül, das von ZTL exprimiert wird, ist der sogenannte Fas-Ligand (CD95L). Dieser kann bei Zellen, die den Rezeptor Fas (CD95) exprimieren durch Bindung den Tod auslösen. Die drei wichtigsten Arten von bewaffneten T-Effektorzellen produzieren verschiedene Effektormoleküle.

CD8-T-Zellen sind überwiegend zytotoxisch und erkennen die Peptide, die an MHC-I-Moleküle gebunden sind. Sie setzen Perforin frei, das die Membranen der Zielzellen perforiert, Granzyme (Apoptose-induzierende Proteasen) und auch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), welches neben aktivierten CD8+ T-Zellen auch von CD4+ T-Zellen (s. u.) und Natürlichen Killerzellen (NK) gebildet wird und vor allem aktivierend auf Makrophagen wirkt. IFN- $\gamma$  fördert außerdem die T-Zellreifung und verstärkt die Proliferation von ZTL, während es die Proliferation von TH2-Zellen inhibiert. Des weiteren induziert es eine aesteigerte Expression von MHC-Klasse-I und -II-Molekülen sowie Peptidtransportermolekülen die Effizienz der und erhöht damit Antigenpräsentation auf den jeweiligen Zielzellen (Mire-Sluis und Thorpe, 1998). Das membrangebundene Effektormolekül auf CD8-T-Zellen ist der Ligand für Fas, ein Rezeptor dessen Aktivierung Apoptose auslöst.

CD4-T-Zellen erkennen Peptide, die an MHC-Klasse-II Moleküle gebunden sind. Es gibt hierbei zwei funktionelle Typen: Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen (Mosman und Coffman, 1989).

Th<sub>1</sub> Zellen sind auf die Aktivierung von Makrophagen spezialisiert, die Pathogene enthalten oder aufnehmen. Sie sezernieren Interferon- $\gamma$  und Effektormoleküle (GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) und andere exprimieren den membrangebundenen Liganden CD40 und/oder den Fas-Liganden. Beide gehören zur TNF-Familie. Während jedoch die Bindung von CD40L an CD40 aktiviert, führt die Bindung des Fas-Liganden an Fas zur Apoptose. Daher beeinflussen deren Expressionsmuster die Funktion der Zellen. Des weiteren sezernieren Th<sub>1</sub> Zellen IL-2, ein für die Proliferation und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen essentielles Zytokin. Die Konsequenz einer selektiven Th<sub>1</sub>-Differenzierung, resultiert vorwiegend in der Induktion einer Zellvermittelten Immunität, folglich kommt es zur Etablierung einer effektiven zytotoxischen T-Zellantwort (Santana und Rosenstein, 2003).

Th<sub>2</sub>-Zellen exprimieren vor allem den CD40-Liganden, welcher an CD40 auf der B-Zelle bindet und diese zur Proliferation anregt (Santana und Rosenstein, 2003). Th<sub>2</sub>-Zellen sind auf die Aktivierung von B-Zellen spezialisiert und sezernieren die B-Zell-Wachstumsfaktoren IL-4 und IL-5, sowie IL-10 und TGF- $\beta$ .

Das von Th<sub>2</sub>-Zellen sezernierte IL-4 stimuliert die Differenzierung Vorläuferzellen zu Dendritischen hämatopoetischer Zellen und die Makrophagen. Aktivierung von Zugleich besitzt IL-4 eine antiinflammatorische Wirkung, indem die  $TNF-\alpha$ Sekretion es durch Makrophagen und T-Zellen inhibiert. IL-4 stellt somit einen essentiellen Regulator von T-Helferantworten dar, da es die Th2-Differenzierung fördert und die Entwicklung der IFN- $\gamma$  Sekretion von Th<sub>1</sub>-Zellen hemmt (Muller *et al.*, 1994).

Ebenfalls aktivierend wirkt IL-5. Es induziert die Proliferation von naiven B-Zellen und eine terminale Differenzierung von B-Zellen zu Ig(M)produzierenden Zellen.

IL-10 hingegen hemmt, wie IL-4, die Th<sub>1</sub>-Differenzierung, hemmt zusätzlich aber auch die MHC-Klasse-II-Molekül Expression und die Zytokinfreisetzung von Makrophagen und Antigen-präsentierenden Zellen. Zusätzlich wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen unterdrückt und deren Maturierung verhindert (Mocellin *et al.*, 2003). Durch die Inhibition der IL-12 Produktion von Monozyten, sowie durch die Inhibition der IFN- $\gamma$  Produktion von Th<sub>1</sub>-Zellen nach antigenspezifischer Stimulation, sorgt IL-10 für eine starke Reduktion der antigenspezifischen T-Zellproliferation. Es wird nicht nur von Th<sub>2</sub>-, sondern auch von T-regulatorischen-Zellen (Treg), B-Zellen und Dendritischen Zellen produziert.

Die Balance zwischen CD4+ T-Zellantworten wird neben IL-4 und IL-10 auch durch IL-12 vermittelt (Trinchieri, 1995). IL-12 ist ein essentieller Regulator von Th<sub>1</sub>-Antworten und wird hauptsächlich von Dendritischen Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert. Es ist ein sehr potenter Induktor der Th<sub>1</sub>-Differenzierung und ein Kostimulator für die IFN- $\gamma$ Produktion. (Hsieh *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1995; Gately *et al.*, 1998). Es wirkt hauptsächlich schnell auf NK-Zellen sowie auf T-Zellen, indem deren IFN- $\gamma$ -Produktion gefördert wird. Zusätzlich fördert IL-12 durch Erhöhung der Proliferation und der Funktionalität von Th<sub>1</sub>-Zellen eine Th<sub>1</sub>-vermittelte Immunantwort.

TGF- $\beta$  wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert (Tregs, Makrophagen, Endothelzellen, T-Zellen u.a.). Es ist ein sehr potenter Wachstumshemmer für die meisten hämatopoietischen Progenitorzellen. TGF- $\beta$  hemmt die T-Zell-Proliferation und die Anti-Tumoraktivität, zum Teil durch Hemmung von IL-2 Effekten. Zusätzlich wird die Th<sub>1</sub>-Differenzierung, die IL-4 und IL-12 Produktion gehemmt (Fahlen *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Green *et a*l., 2003).

Somit hängt die Th-Zellpolarisierung des Immunsystems von einem entsprechenden Gleichgewicht zwischen IL-12 und IFN- $\gamma$ , die eine Th<sub>1</sub>-Antwort vorantreiben und IL-4 und IL-10 ab, welche eine Th<sub>2</sub>-Differenzierung begünstigen (Natali *et al.*, 1989; Maeurer *et al.*, 1996; Barth *et al.*, 1996; Gabrilovich *et al.*, 1998). Des weiteren stellen die Antigendosis (Hosken *et al.*, 1995), die Stärke der Antigenstimulation (Constant *et al.*, 1997), die Dauer der T-Zellrezeptorbindung (lezzi *et al.*, 1999) sowie die Eigenschaften der Kostimulation während der T-Zellaktivierung (Kuchroo *et al.*, 1995) wichtige regulatorische Faktoren des Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Gleichgewichts dar.

### 1.2.3 Das immunologische T-Zellgedächtnis

Eine der wichtigsten Folgen einer adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Darunter versteht man die Fähigkeit des Immunsystems, schneller und effektiver auf Krankheitserreger zu reagieren, denen es bereits zuvor begegnet ist. Das immunologische Gedächtnis beruht auf dem Vorhandensein einer klonal expandierten Population antigenspezifischer Lymphozyten, die sich durch eine besondere Langlebigkeit auszeichnen (Tanchot und Rocha, 1997), während der Großteil der Effektorzellen durch die Induktion der Apoptose eliminiert wird.

T-Gedächtniszellen lassen sich aufgrund verschiedener Oberflächenmarker T–Zellen phänotypisch naiven unterscheiden. Hierzu von zählen insbesondere die Varianten des CD45 Proteins. CD45 ist eine transmembrane Tyrosinphosphatase mit drei variablen Exons (A, B, C), die einen Teil der extrazellulären Domäne kodieren. Bei naiven T-Zellen findet man Isoformen mit hohem Molekulargewicht (CD45RA), die sich weder mit dem TZR noch mit seinen Korezeptoren verbindet (Michie et al., 1992). Bei T-Gedächtnis-Zellen werden die variablen Exons durch alternatives Spleißen der RNA für CD45 entfernt. Die entstehende Isoform (CD45RO), lagert sich sowohl mit zusammen. dem TZR. als auch mit den Korezeptoren Dieser zusammengesetzte Rezeptor scheint die Signale effektiver weiterzuleiten als der Rezeptor auf naiven T-Zellen (Novak et al., 1994).

Die verstärkte Effektivität der sekundären Immunantworten impliziert die Notwendigkeit einer Negativ-Regulation überschüssiger Immunantworten, um eventuelle Autoimmunreaktionen frühzeitig zu verhindern. Von essentieller Bedeutung hierbei sind T-regulatorische Zellen (Treg).

### 1.3 T-regulatorische Zellen (Treg) und ihre Suppressionsmechanismen

Die Fähigkeit, eine große Diversität von Antigenen erkennen zu können, ist eine Errungenschaft des Immunsystems, die wegen der Generierung selbstreaktiver Rezeptoren, gleichzeitig die Gefahr von Autoimmunität aufwirft. Das Potential für den "horror autotoxicus", oder die Autoimmunität, wurde von Paul Ehrlich vor mehr als 100 Jahren entdeckt (Ehrlich *et al.*, 1910). Erweitert und entwickelt in der Theorie der klonalen Selektion, wurde die Idee der "immunologischen Toleranz" als Voraussetzung für die Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten–Klone während der Entwicklung vorgeschlagen.

Im letzten Jahrzehnt wurden Tregs mit der Vermeidung der Autoimmunität verknüpft. Tregs funktionieren dabei als ein dominat, trans-aktiver Mechanismus, der aktiv die Immunantwort unterdrücken kann und somit als ein essentieller Mediator für Selbsttoleranz und Immunhomöostase angesehen werden muss (Dorf und Benacerraf, 1984). Die Identifikation von CD25 (IL-2R $\alpha$ ) als typisches Zell-Oberflächen Protein Treas, als auch die Entdeckung des in Tregs exprimierten von **Transkriptionsfaktors** für FoxP<sub>3</sub>, sorgten bessere Untersuchungsmöglichkeiten. Einerseits führten diese zum besseren Verständnis der Entwicklung und Funktion dieser T-Zell Subpopulation, andererseits aber auch zu einer besseren Aufreinigungsmöglichkeit (CD4+CD25+FoxP<sub>3</sub>+) und zur Etablierung der gängigen Suppressionsversuche von Effektorzellen (Thornton und Shevach, 1998; Takahashi et al., 1998; Read *et al.*, 1998).

Nach dem Kreuzvernetzen des TZR von T-regulatorischen Zellen *in vitro* findet kaum mehr Treg-Proliferation oder IL-2 Produktion statt, dennoch sind sie fähig die Proliferation und Zytokinproduktion von Effektorzellen zu inhibieren. Jedoch unterliegt diese *in vitro* Anergie *in vivo* sehr viel komplexeren Mechanismen.

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien durchgeführt, die darlegen, dass die Suppression durch Tregs über mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen stattfinden kann (Abbildung 1.1). Über eine kurze Distanz kann eine Suppression durch Zytokine (IL-10 und TGF-ß), die von den Tregs ausgeschüttet werden, stattfinden (Shevach et al., 2002; Green et al., 2003; Asseman *et al.*, 1999). Ebenso ist eine Suppression durch direkten Zellkontakt von Tregs mit T-Effektorzellen möglich. Dieser zweite Weg bietet zusätzlich eine Interaktionsmöglichkeit von Tregs mit APZ, die dann dazu instruiert werden, den Tryptophanstoffwechsel zu verstärken und/oder die inhibitorischen Zytokine IL-10 oder TGF-ß auszuschütten, die dann sofort mit den T-Effektorzellen interferieren können. Die Suppression über den Zellkontakt benötigt die Bindung von CD80/CD86 auf T-Effektorzellen oder APZ mit dem höher affinen, inhibierenden CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4) auf Tregs (Paust et al., 2004; Tang et al., 2004). Zusätzlich ist es möglich, dass Tregs CD4+ und/oder CD8+ T-Zellen direkt über Ausschüttung von Granzym oder Perforin töten (Grossman et al., 2004). Zur Zeit wird diskutiert, ob Tregs T-Effektorzellen auch durch Kompetition um Wachstumsfaktoren wie IL-2 inhibieren können (Klein *et al.*, 2003; Barthlott *et al*, 2003).

Weiterhin unbeantwortet bleibt bisher die Frage, ob Tregs *in vivo* konstitutive Suppressionskapazität auszeichnet, oder ob dieser Kapazität eine tonische Aktivierung des TZR oder der Zytokinrezeptoren vorausgeht.

8



Abbildung 1.1: Die Suppressionsmechanismen der T-regulatorischen Zellen. Die Suppression ist entweder Zytokin- oder Zellkontakt-vermittelt. Die suppressiven Eigenschaften der Tregs können über größere Distanz durch Ausschüttung inhibitorischer Zytokine zum Tragen kommen. Hierbei sorgen die ausgeschütteten Zytokine TGF-ß und IL-10 für eine Verstärkung der Treg-Funktionalität. Die Suppression durch Zellkontakt wird durch die Bindung von CTLA-4 an CD80/86 vermittlet. Die suppressiven Eigenschaften der Zytokine wirken sich hauptsächlich auf T-Effektor Zellen und Antigen-präsentierende Zellen (APZ) aus.

Bei nicht konstitutiver Suppressionsfähigkeit wäre davon auszugehen, dass die Aktivierung nur in bestimmten Kompartimenten (Organen) nach transendothelialer Migration erfolgen kann (Huehn et al., 2004; Green et al., 2002). Hierbei ist momentan nicht bekannt, wo Tregs in vivo ihre Funktion ausführen und nach welchem Mechanismus sie migrieren. Ihre Kapazität die Proliferation und Aktivierung naiver T-Zellen zu inhibieren, spricht für lymphoides Gewebe als Wirkungsort (Annacker al., et 2001). Dementsprechend ist die hohe CD62L Expression, welche verantwortlich für den Eintritt in Lymphknoten ist, zu deuten (Sakaguchi *et al.*, 1995; Lepault *et* al.. 2000). Andere Authoren erkennen die Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen auf Tregs (Annunziato et al., 2002; Sakaguchi et al., 2002; Bystry et al., 2001; Iellem et al., 2003) als Möglichkeit, direkt in induziertes Gewebe durch aktiviertes Endothel zu migrieren (Belkaid *et al.*, 2002).

Ergebnisse auf diesem Gebiet zeigen, wie essentiell phänotypische Veränderungen nach Transmigration durch Endothelien für die spätere Funktion der Zellen ist (Nourshargh und Marelli-Berg, 2005; Kawai *et al.*, 2000, Lepault *et al.*, 2000; Bystry *et al.*, 2001; D´Ambrosio *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2002).

#### 1.4 T-Zell-Migration

#### 1.4.1 Das Endothelium

Das Endothel ist ein Gewebe, dass aus einer konfluenten Einzelschicht von abgeflachten, rhomboid-förmigen Zellen besteht. Diese Zellen bilden die innere Schicht der Blutgefäße. Der Großteil der Blutgefäße ist aus drei Schichten aufgebaut. Die innere, dem Blut zugewandte, wird "tunica interna" genannt. Sie kann in Endothelzellschicht und Subendothel (stratum subendotheliale) unterteilt werden. Die "tunica media", liegt darunter und wird in "membrana elastica interna", glatte Muskulatur und "membrana elastica externa" (nur bei Arterien vom muskulären Typ) unterteilt. Den Abschluss des Gefäßes zur Peripherie, bildet die "tunica externa", eine Bindegewebsschicht, die neben Fibrocyten zahlreiche Mastzellen enthält (Abbildung 1.2; Bassenge *et al.*, 1990, Heusch *et al.*, 1990). Endothelzellen (EC) haben bei einem erwachsenen Menschen eine Masse von 1–1,5 kg (Cines *et al.*, 1998; Luscher und Barton, 1997). Sie bekleiden eine Oberfläche von ca. 700m<sup>2</sup> (Luscher und Barton. 1997).



Abbildung 1.2: Aufbau der Blutgefäße (aus "Biologie" von Campbell, N.A.; Spektrum Verlag, 1998; geändert)

Die phänotypische Heterogenität spiegelt die Diversität der endothelialen Funktionen wieder (Fajardo, 1989). Dabei ist das Rezeptorrepertoire ortsund situationsspezifisch angepasst (Polverini *et al.*, 1996). Endothelzellen kontrollieren lebenswichtige physiologische Prozesse, wie die Blutgerinnung und die Homöostase des Blutes, sowie die Vermittlung der Transmigration von immunologisch relevanten T-Zell-Subpopulationen (Rodig *et al*, 2003; Marelli-Berg *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 2002; Biernacki *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 2001; Cines *et al.*, 1998).

#### 1.4.2 Das Tumorendothelium

Der Vergleich von Endothelien in normalen Geweben mit typischem Tumorendothel, zeigt mannigfaltige Unterschiede. Das Tumor-beeinflusste Endothel zeigt einen hohen Grad von Desorganisation und Disintegrität (Konerding et al., 2001; Eberhard et al., 2000). Der Blutfluss durch Tumorendothelien ist disreguliert, es kommt häufig zu Agglomeration, zum lokalen Erliegen des Blutflusses, oder sogar zur Umkehr der Blutfließrichtung (Tozer et al., 1990, 2005). Zudem ist das Blut und das umliegende Gewebe neben den Tumorzellen stark hypoxisch (Helmlinger *et al.*, 1997). Der vaskuläre Tonus ist ebenso geändert. In diesem Umfeld verhalten sich Endothelzellen stark abweichend als unter normalen Konditionen in gesundem Gewebe. Das Endothel des Tumorgewebes proliferiert schneller und partizipiert aktiv an der Angiogenese (Denekamp und Hobson, 1982). Das Tumor- und Peritumorale Gewebe ist mit Nährstoffen angereichert (erhöhte Glukosekonzentration), zeigt aufgrund der Laktatproduktion durch die anaerobe Glykolyse einen stark erniedrigten pH-Wert und befindet sich in einem konstanten oxidativem Streß (Brown und Bicknell, 2001; Toyokuni et al., 1995). Die Endothelzellen zeigen im Tumor einen Phänotyp, der dem einer aktivierten Zelle im inflammatorischen Zustand ähnelt (Nanda et al., erhöhter (erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und 2004) Metabolittransport). Die Endothelzelle reagiert transkriptionell auf all diese Stimuli und zeigt veränderte Expressionsmuster für Proteine verschiedenster Funktion (Nanda und St. Croix, 2004). Dementsprechend ist das Endothelium stark vom Tumor beeinflusst. Dies wirkt sich auf die Permeabilität, die Motilität und die Expression von Adhäsionsmolekülen aus und beeinflusst somit auch die Zell Zell-Interaktion mit T-Zellen und deren transendotheliale Migration (Engelhardt und Wolburg, 2004; Kawai *et al.*, 2000).

#### 1.4.3 T-Zell-Migrationswege

T-Zellen wandern fortwährend vom Blut zu den peripheren lymphatischen Organen. Dort werden Antigene festgehalten, indem sie durch professionell Antigen- präsentierende Zellen verarbeitet werden (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3:** Die Migrationswege der T-Zellen *in vivo.* Durch eine gewebsspezifische Migration infiltrieren die T-Zell Subpopulationen die Lymphknoten. Dort findet sich eine große Anzahl APZ, die den T-Zellen im Organismus aufgenommene Antigene präsentieren. Diese Interaktion erfordert die Bindung spezifischer TZR an den peptidbeladenen MH-Komplex der APZ. Nach erfolgreicher Interaktion kommt es zur Aktivierung und klonalen Expansion der T-Zellen. Durch Differenzierungsschritte teilt sich die aktivierte Population in zwei Subpopulationen. Die eine ist langlebig und sorgt für eine stetige Kontrolle, da sie nach erneutem Antigenkontakt sehr schnelle Effektorfunktionen ausüben kann. Die andere Subpopulation ist kurzlebig und verantwortlich für die schnell benötigten Effektor-T-Zell Funktionen. Beide Subpopulation rezirkulieren im Blut des Organismus bis sie durch den Prozess der Migration in das jeweilige Zielgewebe einwandern. Die Migration wird dabei durch Inflammation, oder durch gewebsspezifische Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel induziert. Nach der Erkennung spezifischer Antigene im Gewebe können die jeweiligen Effektorfunktionen ausgeführt werden. Verändert nach Mackay und von Andrian, 2000.

Spezifische T-Zellen erkennen hierbei Antigen, das ihnen zusammen mit einem kostimulatorischen Molekül von APZ präsentiert wird. Die Folge ist eine klonale Expansion der T-Zellen und eine weitere Differenzierung in kurzlebige Effektor-T-Zellen und langlebige T-Gedächtniszellen. Zentrale-T-Gedächtniszellen verbleiben im lymphatischen Gewebe, während die Effektor-T-Gedächtniszellen durch gewebsspezifisch-transendotheliale Migration in Zielgewebe einwandern. Dort erkennen sie ihr spezifisches Antigen und werden aktiviert. Effektor-T-Zellen interagieren hingegen nach dem erneutem Eintritt in die Blutgefäße mit aktiviertem Endothel, um dann in einem "voraktiviertem" Zustand in induziertes Gewebe einzuwandern und ihre Effektorfunktionen auszuüben (Nourshargh und Marelli-Berg, 2005).

### 1.4.4 T-Zell-Transmigration durch Gefäßwände

T-Zell-Transmigration ist ein Schlüsselereignis während der Immunantwort. Der Prozess der Transmigration ist wichtig, um T-Zellen durch die endotheliale Barriere zu inflammatorischem Gewebe zu leiten. Des weiteren ist sie aber auch durch Regulation der Aktivierung und der Sensibilisierung von T-Zellen, für die Funktionalität der T-Zellen im extravaskulären Gewebe verantwortlich. Die Fähigkeit von T-Zellen konstitutiv zu inflammatorischem Gewebe zu migrieren wird auf verschiedenen Ebenen gesteuert. So wird ein pro-migratorischer Phänotyp schon bei primärem Antigenkontakt im Lymphknoten festgelegt, während die Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen sich nach erneutem Antigenkontakt verändert und die Zelle weiter differenziert (Mackay et al., 1993; Kunkel und Butcher, 2002). Diese zellulären Modifikationen wiederum, ermöglichen und regulieren die Richtung der T-Zell-Wanderung in Nicht-lymphoide Gewebe auf eine Antigen- und Gewebs-spezifische Weise. Jüngere Ergebnisse implizieren, das diese Vorgänge auf Ebene der Signaltransduktion und der Transkription stattfinden und von den molekularen Interaktionen zwischen Endothelzelle und T–Zelle gesteuert werden (Kunkel und Butcher. 2002). Die Transmigration wird sowohl von der T-Zelle wie auch von den Endothelzellen vermittelt und resultiert in einer bidirektionalen Signaltransduktion in beiden Zelltypen. Die beidseitige Induktion beeinflusst sehr wahrscheinlich nicht nur Phänotyp und Migrationsverhalten, sondern auch Verhalten, Sensibilität, Differenzierung und Überlebenswahrscheinlichkeit im Gewebe (Nourshargh und Marelli-Berg, 2005).

1.4.5 T-Zell-Endothelzell Interaktionen

Die T-Zell Migration durch das Endothelium setzt spezifische adhäsive Interaktionen zwischen T-Zellen und Endothelzellen voraus. Aktivierte Endothelzellen produzieren sowohl lösliche- wie auch Oberflächen-Moleküle, die die Interaktion mit T-Zellen vermitteln. Zu den verantwortlichen Oberflächen-Molekülen gehören die Zell-Adhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAMs), die in Integrine, Selektine und Immunglobulin-Superfamilien-Moleküle eingeteilt werden. Sie können an Karbohydratbasierte Liganden und andere Adhäsionsmoleküle binden. Die Vorgänge während der Transendothelialen Migration können als Modell in vier Phasen eingeteilt werden.

Während der **Annäherung** der T-Zelle an die Gefäßwand, vermitteln hauptsächlich Zell-Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen, welche aus der Gruppe der Selektine stammen, eine kurze und wenig affine Bindung von T-Zell-Glykoproteinen und/oder -Glykolipiden, an das Endothel (Abbildung 1.4). Diese initialen Interaktionen, führen zu einer Verlangsamung der T-Zelle im Blutstrom, so das es zu einer "Rollbewegung" entlang der Endothelzellen kommt.

Während der **Rollphase**, erlaubt die Proximität der beiden Zelltypen verstärkte Interaktion über Integrine (hauptsächlich ß–7– und ß–1 Integrine), welche die jeweiligen Rezeptoren (MAdCAM–1 und VCAM–1, Immunglobulin– Superfamilien Moleküle) auf der Endothelzelloberfläche binden. In der Rollphase entscheidet sich, ob die Interaktion über die jeweilig exprimierten Rezeptoren und Liganden ausreichen, um die Bindung der T–Zelle an das Endothel zu erhalten.

Nur ein kleiner Anteil der "rollenden T-Zellen" erhält die nötigen Signaltransduktionen um weiterhin zu adhärieren und somit durch Endothelzell-Oberfläche Chemokine, die auf der während der Aktivierungsphase exprimiert werden, eine weitere Stimulation zu erfahren (Davies und Hagen, 1993). Chemokin-aktivierte T-Zellen pressen sich flach an die Endothelzellen und zeichnen sich durch eine höhere Bindungsaffinität aus. Es kommt zu einer bidirektionalen Aktivierung der Zelltypen.



**Abbildung 1.4**: Essentielle Interaktionen während der transendothelialen Migrationskaskade. Die Transmigration kann in vier Abschnitte eingeteilt werden. 1. **Annäherung** der T-Zellen an das Endothel durch lokale Verlangsamung des Blutflusses und Ausbildung schwacher Bindungen über Selektine. 2. **Die Rollphase** vermittelt eine Verlangsamung der T-Zellen am Endothel und eine verbesserte Interaktionsmöglichkeit mit dem Endothel über Integrine. 3. Die Rollphase sorgt mit den sehr ausgeprägten Interaktionsmöglichkeiten für die **Aktivierung** beider Interaktionspartner. Diese Aktivierung wird durch chemoattraktive Moleküle und Transmembran-Rezeptoren (TMR) vermittelt. 4. Der **Arrest** der Zellen am Endothel sorgt lokal für eine permanente Aktivierung des Endothels und der T-Zelle. Diese Aktivierungskaskade kann zur Fenestration des Endothels führen, was eine Vorraussetzung für die transendotheliale Migration darstellt. Verändert nach von Andrian und Mackay, 2000.

Hierdurch werden T-Zellen stimuliert, lokomotorisch an fenestrierte Verbindungsstellen zwischen den Endothelzellen zu gelangen. Dieser Stimulus sorgt für das Abstoppen des "Rollens" (Arrest) und für T-Zell-Interaktionsmöglichkeiten mit VCAM-1, ICAM-1 und PECAM-1, welche die transendotheliale Migration (TEM) einleiten. Gleichzeitig wird den Endothelzellen vermittelt. die interendothelialen Verbindungen "aufzulockern" und den T-Zellen somit die Diapedese zu erleichtern al., 2000). Zusammenfassend (Johnson-Leger wird diese et

Interaktionskaskade zwischen T-Zellen und Endothelzellen durch verschiedene Adhäsionsmoleküle (Integrine, Selektine und Immunglobulin-Superfamilien-Moleküle) und deren jeweiligen Rezeptoren ermöglicht, und ist durch stimulatorische Moleküle (z.B.: Chemokine) in ihrer Effizienz beeinflussbar.

### 1.4.6 Transendotheliale Migration als Regulator für T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung

Endothelzellen besitzen durch ihre Lage zwischen Blutstrom und umliegendem Gewebe die besondere Fähigkeit, die Population zirkulierender T-Gedächtniszellen zu alarmieren, falls Pathogene präsent sind oder sich pathologische Änderungen im Mikromilieu einstellen. So ist es ihnen möglich durch die Expression von MHC-I- und MHC-II-Komplexen Antigen zu präsentieren und somit eine sekundäre Immunantwort auszulösen (Pober et al., 1999). T-Zellen tragen durch die Ausschüttung aktivierender Moleküle, wie beispielsweise Interferon- $\gamma$ , zur Regulation der MHC-Expression bei (Tereb et al., 2001; Belitsky et al., 1990; Groenewegen et al., 1985). Proteine, die für die Prozessierung und das Beladen der MH-Komplexe mit Peptid-Antigen nötig sind (z.B.: TAP1 und TAP2, LMP2), werden in Endothelzellen durch die selben Aktivatoren induziert (Johnson und Pober, 1994), so das die Aktivierung spezifischer T-Zell-Klone durch Endothelzellen möglich ist (Savage *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1984).

Eine T–Zell–Kostimulation durch Endothelzellen kann über drei verschiedene Molekültypen vermittelt werden. 1. Signalmoleküle (z.B.: CD40/CD40L), 2. Adhäsionsmoleküle (z.B.: CD2/LFA–3 oder 4–1BB/4–1BBL), oder 3. aktivierende Zytokine, die Einfluss auf die T–Zell–Differenzierung und – Proliferation haben, wie beispielsweise Interferon– $\alpha/\beta$  (Muller *et al.*, 1994), IL–6 (Loppnow *et al.*, 1989), IL–12 (Lienenluke *et al.*, 2000) und IL–18 (Gerdes *et al.*, 2002).

Durch die endotheliale Expression von CD40, welches an CD40L bindet, sowie durch Expression von LFA-3 oder 4-1BB auf T-Zellen, bzw. deren spezifischen Rezeptoren auf T-Zellen, ist eine Kostimulation der T-Zellen möglich (Karmann *et al.*, 1996). T-Zellen können in verschiedenster Weise durch Endothelzellen aktiviert werden. So wurde, nach Formierung einer "immunologischen Synapse" zwischen Endothelzelle und T-Zelle, eine höhere IL-2 Sekretion von CD4+-T-Gedächtniszellen, nicht aber von naiven T-Zellen, festgestellt. Ebenso war die Expression von IL-2R $\alpha$  auf T-Gedächtniszellen gesteigert und deren Proliferation nahm nach Interaktion zu (Ma und Pober, 1998; Marelli-Berg et al., 1996). Die Zahl der durch Endothel-Interaktion aktivierten CD4+-T-Zellen war geringer und die Proliferation schwächer, als durch die klassische T-Zell/APZ-Interaktion (Ma und Pober, 1998). So wird diskutiert, ob die Aktivierung durch kostimulatorische Moleküle (z.B. CD80 und CD86) auf Endothelzellen und T-Gedächtniszellen die Transmigration induziert, während die Ausschüttung von Effektorsubstanzen oder die Proliferation nicht angeregt wird (Tay et al., 2003; Marelli-Berg et al., 1999). Dies würde die Annahme stützen, das die Erkennung von Antigen auf Endothelzellen ein Signal für spezifische Migration sein könnte (Marelli-Berg et al., 1999). Auch CD8+-T-Zellen reagieren unterschiedlich auf die Interaktion mit Endothel. Während naive CD8+-T-Zellen nicht reagieren, exprimieren CD8+-T-Gedächtniszellen nach Kokultur mit aktivierten mikround makrovaskulären Endothelzellen u.a. CD69, CD25 und CD154. Funktionell sind diese Zellen Effektorzellen, die Perforin exprimieren und sich durch die Zytolyse von Zielzellen auszeichnen (Dengler und Pober, 2000). Der Grund, warum nur Gedächtniszellen auf die Endothelinteraktion reagieren, könnte in der Vermeidung einer Autoimmunität liegen. Dies wird durch die inadequate Co-Stimulation von naiven T-Zellen sichergestellt. Außerdem exprimieren naive T-Zellen, im Gegensatz zu T-Gedächtniszellen, nicht die geeigneten Zell-Adhäsionsmoleküle um eine stabile Bindung zu Endothelzellen aufzubauen (de Jong et al, 1991). Neben der Komplexität dieser Interaktionen, scheint die transendotheliale Migration einen neuen Differenzierungsgrad in T–Zellen zu induzieren. der funktionelle Eigenschaften den Gegebenheiten des jeweiligen Gewebes anpasst (Kawai et *al.*, 2000).

### 1.5 Tumorimmunologie

Das Immunsystem spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Genese und beim Verlauf einer Tumorerkrankung. Aufgrund der "Immunüberwachung" ("surveillance") mittels Zell-Zell-Interaktionen, ist der Tumor zur Etablierung mehrerer Abwehrmechanismen gezwungen (Marincola et al., 2000). Diese Mechanismen ermöglichen den Tumorzellen der Erkennung, durch tumorspezifische Peptid/MH–Komplexe (Seliger 1998), et al., durch Proteine tumorspezifische (Restifo et al., 1993), durch

Adhäsionsmolekülemuster, oder durch Apoptoserezeptoren (Bernstorff *et al.*, 2002), zu entgehen. Die Etablierung eines sehr komplexen Zytokinmilieus, supprimiert die Effektorfunktionen aller immunologisch relevanten Zellen in der Umgebung des Tumors (Costello *et al.*, 1999), u.a. durch die selektive Anreicherung von T-regulatorischen Zellen (Curiel *et al.*, 2004).

Die Adaption des Immunsystems sorgt trotzdem für die Bildung und Persistenz Tumor-spezifischer T-Zellen in lymphatischen Organen.

Neue Therapiekonzepte basieren auf der Mobilisation des patienteneigenen Immunsystems. In verschiedenen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Reaktionen des Immunsystems auf maligne Tumoren möglich sind (Rosenberg *et al.*, 1996; Nagorsen *et al.*, 2003; Van der Bruggen *et al.*, 1991; Boon *et al.*, 1994; Cheever *et al.*, 1995).

Die Effektivität einer zellulär-vermittelten Antitumor-Therapie hängt vom Phänotyp der Tumorzellen, aber auch von der Funktionalität der T-Effektorzellen (ZTL), die eine Anti-Tumorantwort mit Zytolyse induzieren können, ab. Von Bernstorff (2002) konnte nachweisen, dass es zu einer hohen T-Zell Infiltration in peritumorale Bereiche des Pankreaskarzinoms kommt. Ein Großteil dieser Zellen, erreicht jedoch keine Tumorzelle zur Induktion der Apoptose, sondern verbleibt mit fehlender Funktionalität in meist fibrösem Gewebe. Der kleine Anteil T-Zellen der mit Tumorzellen in Kontakt tritt, wird inaktiviert, was sich durch Runterregulation der CD3- $\zeta$ -Kette beweisen lässt (Von Bernstorff *et al.*, 2002). Obwohl Tumor-spezifische CD8+T-Zellen bei unterschiedlichsten Tumorerkrankungen spontan induziert werden, erweisen sie sich oft *in vitro* als funktionell anerg (Valmori *et al.*, 2000; Fukunaga *et al.*, 2004).

So konnte bei Melanompatienten eine starke Proliferation von tumorantigenspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, welche jedoch weder eine zytotoxische Aktivität, noch eine Zytokin-Sekretion etablieren al., 1999). Insbesondere kommt es (Lee et zur Sekretion immunmodulatorischer und -suppressiver Zytokine, wie IL-10 und Tumor Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), die direkt von Tumorzellen und Treg ausgeschüttet werden können und in situ zur Treg Induktion führen (Natali et al., 1989; Maeurer et al., 1996; Barth et al., 1996; Gabrilovich et al., 1998). Neue Befunde zeigen, dass die Blockade der Migration von T-regulatorischen Zellen, eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung humaner Tumore sein kann (Curiel et al., 2004, Huehn et al., 2004).

#### 1.6 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine aggressive, maligne Erkrankung. In den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit des Auftretens in westlichen Industrienationen stark zugenommen. Das Pankreaskarzinom ist der zweithäufigste maligne gastrointestinale Tumor und die fünfhäufigste Todesursache unter den Karzinomen des Erwachsenenalters (ca. 30000 jährliche Neuerkrankungen in Nordamerika).

Nahezu alle Fälle gehen von dem duktalen Ausführungsepithel aus. Histologisch ist es als tubuläres, alveoläres oder azinöses Adenokarzinom zu erkennen, welches u.a. Pseudozysten bildet. Häufig kommt es zu einem lokalen Sekretstau, der zur partiellen Autolyse führt. Achtzig bis neunzig Prozent aller Pankreaskarzinome entstehen im Pankreaskopf, nur sehr selten im Pankreasschwanz oder im Pankreaskörper. Die Erkrankung zeigt ein rasches, invasives Tumorwachstum, welches durch frühzeitige Gefäß- und Lymphbahninfiltration vermittelt wird. 80% der Pankreaskarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose metastasiert (Leber, Lunge, Nieren, Skelett; Nakao *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 1986). Der symptomarme Verlauf der Erkrankung führt dazu, das nur 20–30% aller Pankreaskarzinome operativ resektabel sind (Herfarth *et al.*, 1996).

Neunzig Prozent der Patienten versterben innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung (Gudjonsson *et al.*, 1987) und das 5-Jahresüberleben von primär kurativ operierten Patienten liegt bei ca. 30% (Trede *et al.*, 1996). Da Pankreaskarzinomzellen meist Resistenzen gegen zytostatisch-zytotoxische Therapien zeigen, verfehlen konservative Therapieansätze oft ihr Ziel. Momentan, ist die chirurgische Resektion, wenn sie frühzeitig durchgeführt werden kann, die einzige kurative Therapie (Schoenberg *et al.*, 1997; Grace *et al.*, 1990). Diese Zahlen verdeutlichen die dringende Notwendigkeit neuer Therapieansätze.

#### 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Komposition tumorinfiltrierender T-Zellen ist von entscheidender Bedeutung für die Bekämpfung des Tumors (Fukunaga *et al.*, 2004). So werden funktionelle Eigenschaften von zytotoxischen CD8+ T-Zellen stark von tumorinfiltrierenden T-regulatorischen Zellen (Tregs) supprimiert.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit haben zum Ziel, die funktionelle T-Zellund Treg-Infiltration in humanes Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zu humanem Pankreaskontrollgewebe zu charakterisieren und zu quantifizieren.

Die Untersuchungen des endothelialen Vaskularisierungsstatus und der endothelialen Morphologie sollten der Identifikation tumorselektiver Anpassungen von Endothelzellen dienen.

Zusätzlich sollten die CAM-Expressionsmuster der Endothelzellen und der jeweiligen T-Zell Subpopulationen analysiert werden um bei der tumorselektiven Migration von T-Zellen beteiligte Bindungspartner zu identifizieren.

Auf Basis der zugrundeliegenden CAM-Expressionsmuster sollten folgliche Adhäsions- und Transmigrationskapazitäten von T-Zell Subpopulationen und Tregs durch Tumor- und Kontrollendothel analysiert werden.

Die gezielte Inhibition der Tumorendothel-selektiven Treg-Transmigration durch die Blockade von Treg-Transmigrations-relevanten CAMs, sollte in funktionellen Experimenten erreicht werden.

Die Inhibition der tumorselektiven Treg-Transmigration könnte zu einer verstärkten Funktion von tumorinfiltrierenden zytotoxischen CD8+ T-Zellen führen, ohne die zur Vermeidung einer Autoimmunität physiologisch notwendige Infiltration in andere Gewebe zu beeinflussen.

### 2 Material

2.1 Geräte

Brutschrank	Nuaire, Plymouth; USA
CellCelector™	Aviso GmbH, Greiz-Gommla; D
Dispergiergerät Ultra-Turrax®	IKA-Werke, Staufen; D
ELISA-Meßgerät, Victor	PerkinElmer Wallac, Freiburg; D
ELISpot-Mikroskop Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Oberkochen; D
Eppendorf–Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau; D
Durchflußzytometer FACScan <sup>®</sup>	Becton Dickinson, Heidelberg; D
Durchflußzytometer FACScalibur <sup>®</sup>	Becton Dickinson, Heidelberg; D
Mikroskop mit Fluoreszenzeinheit	Zeiss, Göttingen; D
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Ochsenhausen; D
Gefrierschrank, -70°C Bio Freeze	Forma Scientific; USA
Glaspipetten	Hischmann, Eberstadt; D
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen; D
Laborzentrifuge Minifuge	Heraeus, Hanau; D
Heizblock	Neolab, Heidelberg; D
Horizontalschüttler	IKA-Werke, Staufen; D
Magnetheizrührer	Heidolph, Heidelberg; D
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar; D
Mikroskop	Zeiss, Göttingen; D
Milli-Q-Wasserreinigungssystem	Millipore, Eschborn; D
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen; D
MPC (magnet particle concentrator)	Dynal, Hamburg ; D
pH–Meßgerät	WTW, Weilheim i. OB; D
Pipettierhilfe Accujet	Brand, Wertheim; D

Präparierbesteck	Dumont; CH
Schüttler HS 501 digital	IKA-Werke, Staufen; D
Spektrophotometer	Laborsystems, Helsinki; Fl
Titertek Multiscan Plus MKII	
Sterilwerkbank, SterilGARD Hood	Baker, Sanford, Maine; USA
Vortex Reax 2000	Heidolph, Heidelberg; D
Waage	Sartorius, Göttingen; D
Wasserbad klein	Julabo, Seelbach; D
Wasserbad groß	Julabo, Seelbach; D
Zytospin 2	Shandon Inc., Pittsburgh; USA

### 2.2 Gebrauchsmaterialien

Glasgeräte	Schott, Mainz; D
Glaspipetten	Hischmann, Eberstadt; D
Hybridisierungskammern	Corning, Berlin; D
Multikanalpipette (8 Kanäle)	Rainin, Leiden; NL
Neubauer-Zählkammer (0,1mm Tiefe)	Brand, Wertheim; D
Pipetboy	Brand, Wertheim; D
Pipetten 2–1000µl	Gilson, Bad Camberg; D

#### 2.3 Verbrauchsmaterialien

γ-Counter Röhrchen aus Polystyrol	Greiner, Frickenhausen; D
Deckgläschen rechteckig	Langenbrink, Emmendingen; D
Deckgläschen rund	Langenbrink, Emmendingen; D
Einfrierröhrchen 1ml	Nalgene, Rochester; D
ELISpot <sup>®</sup> Platten	Millipore, Eschborn; D

ELISpot <sup>®</sup> –Klebefolien	Millipore, Eschborn; D
Save-lock-Röhrchen 0,5, 1,5 und 2ml	Eppendorf, Eppendorf; D
FACS-Röhrchen aus Polystyrol	Greiner, Frickenhausen; D
Filterpipettenspitzen	Fischer Scientific; USA
(0-10, 10-200, 200-1000µl)	
Fixogum	Patex, Bühl; D
Flachbodenplatten	Falcon BD, Heidelberg; D
6–, 24–, 48– und 96–Well	
Glasobjektträger (76 x 26 mm, Mattrand)	Langenbrink, Emmendingen; D
Glaspasteurpipetten (150 mm)	Fischer Scientific; USA
Leucosep <sup>®</sup> Tubes 50ml	Greiner, Frickenhausen; D
Parafilm	Neolab, Neolab; D
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg; D
(0-10, 10-200, 200-1000µl)	
Röhrchen 5ml	Greiner, Frickenhausen; D
Sterilfilter 0,22µm	Millipore
Zellkulturflaschen 25, 75 und 150cm <sup>2</sup>	Biochrom, Berlin; D
Zellkulturschalen 100x20mm	Biochrom, Berlin; D
Zellkulturschalen 6x15mm	Biochrom, Berlin; D
Zellschaber 24cm	Biochrom, Berlin; D
Zellsieb 40µm	Falcon BD, Heidelberg; D
Zentrifugenröhrchen 15 und 50ml	Biochrom, Berlin; D
96-Well Rundbodenplatte	Biochrom, Berlin; D
2.4 Chemikalien	

Aceton	Riedl-de Haen, Seelze; D	
Agar	Becton Dickinson, Heidelberg; D	
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe; D	
-----------------------------	-------------------------------	--
Ammoniumacetat	Sigma, Deisenhofen; D	
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt; D	
AP Konjugat-Substrat	Bio-Rad, München; D	
BCIP/NBT Substrat	Dako, Hamburg; D	
Bicarbonat	Merck, Darmstadt; D	
BSA (bovine serum albumine)	Sigma, Deisenhofen; D	
Chloroform	Merck, Darmstadt; D	
Cyclophosphamid	Baxter Oncology, Frankfurt; D	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt; D	
EDTA	Biochrom, Berlin; D	
Endobulin	Baxter, Unterschließheim; D	
Essigsäure, 100%	Merck, Darmstadt; D	
Ethanol, absolut	Riedl-de Haen, Seelze; D	
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen; D	
Ficoll 400	Biochrom, Berlin; D	
Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt; D	
Gelatine	Roche, Darmstadt; D	
Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt; D	
Heparin-Natrium	B.Braun, Melsungen; D	
Isopropanol	Riedl-de Haen, Seelze; D	
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt; D	
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt; D	
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen; D	
Natriumazetat	Merck, Darmstadt; D	
Natriumazid	Merck, Darmstadt; D	
Natriumchloridpulver	J.T.Baker, Deventer; NL	

Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen; D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt; D
Natronlauge, 10 N	Riedl-de Haen, Seelze; D
Paraformaldehhyd	Sigma, Deisenhofen; D
PBS (phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe; D
PBS–Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen; D
Schwefelsäure 97%	Merck, Darmstadt; D
SDS	Sigma, Deisenhofen; D
Tris	Merck, Darmstadt; D
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen; D
Tween20	Gerbu Biotechnik, Gaiberg; D
Typanblaupulver	Serva, Heidelberg; D
Wasserstoffperoxid 97%	Merck, Darmstadt; D

2.4.1 Lösunge	n und Reagenzien	
---------------	------------------	--

DTT (0,1M)	Invitrogen, Karlsruhe; D
25x AP Color Entwicklungspuffer	Bio-Rad, München; D
AP Color Reagenz A	Bio-Rad, München; D
AP Color Reagenz B	Bio-Rad, München; D
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin; D
Bio-Rad Proteinassay Lösung	Bio-Rad, München; D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche Diagnostics, Darmstadt; D
Endobulin	Baxter Oncology, Frankfurt; D
Eselserum	Santa Cruz, Heidelberg; D
Hühnerserum	Santa Cruz, Heidelberg; D
lsoton	Berlin-Chemie AG, Berlin; D

PBS–Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt; D
Triton-X 100	Invitrogen, Karlsruhe;
Trypsin–EDTA	Biochrom, Berlin; D
Tween 20	Invitrogen, Karlsruhe; D
Ziegenserum	Santa Cruz, Heidelberg; D

## 2.5 Medien und Mediensupplemente

Ampizillin	Invitrogen, Karlsruhe; D
DMEM-Pulver	Sigma, Deisenhofen; D
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg; D
Endothelial Cell Supplement	PromoCell, Heidelberg; D
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin; D
HEPES	Biochrom, Berlin; D
Humanes AB-Serum, männlich	Sigma, Deisenhofen; D
Penicillin/Streptomycin	Pan™ Biotech, Aidenbach; D
RPMI 1640–Pulver	Invitrogen, Karlsruhe; D
X-VIVO20	BioWhittaker, Vervier; B

# 2.6 Zytokine

rekombinantes humanes GM-CSF	EssexPharma; GB
rekombinantes humanes IL1– $\beta$	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes IL-2	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes IL-4	PromoCell, Heidelberg; D
rekombinantes humanes IL-10	PromoCell, Heidelberg; D

rekombinantes humanes TGF-ß	PromoCell, Heidelberg; D		
rekombinantes humanes Interferon– $\gamma$	PromoCell, Heidelberg; D		
rekombinantes humanes TNF- $lpha$	PromoCell, Heidelberg; D		
2.7 Antikörper und Farbstoffe			
271 Farbstoffe			

DAPI (bisBENZIMIDE)	Hoechst, Darmstadt; D
CMRA	Molecular Probes, Heidelberg; D
CFSE	Molecular Probes, Heidelberg; D
CMAC	Molecular Probes; Heidelberg; D

## 2.7.2 Konjugierte anti-Human Antikörper

Spezifität	Spezies	Konjugat	lsotyp	Klon	Referenz oder Firma
CD3	Maus	FITC	IgG <sub>2a</sub>	HIT3a	BD Pharmingen
CD3	Maus	PE	IgG <sub>2a</sub>	HIT3a	BD Pharmingen
CD4	Maus	PE	IgG1	RPA-T4	BD Pharmingen
CD4	Maus	PE-Cy5	IgG1	RPA-T4	BD Pharmingen
CD4	Maus	FITC	IgG1	RPA-T4	BD Pharmingen
CD8	Maus	PE-Cy5	IgG1	HIT8a	BD Pharmingen
CD8	Maus	PE	lgG₁	HIT8a	BD Pharmingen
CD8	Maus	FITC	IgG1	HIT8a	BD Pharmingen
CD144	Maus	FITC	IgG1	BZL04338	Biozol
CD31	Maus	FITC	IgG1	WM59	BD Pharmingen
CCR7	Ratte	PE	IgG <sub>2a</sub>	3D12	BD Pharmingen
CD162	Maus	PE	IgG1	KPL-1	BD Pharmingen
CD62-L	Maus	PE	IgG1	DREG-56	BD Pharmingen
CD56	Maus	PE	lgG1	B159	BD Pharmingen
CD69	Maus	PE	IgG1	FN50	BD Pharmingen
CD107a	Maus	FITC	IgG1	H4A3	BD Pharmingen
CD107a	Maus	PE	IgG1	H4A3	BD Pharmingen
CD25	Maus	FITC	IgG1	M-A251	BD Pharmingen
Ki-67	Maus	PE	IgG1	MOPC-21	BD Pharmingen

2.7.3 Unkonjugierte anti-Human Antikörper

Spezifität	Spezies	lsotyp	Klon	Referenz oder Firma
IL-10	Maus	IgG <sub>1</sub>	E1	Bender Med System
IL-12	Ziege	lgG	SE410	R&D Systems
Interferon γ	Maus	IgG <sub>1</sub>	T-1415	ВМА
TGF-B1	Kaninchen	lgG	V	Santa Cruz Biotechnology
CCL19	Maus	IgG <sub>2a</sub>	3W3	Santa Cruz Biotechnology
CCL25	Ziege	IgG	AF334	R&D Systems
CCL3	Maus	$IgG_{2a}$	14215.41	R&D Systems
CCL4	Kaninchen	IgG <sub>2a</sub>	4K31803	Bender Med System
CCR5	Ziege	IqG	ab1673-100	abcam
CCR7	Maus	IgG <sub>1</sub>	552175	BD Pharmingen
CCR9	Maus	IgG <sub>2a</sub>	112509	R&D Systems
LFA-1	Maus	lgG <sub>2a</sub>	555378	BD Pharmingen
ß1 integrine	Maus	IqG₁	4B7R	Santa Cruz Biotechnology
ß7 integrine	Kaninchen	laG	H-120	Santa Cruz Biotechnology
CD62-E	Ziege	laG	C-20	Santa Cruz Biotechnology
CD62-L	Kaninchen	IgG	H-149	Santa Cruz Biotechnology
CD62-P	Kaninchen	IgG	C2415-04A	US Biological
CD142 (tissue factor)	Maus	IgG <sub>1</sub>	612161	Calbiochem
CD166	Ziege	IgG	N-21	Santa Cruz Biotechnology
CD209	Maus	IgG <sub>1</sub>	551249	BD Pharmingen
CD3	Kaninchen	IgG <sub>1</sub>	E1254	Spring Bioscience
CD3	Maus	IgG <sub>2a</sub>	A-21330	Molecular Probes
CD31	Maus	IgG <sub>1</sub>	JC/70A	DAKO
CD4	Maus	IgG <sub>2b</sub>	18-46	Santa Cruz Biotechnology
CD4	Ziege	IgG	C-18	Santa Cruz Biotechnology
CD44	Ziege	IgG	N-18	Santa Cruz Biotechnology
CD56	Maus	IgG1	123C3	Santa Cruz Biotechnology
CD6	Maus	IgG1	SPV-L14	Santa Cruz Biotechnology
CD8	Maus	IgG <sub>2a</sub>	32-M4	Santa Cruz Biotechnology
CD8	Kaninchen	lgG	H-160	Santa Cruz Biotechnology
CD90	Maus	IgG1	AS02	dianova GmbH
EpCAM	Maus	IgG <sub>1</sub>		Gerd Moldenhauer, DKFZ
ICAM-1 (CD54)	Ziege	IgG	H-108	Santa Cruz Biotechnology
ICAM-2 (CD102)	Ziege	lgG	C-20	Santa Cruz Biotechnology
L1-CAM	Maus	IgG <sub>1</sub>	11A	Peter Altevogt, DKFZ
MAdCAM-1	Ziege	IgG	K-19	Santa Cruz Biotechnology
MHC-1	Kaninchen	IgG	H-300	Santa Cruz Biotechnology
pan-Cytokeratin	Maus	IgG1	C11	Santa Cruz Biotechnology
VCAM-1	Ziege	lgG	BBA19	R&D Systems
CD107a	Maus	IgG <sub>2a</sub>	555798	BD Pharmingen
CD25	Maus	IgG	ACT-1	DAKO
CD25	Kaninchen	lgG	C-20	Santa Cruz Biotechnology
CD69	Maus	IgG1	FN50	Santa Cruz Biotechnology
Ki-67	Maus	IgG	Ki-67	DAKO
Perforin 1	Ziege	IgG	K-19	Santa Cruz Biotechnology
FLT.1 (VEGFR)	Kaninchen	lgG	RB-1527-P1	NeoMarkers
VEGF	Ziege	lgG	AF-293-NA	R&D Systems
ADAM-15	Ziege	lgG	AF935	R&D Systems
FoxP3	Maus	lgG		Elisabeth Suri-Payer, DKFZ

2.7.4 Dy	nalbeads®
----------	-----------

Anti-Maus Pan IgG Beads	Dynal Biotech, Hamburg; D
Anti-Human CD3 Beads	Dynal Biotech, Hamburg; D
Anti-Human CD15 Beads	Dynal Biotech, Hamburg; D
Anti-Human CD19 Beads	Dynal Biotech, Hamburg; D
Anti-Human ExpanderBeads CD3/CD28	Dynal Biotech, Hamburg; D

#### 2.8 Enzyme

Kollagenase Typ1 CLS1	Cell Systems, Heidelberg; D
Dispase I	Roche, Darmstadt; D

#### 2.9 Kits

In situ cell death detection kit	Roche, Darmstadt; D
T-cell negative isolation kit	Dynal, Hamburg; D
CD4 & CD25 isolation kit	Dynal, Hamburg; D

#### 2.10 Proben und Zellen

Leukozytenkonzentrat (Buffy Coats)	Blutspendezentrale Heidelberg
Pankreasproteine aus Kontrollgewebe	BioCat, Heidelberg; D
Endothelzellen (CD31+)	Isolierung aus Pankreasgewebe
Tumorzellen (EpCAM+)	Isolierung aus Pankreasgewebe
	und aus Leukozytenkonzentrat
Fibroblasten (CD90+)	Isolierung aus Pankreasgewebe
T-Zellen (CD3+/CD4+/CD8+)	Isolierung aus Pankreasgewebe
	und aus Leukozytenkonzentrat

MCF-7 (humanes Mammakarzinom)	ATCC, [#HTB-22], Rockville; USA
PACA-68	#HTB-131, Rockville; USA
2.11 Software	
Analysis	
AxioVision	Zeiss, Göttingen; D
Cell Quest™ 3.3, 4.0.2	BD Bioscience, Heidelberg; D
Microsoft <sup>®</sup> Excel	Microsoft; USA
FlowJo 4.3	TreeStar, San Carlo; USA
FlowCytomixPro 1.0	Bender MedSystems, Wien; A
GraphPadPrism <sup>®</sup> 3.03	GraphPad Software Inc.; USA
KS ELISpot	Zeiss, Göttingen; D
LSM Image Browser	Zeiss, Göttingen; D
Microsoft <sup>®</sup> Powerpoint	Microsoft; USA
VisiCapture 1.1	Scion, Frederick; USA

#### 2.12 Datenbanken

NCBI	www.pubmed.de
Protein reviews on the web (PROW)	www.mpr.nci.nih.gov/prow/
Bioinformatic Harvester	www.harvester.embl.de
Ensembl Genome Browser	www.ensembl.org
Cytokine Pathfinder	www.copewithcytokines.de
Information Hyperlinked over Proteins	www.ihop-net.org

#### 2.13 Mäuse

NOD/SCID-Mäuse, 6-8 Wochen alt

Fa. Charles River, Sulzfeld

# 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Lösungen und Puffer

PBS	
NaCl	8 g
KCI	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
$NaH_2PO_4 \times 12H_2O$	2, 85 g
ad 11 ddH2O; pH 7,2; Lag	gerung bei 4°C

# 3.1.2 Medien und Mediensupplemente

<u>"T-Zellmedium" für humane T-Zellkulturen; pH 7,4</u>		
RPMI 1640	10 ml	
HEPES	10 mM	
Humanes AB-Serum	10 % (v/v)	
Penicilin	50 µg/ml	
Streptomycin	50 µg/ml	
IL-2	100 Einheiten/ml	
IL-4	60 Einheiten/ml	
FZPM (Endotholzall Pacal Madium M)(); pH 7 4		

EZBM (Endotheizen	Basal Medium MV), pH 7.4
EZBM MV	10 ml
HEPES	10 mM
Penicilin	50 µg/ml
Gentamycin	50 µg/ml
bFGF	560 Einheiten/ml
Hydrokortison	100 Einheiten/ml

<u>"Einfriermedium"</u>	
X-VIVO 20	5 ml
Humanes AB-Serum	5 ml
DMSO	10 % (v/v)

#### 3.1.3. Isolierung von mononukleären Zellen

Wie von Bai et al. (2002) und Solomayer et al. (2003) beschrieben wurde, Zellen konnten mononukleäre aus peripherem Blut mittels Ficoll Dichtegradient isoliert werden. Hierzu wurden 15ml Biocoll-Lösung (Dichte: 1,077g/cm<sup>3</sup>) in ein Zentrifugenröhrchen (50ml) pipettiert. Daraufhin wurden vorsichtig 15ml RPMI-Medium zugegeben. Dabei darf es nicht zur Vermischung der beiden Lösungen kommen. Nach der Zugabe von 20ml peripherem Blut wurde das Lösungsgemisch einer Zentrifugation von 20min. bei RT und 2000rpm ohne Bremse unterzogen. Nach der Zentrifugation ist eine deutliche Interphase entstandenen in der sich die mononukleären Zellen befinden. Diese konnten vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und zweimal in PBS gewaschen werden. Anschließend wurden eventuell noch vorhandene Erythrozyten mit 5ml Erylysepuffer, welcher vorher durch einen 0,2µm Filter sterilisiert wurde, zerstört. Die Inkubation hierbei erfolgte für 5min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Suspension mit PBS auf 40ml aufgefüllt und anschließend abermals zentrifugiert. Danach konnten die DC und T-Zellen getrennt kultiviert werden.

3.1.4 Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen

Verwendete Lösungen und Reagenzien PBS 0,4% Dispase Trypsin-EDTA-Lösung FKS (Fötales Kälberserum) Endothelial Cell Basal Medium MV mit Supplement (15%FKS, 2,5ng/ml bFGF, 10µl/ml Natrium-Heparin, 1% Penicillin/Streptomycin)

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden aus dem Pankreasgewebe isoliert. Das Gewebe wurde in eine große Petrischale gelegt und mit wenig PBS benetzt. Überschüssiges Gewebe, wie makroskopisch sichtbare Gefäße, wurde mit einer stumpfen, gebogenen Schere von der Haut entfernt. Danach wurde das Gewebe mechanisch in etwa 3x3mm große Stücke zerlegt, mit PBS gewaschen und über Nacht (12–18 Stunden) bei 4°C in 3–4ml 0,4%ige Dispase inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Dispase abgesaugt und die Gewebestücke 3x mit PBS gewaschen. Die Stücke wurden in PBS gesammelt. Nach dem Absinken der Stücke, wurde das überstehende PBS abgesaugt. Daraufhin wurden die Stücke in 5ml 0,02% EDTA in PBS mit 0,04% Trypsin für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei das Röhrchen zwischendurch mehrmals vorsichtig bewegt werden sollte. Nun wurde der Überstand abgesaugt und mittels 2 ml hitze-inaktiviertem FKS konnte der Verdauungsvorgang gestoppt werden.

Im Anschluß wurden die Gewebestücke in eine Petrischale geschüttet und 5ml EZBM (Endothelial Cell Basal Medium, ECBM) zugegeben. Mit der Rückseite eines Skalpells wurde nun jedes Gewebestückchen ausgedrückt, wodurch die einzelnen Zellen aus dem Gewebe gelöst werden können. Die gewonnene Zellsuspension enthält sowohl mikrovaskuläre Endothelzellen als auch kontaminierende Zelltypen (Erythrozyten). Die Zellsuspension wurde dann durch einen 100µm-Filter gegeben (mit PBS nachspülen) und bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml Medium aufgenommen und in einer Gelantine-beschichteten 75cm<sup>2</sup>-Kulturflasche ausgesät. Nach 24h wurde das Kulturmedium der Primärkultur (PO) gewechselt. Bevor die Kultur einen konfluenten Status erreicht (ca. 3 Tage nach der Aussaat) werden mikrovaskuläre Endothelzellen von den anderen Zellen durch immuno-magnetische Isolation mit CD31-Dynabeads laut Herstelleranweisung getrennt und in einer neuen Flasche ausgesät. Die CD31-Trennung erfolgt sowohl in P1 als auch in P2 um eine reine Endothelzell-Kultur zu erlangen. Alternativ kann zur Messung der endothelialen CAM-Expressionen auf den Enzymverdau verzichtet werden. Durch die rein mechanische Dissoziation werden aber weniger Zellen gewonnen (siehe 3.1.5).

#### 3.1.5 Disseminierung von Gewebeproben

Die frischen, in PBS aufgenommenen und gekühlten Gewebestücke wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS (1x) in einer sterilen Glas-Petri-Schale mit Pinzette und Einmalskalpell in kleinstmögliche Stücke zerschnitten (ca. 1mm<sup>3</sup>). Die Pinzette wurde jeweils vor und nach Gebrauch mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach der Zerkleinerung wurden die Gewebsstücke zusammen mit der Flüssigkeit mit Hilfe einer Pasteur-Pipette (25ml) für etwa 5–10min in D-PBS resuspendiert. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde die Lösung durch einen Einzelzellfilter in ein 50ml-Tube überführt. Anschließend wurde die zuletzt beschriebene Prozedur zwei- bis dreimal wiederholt indem immer wieder zusätzlich PBS zu den Gewebestücken zugefügt und resuspendiert wurde. Nachdem etwa 50ml der PBS-Einzelzellsuspension zusammen gekommen war, wurde zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgezogen war, konnte das Pallet zur weiteren Verarbeitung (FACS-Färbung oder Sorten) der Zellen herangezogen werden.

#### 3.1.6 Einfrieren solider Gewebe

Teile von soliden Geweben wurden unter sterilen Bedingungen in ein Kryo-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 3.2 Kultivierung von Zellen

#### 3.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5 min, 1400 rpm) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 900  $\mu$ l "Einfriermedium" in Kryoröhrschen aufgenommen. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l DMSO (Endkonzentration 10 %) wurden die Röhrchen bei –70°C eingefroren bzw. nach 24–48h in flüssigen Stickstoff überführt und aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurde auf 37°C erwärmtes EZBM mit einer Pasteurpipette zur Zellsuspension zugegeben und resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1400 rpm, um die Zellen vom zytotoxischen DMSO zu befreien. Schließlich wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen ausgesät.

#### 3.2.2 Beschichten der Zellkulturgefäße

Alle verwendeten Zellkulturgefäße wurden mit einer 2%-igen Gelatinelösung oder Fibronektinlösung beschichtet. Die Gelatine wurde dafür zunächst in aqua bidest. gelöst und für eine Stunde autoklaviert. Die sterile Gelatinelösung wurde auf die Kulturflaschen-Oberfläche aufgetragen (4ml pro 75cm<sup>2</sup> Oberfläche). Es folgte eine Inkubation für mindestens 30min. im Brutschrank bei 37°C. Vor der Kultivierung der Zellen wurde die Gelatinelösung wieder abgesaugt.

#### 3.2.3 Zellaussaat

#### Zellaussaat in Zellkulturflaschen

Verwendete Lösungen und Reagenzien: Endothelial Cell Basal Medium MV Fibronektinlösung 5µl/ml PBS, 5ng/ml PBS 37°C Trypsin-EDTA 37°C

Nach der Isolation der Zellen wurde die Zellsuspension mit jeweils 10ml Kultivierungsmedium in die Zellkulturflaschen überführt. Nach 24h Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die Kultur im Verhältnis 1:3 passagiert (die Zellen werden in 12 ml Medium gut resuspendiert und danach werden je 4 ml Medium in 25cm<sup>2</sup>–Kulturflaschen überführt).

#### Zellaussaat auf Mikrotiterplatten

Verwendete Lösungen und Reagenzien: Endothelial Cell Basal Medium MV Fibronektinlösung 5µl/ml PBS PBS 37°C Trypsin-EDTA 37°C

Mikrotiter-Platten (96-well) wurden mit je 50µl Fibronektin beschichtet und mindestens 1h im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Während dieser Phase wurden die Zellkulturen steril aufgearbeitet und zur Zellaussaat vorbereitet (Absaugen des Mediums und Waschen mit 5ml PBS pro 75cm<sup>2</sup> Oberfläche). Nachfolgend wurden die Zellen enzymatisch mit Trypsin-EDTA abgelöst. Das Trypsin-EDTA-Gemisch wird nach 10 Sekunden wieder abgesaugt. Nach 2 minütiger Inkubation bei 37°C lösen sich die Zellen und werden wieder in EZBM überführt. Nach sorgfältigem Resuspendieren (verhindert Aggregation) wurde die Zellzahl der Suspension mittels der Neubauer-Kammer bestimmt. Vor der Aussaat der Zellen wurde das Fibronektin entfernt und 100µl der verdünnten (4500 Zellen/100µl) Zellsuspension pro well pipettiert.

#### Zellaussaat auf Kammerobjektträger

Verwendete Lösungen und Reagenzien: Endothelial Cell Basal Medium MV Fibronektinlösung 5µl/ml PBS PBS 37°C Trypsin-EDTA 37°C

Zur Fluoreszenzfärbung der mikrovaskulären Endothelzellen wurden sogenannte Kammer-Objektträger verwendet. Die Zellzahl wurde nach Ablösen der Zellen aus der Kulturschale (Trypsin-EDTA) mit der Neubauer-Kammer bestimmt. Währenddessen wurden die Glasobjektträger mit Fibronektin mindestens 30 min. beschichtet. Danach wurden 10000 bis 50000 Zellen pro Einzelkammer ausgesät.

#### Zellaussaat für die Spheroidkonstruktion

Für die Konstruktion der Spheroide wurde ein hochviskoses Medium angesetzt, welches die Aggregation der Einzelzellen verhindern sollte. Es wurden 2g Methylzellulose in jeweils 50ml EZBM gegeben und geschüttelt. Danach wurde die Lösung für zwei Stunden bei 4000rpm zentrifugiert. Anschließend kann der viskose Überstand mit Hilfe einer Glaspipette abgenommen werden und in ein neues Gefäß überführt werden. Um das Endmedium herzustellen, werden EZBM und viskoser Überstand im Verhältnis 70%/30% (v/v) gemischt. Dieses hochviskose Medium kann bei -20°C eingelagert werden.

Die Zellaussaat erfolgte nach der Isolierung von 4000-20000 Endothelzellen. Diese wurden in 400µl hochviskoses Medium überführt und in nichtadhäsiven 96-well Zellkulturplatten ausgesät. Nach etwa 48h können die gebildeten Spheroide mit Hilfe einer 1000µl Pipette in die jeweiligen Reaktionsgefäße überführt werden

#### 3.2.4 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Trypanblau-Färbelösung		
Trypanblau	1,28 g	
NaCl	8,5 g	
ad 11 ddH2O; sterilfiltriert;	mit Natriumazid (	(NaN <sub>3</sub> , Endkonzentration $1\%$ )
versetzt; Lagerung bei RT		

Die Zelldichte einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei entspricht die Zellzahl, die in 16 Zählquadranten gezählt wird, der Anzahl der Zellen in 0.1  $\mu$ l und wurde daher noch mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Zellzahl pro ml Suspension zu erhalten.

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde die Zellsuspension vor dem Auszählen 1:2-1:10 mit einer Trypanblau-Lösung (0.02 %) verdünnt. Dieser Farbstoff dringt nur in toten Zellen ein und färbt diese blau.

Alternativ wurde für die Auszählung der Transmigrationen die computerunterstützte Zellzählmaschine "Coulter Counter" benutzt. Dabei werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Lichtstrahl vorbeigeführt. Die Unterbrechung des Lichts wird quantifiziert und durch die Dauer der Unterbrechung kann die zusätzlich die Zellgröße bestimmt werden.

#### 3.2.5 Ablösen der Zellen

Generell wurde der Zellkulturüberstand nach Kultivierung abgenommen und der Monolayer mit PBS gespült. Nach dem Absaugen des PBS wurden ca. 2ml Trypsin-EDTA-Gemisch für eine 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche zugegeben und für 10s geschwenkt. Danach wurde das Gemisch sofort wieder abgesaugt und die Zellen zur Unterstützung des Ablöseprozesses für ca. 2min. bei 37°C inkubiert. Die so abgelösten Zellen wurden nun entweder in Medium oder 10%FKS/PBS aufgenommen und weiterverarbeitet.

#### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Gewebslysat

Solide Tumore wurden direkt nach der Entnahme in der Primäroperation in "RPMI-Medium" bei -20°C eingefroren. Zur Herstellung von Lysat wurden die Gewebe aufgetaut, gegebenenfalls anhaftendes Fettgewebe entfernt und die Gewebe mittels Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke in 5 ml Röhrchen mit 500 µl PBS überführt und mit Hilfe eines Dispergiergerätes homogenisiert. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde das Dispergiermesser vor und nach jeder Benutzung dreimal mit 0,2 N Natronlauge und anschließend sechsmal mit ddH<sub>2</sub>O gespült.

Die Gewebssuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, durch einen Sterilfilter (0,22  $\mu$ m) filtriert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe 3.3.3) die Proteinkonzentration bestimmt und das Gewebslysat bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.3.2 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten aus primären mononukleären Zellen und Tumorzellen wurden die entsprechenden Zellen zentrifugiert und fünfmal mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde je nach Größe in 50-100 µl PBS aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Durch fünfmaliges, abwechselndes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurde eine vollständige Lyse der Zellen erreicht. Das Lysat wurde für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (siehe 3.3.3) wurde das Zelllysat bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford *et al.*, 1976) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* von 465 nm zu 595 nm durch nicht-kovalente Bindung an Protein in saurer Lösung. Dabei verhält sich die Absorption bei 595 nm direkt proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Eine Eichkurve zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe von standardisierten Proteinlösungen bekannter Rinderserumalbumin-Konzentrationen (0.1 –1.4 mg/ml) erstellt. Die Farblösung "BioRad<sup>®</sup>-Protein Assay" wurde 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 200 µl dieser Lösung mit 5 µl der unbekannten Probe bzw. der bekannten Standard-Proteinlösungen in Duplikaten pipettiert. Nach Beendigung einer 5-minütigen Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Eichgerade wurde mit dem Computerprogramm *Graph Pad Prism* erstellt und daraus die Konzentration der Proben ermittelt.

#### 3.4 Analytische immunbiologische Methoden

#### 3.4.1 Lösungen und Medien

<u>5 % AB-Medium</u>	
RPMI komplett	475 ml
Humanes AB-Serum	25 ml
FACS-Puffer	
1 x PBS	50 ml
FKS	1 % (v/v)

#### 3.4.2 Klinisches Material von Pankreasgewebsdonoren

Klinisches Material wurde den Tumorpatienten nach schriftlicher Einwilligung in der Universitätsklinik Heidelberg im Bereich Chirugie entnommen. Dabei wurde das Pankreasgewebe sofort nach der Operation in EZBM überführt und innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet oder kryokonserviert und bei -70°C aufbewahrt.

# 3.4.3 Isolierung spezifischer Immunzellpopulationen über Zelloberflächenmoleküle

Zur Isolierung bzw. Depletion bestimmter Zellfraktionen wurden magnetische Dynabeads<sup>®</sup> eingesetzt. Dynabeads<sup>®</sup> sind monodisperse Polystyrol-Beads, die mit einer gleichmäßigen Schicht an Eisenoxiden (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) überzogen sind. An die Oberfläche der Beads sind Antikörper gekoppelt, die entweder gegen bestimmte Oberflächenantigene oder Immunglobuline gerichtet sind. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften lassen sich spezifisch an die Beads gebundene Zellen mit Hilfe eines Magnetfeldes anreichern.

#### 3.4.4 Anreicherung von T-Lymphozyten mittels Dynabeads®

T-Lymphozyten aus peripherem Blut wurden durch die Depletion von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), B-Lymphozyten sowie myeloischen Zellen mit Hilfe von Dynabeads<sup>®</sup> angereichert.

Zur Depletion von NK-Zellen wurde monoklonaler Maus-anti-Human-CD56-Antikörper an anti-Maus-IgG-Beads gekoppelt. Für 10<sup>7</sup> Zellen wurden hierzu 100 µl anti-Maus-IgG-Beads zweimal mit RPMI-Medium gewaschen und mit 20 µl anti-CD56-Antikörper (0,2 mg/ml) für 30 min. bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Antikörper-Bead-Mischung wurde dann für 1 min. in den *Magnetic Particle Concentrator* (MPC) überführt, die Beads zweimal mit RPMI-Medium gewaschen und nachfolgend in 100 µl "T-Zell Medium" aufgenommen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Für die Depletion von B-Lymphozyten und myeloischen Zellen wurden kommerzielle anti-Human-CD19- bzw. anti-Human-CD15-Beads eingesetzt. Für 10<sup>7</sup> Zellen wurden 100 µl der jeweiligen Beads in RPMI-Medium gewaschen und in 200 µl "T-Zell Medium" resuspendiert.

Die Beads wurden zu den T-Zellen zugegeben und für 25min. bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die sich im Überstand befindlichen TZ wurden anschließend mittels MPC isoliert. Dazu wurde das Röhrchen am MCP fixiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, um die Beads und die daran anhaftenden Zellen vollständig zu entfernen. Durch diese Methode konnte eine durchschnittliche TZ-Anreicherung von ca. 95 % erzielt werden. 3.4.5 Anreicherung von CD4+CD25- T-Zellen und Tregs mittels Dynabeads<sup>®</sup>

Zunächst wurden T-Lymphozyten wie in Abschnitt 3.4.4 mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten Dynabeads angereichert. Das Zellsediment wurde in RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Jeweils 2 x 108 Zellen wurden anschließend in 500µl RPMI-Medium aufgenommen und jeweils 50µl anti-CD4-Beads zugegeben und das Gemisch für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde RPMI-Medium zur jeweiligen Zellsuspension zugegeben und zum Entfernen ungebundener Antikörper einmal gewaschen. Die CD4<sup>+</sup> Zellen wurden nach Separation im Magnetfeld in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Antikörper und die Beads sind über DNA-Verbindungsstücke miteinander verbunden, so dass die Beads mit Hilfe von DNAse I (1µg/ml) von den Zellen entfernt werden können. Anschließend Zellen nach erneutem Waschen Medium wurden die in frischem aufgenommen (1ml) und mit anti-CD25-Beads inkubiert. Dabei betrug die Inkubationszeit erneut 30min. auf Eis. Nach erneutem Waschen. nachfolgender Separation und Ablösen der Beads von den Zellen, konnten CD4+CD25+ T-Zellen von CD4+CD25- Zellen unterschieden werden. Die Reinheit der Aufreinigung wurde mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

#### 3.4.6 Anreicherung mikrovaskulärer Endothelzellen mittels Dynabeads®

Nach mechanischer Aufarbeitung des Gewebes (3.1.4) konnte die Einzelzellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Mit Hilfe von anti-CD31-Beads konnten Endothelzellen aus dem Zellgemisch isoliert werden indem nach 30 minütiger Inkubation auf Eis die Zellen in EZBM gewaschen wurden und die Separation in einem magnetischen Feld stattfand.

#### 3.4.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Coons *et al.*, 1995) ist ein Verfahren, bei dem Zellen in einem Flüssigkeitsstrom phänotypisch charakterisiert und quantifiziert werden können. Dabei geben Unterschiede in Lichtbeugung und Lichtstreuung Aufschluss über Größe sowie Granularität der Zellen. Mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern können definierte Zelloberflächenstrukturen oder intrazelluläre Proteine markiert und untersucht werden.

In einem Flüssigkeitsstrom der an einem Laserstrahl vorbeigelenkt wird verursachen die Zellen eine Lichtstreuung, die zellgebundene Fluorochrome zur Fluoreszenzstrahlung anregt. Die Photomultiplier detektieren das gestreute Licht. Es gibt Auskunft über Größe und Granularität der Zellen. Die Fluoreszenzstrahlung, welche die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche bzw. im Zellinnern nachweist wird zusätzlich detektiert.

Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur bestimmt, das mit zwei Lasern unterschiedlicher Anregungswellenlänge ausgestattet ist. Die relative Grün– (FITC-konjugierte Antikörper), Orange– (PE-konjugierte Antikörper) bzw. Rot-Fluoreszenz (CyChrome-konjugierte Antikörper; PI) wurde mit einem Argon-Krypton-Laser, mit einer Wellenlänge von 488 nm, bestimmt. Mit Hilfe des Helium-Neon-Laser wurde die relative Tiefrot-Fluoreszenz bei 366 nm (APC-konjugierte Antikörper) induziert. Je nach Experiment wurden 2x10<sup>4</sup> bis 10<sup>5</sup> Ereignisse aufgenommen und anschließend mittels *FlowJo*-Software analysiert.

Pro Ansatz wurden  $2\times10^4$ – $2\times10^6$  Zellen zweimal mit eiskaltem FACS–Puffer (je 500 µl) gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 50 µl (2,5 mg/ml) Endobulin aufgenommen und für 10min. auf Eis inkubiert. Endobulin enthält humanes IgG, welches Fc–Rezeptoren und somit unspezifische Bindungsstellen für die Fluoreszenz–konjugierten Antikörper absättigt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit eiskaltem FACS–Puffer (je 500 µl) gewaschen und in 50 µl Antikörperlösung (Verdünnung 1:5 in FACS–Puffer) für 15min. auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zweimal mit 500 µl FACS–Puffer gewaschen und in 50 µl FACS–Puffer aufgenommen.

#### Nachweis von toten Zellen mittels Propidiumiodid-Inkorporation

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender aromatischer Kohlenwasserstoff, der von spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen nach einsetzender Permeabilisierung der Zellmembran inkorporiert wird und schließlich in die DNA interkaliert. PI kann sowohl zur Ermittlung der Anzahl toter Zellen innerhalb einer Gesamtpopulation als auch zum Ausschluss toter Zellen bei der Analyse definierter Oberflächenmoleküle herangezogen werden.

Nach der Inkubation mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurde kurz vor der Messung im Durchflußzytometer 1µg/ml Pl zugegeben und die Zellen für ca. 1min. inkubiert. Nachweis von apoptotischen Zellen mittels Phosphatidylserin-Färbung durch Annexin V

Phosphatidylserin (PS) ist ein negativ-geladenes Phospholipid, das an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist. In einer frühen Phase des programmierten Zelltods (Apoptose) kommt es zu einer Umordnung der Phospholipide, wonach PS auf der Zelloberfläche exponiert wird (Martin *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 1996). Dies bildet ein spezifisches Signal für die Erkennung und Entfernung apoptotische Zellen durch Makrophagen (Verhoven *et al.*, 1995). Das Oberflächen-exprimierte PS kann durch Annexin V, einem Kalzium- und Phospholipid-bindenden Protein, spezifisch detektiert werden. Zur Bestimmung früh-apoptotischer Zellen wurden die Zellen nach der Färbung mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern einmal mit eiskaltem Annexin V-Bindungspuffer gewaschen, in 100µl Annexin V-Bindungspuffer aufgenommen und mit 1 µl FITC-konjugiertem Annexin V für 15min. auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit Annexin V-Bindungspuffer gewaschen und anschließend 50µl in Annexin V-Bindungspuffer zur Analyse im Durchflußzytometer aufgenommen.

Als Positivkontrolle wurden autologe Zellen wie oben beschrieben gefärbt, die zuvor 30min. mit 300µl Formaldehyd (3 %) auf Eis inkubiert worden waren.

#### 3.4.8 Immunhistologische Antikörperfärbungen

In Vorbereitung für die immunhistologischen Färbungen wurden am Kryostat bei -20°C 5µm dicke Schnitte aus verschiedenen Donorgeweben hergestellt und auf Objektträger gebracht. Die Schnitte wurden dann mit eiskaltem Aceton fixiert (5min. bei RT). Die Schnitte können darauffolgend für die Färbungen eingesetzt werden.

Immunhistochemische Färbetechniken erlauben die Sichtbarmachung von Gewebe- bzw. Zellantigenen. Dabei wurden ursprünglich direkte Färbetechniken genutzt, bei der die Antikörper direkt an Enzyme gekoppelt waren, die einen Substrat-Farbumschlag an der Stelle der Antigenexpression verursachen. Mit Einführung der indirekten Methode verbesserte sich auch die Sensitivität signifikant. Dabei wird ein Sekundärantikörper genutzt der den jeweiligen Primärantikörper bindet und sein Signal verstärkt.

Bevor die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte, wurde das Gewebe mit Serum aus der Herkunftsspezies des jeweiligen Sekundärantikörpers inkubiert um unspezifische Bindungen zu vermeiden. In dieser Arbeit wurden ungekoppelte Primärantikörper eingesetzt (45min. bei Raumtemperatur (RT)), die die jeweiligen Antigene markieren. Danach wurden die Gewebeschnitte 3x je 5min. mit PBS bei RT gewaschen. Darauffolgend wurde das Gewebe im abgedunkelten Raum mit einem fluorochrom-gekoppelten Antikörper inkubiert, die die Primärantikörper detektieren. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 45min. bei RT. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS konnten die Gewebe zusätzlich mit DAPI inkubiert werden. Dieser Farbstoff bindet an die DNA der Zellen und markiert die Zellkerne.

Abschließend wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit 150µl Kaiser´s Glyzeringelatine eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### 3.4.9 Immunzytologische Antikörperfärbungen

Für die immunzytologischen Färbungen wurden Einzelzellsuspensionen (bis zu 500000 Zellen/ml) mit Hilfe der Zytospin-Apparatur bei 500rpm 3min. auf die Aminosäure-gekoppelten Objektträger zentrifugiert. Diese erhöhen die adhäsiven Kapazitäten der Glasoberfläche. Nach Zentrifugation wurden die Zellen 5min. in eiskaltem Aceton fixiert. Danach standen sie für die Färbungen zur Verfügung.

#### 3.4.10 ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Mit Hilfe des ELISA-Tests lassen sich lösliche Moleküle, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Zytokine in Zellkulturüberständen quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentration von IL-10 und TGF- $\beta$ 1 in den den Pankreasgeweben bestimmt.

Die zu untersuchenden Proben werden in eine Mikrotiterplatte inkubiert, die mit einem polyklonalen Zytokin-spezifischen Antikörper beschichtet ist. Das in den Proben befindliche Zytokin wird durch die Bindung an den Erstantikörper immobilisiert und durch einen zweiten Enzym-gekoppelten Antikörper, der spezifisch für das jeweils zu detektierende Zytokin ist, detektiert. Dieser katalysiert in einer nachfolgenden Substratreaktion die Bildung eines farbigen Produkts, wobei die Farbentwicklung direkt proportional zur Menge an gebundenem Zytokin ist. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bekannter Zytokin-Standardkonzentrationen kann eine Eichgerade erstellt werden und somit die Menge an vorhandenem Zytokin ermittelt werden.

Für folgende ELISA-Tests gab es Abweichungen zum oben beschriebenen funktionellen Prinzip. Im Falle von TGF- $\beta_1$  war die Mikrotiterplatte mit TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ II überzogen. Latentes TGF- $\beta_1$  wurde zunächst durch und nachfolgender Neutralisierung Ansäuerung zu immunaktivem, detektierbarem TGF- $\beta_1$  umgewandelt. Für die hochsensitive Quantifizierung von IL-10 wurde eine Verstärkung des Signals durch einen zusätzlichen Schritt erzielt. Das an das Zytokin-spezifischen Antikörper konjugierte Enzym Alkalische Phosphatase (AP) dephosphoryliert Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) zu Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), welches als spezifischer Kofaktor zur Aktivierung eines Reduktions-Oxidations-Kreislaufs dient. In diesem Kreislauf katalysiert das Enzym Diaphorase die Reduktion eines Tetrazolium-Salz zu einem intensiv gefärbten Formazan-Farbstoff unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD+. Letzteres dient wiederum als Kofaktor in einer nachfolgenden Alkohol-Dehydrogenase katalysierten Reaktion, bei der NADH durch Oxidation von Ethanol regeneriert wird. Die Reduktionsrate des Tetrazolium-Salzes und damit die Menge des farbigen Reaktionsprodukts ist direkt proportional zur Menge an Platten-gebundenem Zytokin.

Prinzipiell wurden pro Loch der beschichteten Mikrotiterplatte 50µl Testpuffer vorgelegt und mit 200 µl Standard bzw. Probe pro Loch für 2–3h bei RT inkubiert. Die Platte wurde viermal gewaschen und mit 200 µl Zytokinkonjugat pro Loch erneut für 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurde viermal gewaschen und 200µl Substratlösung pro Loch zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 30min. bei RT unter Lichtausschluss wurde die Reaktion mit 50µl Stop–Lösung pro Loch abgestoppt und die Absorption innerhalb der nachfolgenden 30min. im Photometer gemessen. Dabei erfolgte die Absorptionsmessung für IL–10 bei 490 nm und für TGF– $\beta_1$  bei 450 nm. Je nach zu bestimmenden Molekül ergaben sich Abweichungen von diesem allgemeinen Protokoll, die nach Herstellerangaben befolgt wurden.

#### 3.5 Spheroid–Adhärenztests

Im Spheroid-Adhärenztest sollten die Adhärenz-Fähigkeiten der Tregs und der CD4+CD25- T-Zellen getestet werden. Dazu wurden 4000-20000 Endothelzellen pro 96-well ausgesät. Als Zellkulturplatten dienen nichtadhäsive PET-Platten mit Rundboden. Als Medium wird ein Gemisch aus hochviskosem Methylzellulose-Medium und EZBM im Verhältnis 30% zu 70% benutzt. Die Zellen aggregieren in diesem Medium nach etwa 24h und nach 48h liegen stabile Spheroide vor, die in den Test eingesetzt werden können. Es wurden jeweils Spheroide aus Tumor- und Kontrollendothelzellen hergestellt, wobei die Kontrollendothelzellen vor dem Test mit autologem PBMZ-Lysat kultiviert wurden und die Tumorendothelzellen mit autologem Tumor-Lysat. Es wurde jeweils ein Spheroid aus Tumorund Kontrollendothelzellen pro well ausgesät. Sofort danach wurden die T-Zell unterschiedlicher Fluorochrom-Markierung Subpopulationen die mit versehen waren in Kokultur gebracht. Nach 4h wurde der Überstand abgenommen, die Spheroide gewaschen und die Anzahl der jeweils adhärierten Tregs und CD4+CD25- T-Zellen mikroskopisch ausgezählt. Dieser Test wurde pro Donor mindestens dreimal wiederholt und die Zellzahlen wurden gemittelt.

#### 3.6 *In vitro* Angiogenesetest

In dem in vitro Angiogenesetest sollten die Kapazitäten von Tumor- und Kontrollendothelzellen zur Angiogenese-Induktion getestet werden. Dazu wurden Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollgewebe isoliert und je 20000 Zellen auf etwa 200µl Matrigel pro well in einer 96well Platte ausgesät und mit PBMZ- oder Tumor-Lysat behandelt (50µg/ml; 2d). Nach zwei Tagen wurde die Anzahl der ausgebildeten tubulären Fortsätze pro  $\rm mm^2$ mikroskopisch ausgezählt. Dabei wurden drei Tumorund drei Kontrolldonoren herangezogen. Zu jedem Donor wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt.

#### 3.7 *In vitro* Transmigrationstest

Für die *in vitro* Transmigrationstests wurden Transwell-Membran-Einsätze mit einer Porengröße von 3µm zunächst 30min. bei 37°C mit Fibronektin beschichtet (5µg/ml). Danach wurden 30000 Endothelzellen pro Membran ausgesät. Pro Donor wurden zwei Membranen mit Tumorund Kontrollendothelzellen beschichtet. Dieser Ansatz wurde mindestens dreimal wiederholt. Nach 2d Inkubation bei 37°C hatte sich ein konfluenter Zellrasen gebildet. Zur Imitation der physiologischen Bedingungen im Tumorgewebe, wurden Tumorendothelzellen mit autologem Tumor-Lysat kultiviert. Als Kontrolle dienten Kontrollendothelzellen, welche mit PBMZ-Lysat kultiviert wurden. Zwischenzeitlich wurden verschiedene T-Zell Populationen aus autologen Blutproben isoliert und im Test eingesetzt. Als chemoattraktives Molekül, wurde das Medium in der unteren Kammer mit SDF-1 (100ng/ml) versetzt. Nach 24h wurde die Anzahl der transmigrierten T-Zellen mit computer-unterstützter Auszählung am Coulter Counter bestimmt. Bei den Blockade-Experimenten wurden die Endothelzellen oder die T-Zellen 4h vor Transmigrationsbeginn mit blockierenden Antikörpern dem im Mediumüberstand blockiert. Danach wurde überschüssiger Antikörper im Überstand weggewaschen und frisches Medium zugeführt.

#### 3.8 *In vivo* Kammer Experimente

Die Tierexperimente wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzrecht und den Tierschutzbestimmungen des Landes Baden-Würtemberg durchgeführt. Es wurden immundefiziente NOD/SCID Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen verwendet. Somit war sichergestellt, das die Mäuse die injizierten Endothelzellen und T-Zellen nicht abstoßen.

Die Mäuse wurden mit subkutanen (s.c.) Injektionen von 150µl Anästhetikum betäubt. Dieses bestand aus einer Mischung Rompun® (2%) und Ketanest® (25mg/ml) in PBS in einem Verhältnis von 1:1:1 (v/v).

Die implantierten Kammern bestehen aus gestanzten Deckeln von 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Diese sind auf der einen Seite mit einem Silikon-Deckel (Durchmesser: 15mm) verschlossen und auf der anderen Seite mit einer Transwell-Membran, die eine Porengröße von 3µm hat. Die Membran wurde *in vitro* mit 20000-50000 Endothelzellen aus dem Pankreasgewebe beschichtet. Für die genaue Bauanleitung der Kammer sei auf die Doktorarbeit von Herr Dr. Jochen Schwendemann verwiesen (2004).

Nach Betäubung der Mäuse wurde die ventrale Seite mit einem zur linea alba parallel geführten Schnitt von ca. 1,5cm Länge geöffnet. Die Kammer wurde nun zwischen Unterhaut und das das Peritoneum umgebene Bindegewebe eingeführt. Hierbei lag die Transwell-Membran auf dem Bindegewebe und der Silikondeckel unter der Haut, so dass ein nachträgliches Injizieren durch Haut und Silikondeckel ermöglicht wurde. Pro Tier wurden zwei Kammern auf die gleiche Flanke implantiert. Eine Kammer war mit Kontrollendothel, die andere mit Tumorendothel beschichtet. Danach wurde die Wunde mit Klammern verschlossen. Nach sieben Tagen war die Kammer ausreichend vaskularisiert, so dass die jeweiligen T-Zell Subpopulationen nun intravenös (i.v.) in die Mäuse injiziert werden konnten. Nach 2-4 weiteren Tagen wurden die Tiere geopfert um die Kammer-infiltrierenden Zellen zu quantifizieren.

#### 3.9 Darstellung der Meßergebnisse und Statistik

Für eine Meßreihe mit *n* unabhängigen Experimenten wurde aus den Meßergebnissen der Mittelwert  $\tilde{x}$  und die Standardabweichung *SD* errechnet. Meßergebnisse SD. Die Darstellung der erfolgte als Ñ ± Die Streuungshomogenität wurde durch einen F-Test überprüft, nachfolgend wurden die Mittelwerte der Meßreihen mit einem zweiseitigen *t-Test* für unverbundene Stichproben nach Student analysiert. Der *p-Wert* ist das Ergebnis eines Signifikanztests (Bender und Lange, 2001). Die Irrtumswahrscheinlichkeit p (Signifikanzniveau) wurde angegeben, wobei die Mittelwerte als signifikant verschieden gelten, wenn p < 0.05 ist.

#### 3.10 Ethikvoten

Für die Gewinnung und Untersuchungen sämtlicher humaner Gewebeproben lag das schriftliche Einverständnis der betroffenen Patienten vor. Das Versuchsvorhaben erfolgte jeweils nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Heidelberg.

# 4 Ergebnisse

#### 4.1 Die Vaskularisierung von Tumor- und Kontrollpankreasgewebe

4.1.1 Immunhistologische Bestimmung des Endothel-Anteils von Tumor- und Kontrollpankreasgeweben

Eine Möglichkeit für die fehlende Tumorabstoßung könnte eine verminderte zytotoxischer T–Zellen in das Tumorgewebe Infiltration sein. Die Vaskularisierung des Tumorgewebes ist eine notwendige Vorraussetzung für die Infiltration von Zellen. Sie kann durch Quantifizierung von Endothelzellen abgeschätzt werden. Zur vergleichenden Abschätzung der Vaskularisierung wurden von zehn Kontrollpankreasgeweben und zehn Primärtumoren Kryostatschnitte angefertigt. Als Kontrollgewebe wurde tumorfreies peritumorales Gewebe der Pankreaskarzinompatienten herangezogen. Die Detektion des Endothels erfolgte durch eine immunhistologische Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen das CD31-Membranprotein (PECAM-1), welches von allen Endothelzellen konstitutiv exprimiert wird. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Quantifizierung der Färbungen erfolgte computergestüzt mit Hilfe der Analysis®-Software. Sie ermöglicht die Berechnung des prozentualen Anteils gefärbter Bereiche an der Gesamtgewebsfläche.



**Abbildung 4.1:** Vaskularisierung des Pankreasgewebes *ex vivo*. **A** typische luminale Expression von CD31 im Tumorgewebe (250x). Die Zellkerne wurden zur besseren Detektion von Gefäßstrukturen mit DAPI gefärbt. **B** Vaskularisierung in Kontroll- (n=10) und Tumorgewebe (n=10). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten CD31-Fläche pro mm<sup>2</sup> Gewebe. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Die Färbungen zeigten in Kontroll- und Tumorgeweben eine homogene Verteilung der Gefäße. Dabei zeigte sich eine, für Endothel typische, luminale Expression von CD31. Die Anzahl der Gefäße war im Tumorgewebe stark erhöht und ging mit einer höheren Endothelzelldichte als in Kontrollgeweben einher (zweifache Erhöhung; Abbildung 4.1.B).

Der prozentuale Anteil der durch CD31 gefärbten Fläche beträgt im Kontrollgewebe 0,7%+-0,2% und im Tumorgewebe 2,3+-0,7%. Die prozentualen Anteile der Endothelzellen an der Gesamtzellzahl der Kontrollgewebe waren sehr homogen, während die interindividuellen Unterschiede im Tumorgewebe größer waren.

### 4.1.2 Durchflusszytometrische Bestimmung des Endothelanteils von Tumor- und Kontrollpankreasgeweben

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden zusätzlich FACS-Färbungen auf CD31 durchgeführt, um den prozentualen Anteil der Endothelzellen an der Gesamtzellzahl festzustellen. Dazu wurden jeweils acht Gewebe verwendet. Die Tumor- und Kontrollgewebe, die jeweils vom gleichen Patienten stammen, wurden mechanisch dissoziiert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten.



**Abbildung 4.2**: Durchflusszytometrische Messung an einem mechanisch dissoziierten Tumorgewebe. Gezeigt werden die festgelegten Parameter zur durchflusszytometrischen Detektion von Endothelzellen, basierend auf Größe und Granularität, Vitalität und CD31 Expression *ex vivo*.

Diese wurden mit einem CD31-spezifischen Antikörper angefärbt. Apoptotische und nekrotische Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Nach der Färbung wurden 50000 Ereignisse am FACS-CALIBUR ausgezählt. Bei der Auswertung wurden Parameter festgesetzt, die die Endothelzellpopulation enthalten, alle zu großen oder granulären Zellen jedoch ausselektieren. Anschließend wurden alle PI-positiven Zellen (tote Zellen) ebenfalls ausselektiert.

So konnte eine vitale Zellpopulation detektiert werden, welche sich durch CD31 Expression auszeichnet und ein homogenes Muster in Größe und Granularität zeigt (Abbildung 4.2). Zur Quantifizierung wurde der Anteil dieser Population an der Gesamtzellzahl ausgerechnet. In Abbildung 4.2 wurden 50000 Zellen aufgenommen, davon sind 43% innerhalb der Größenund Granularitätsparameter und davon wiederum 93,6% lebendig. Für jeden Patienten wurde der prozentuale Anteil von Endothelzellen an der Gesamtzellzahl im Kontroll- und im Tumorgewebe festgelegt und verglichen (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3:** Prozentualer Anteil von Endothelzellen an der Gesamtzellzahl der dissoziierten Gewebe nach FACS-Auswertung *ex vivo.* **A** Prozentualer Anteil der CD31<sup>+</sup> Zellen an der Gesamtzellzahl, dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils acht Kontroll- und Tumorgeweben. **B** zeigt den direkten Vergleich des CD31<sup>+</sup>-Anteils zwischen Kontroll- und Tumorgewebe jeweils eines Patienten. Der CD31<sup>+</sup>-Anteil ist im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe bei allen Patienten signifikant erhöht. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Der direkte Vergleich des Endothelzellanteils an der Gesamtzellzahl im Kontroll- und Tumorgewebe zeigte, dass bei allen Patienten das Tumorgewebe mehr Endothelzellen aufwies, als das referierende Kontrollgewebe. Hierbei hatte keiner der Donoren im Kontrollgewebe einen Endothelzellanteil von über 2%, während 5 von 8 Donoren im Tumorgewebe einen deutlich höheren Endothelzellanteil hatten (2,7–4,7%).

# 4.1.3 Der Vergleich von histologisch- und durchflusszytometrisch bestimmtem Vaskularisierungsgrad im Pankreasgewebe

Die histologischen Färbungen zeigten im Kontrollgewebe einen Endothelzellanteil von 0,7%+-0,2%. Im Tumorgewebe ist der Anteil um das zweifache erhöht. Hier betrug der Anteil 2,3%+-0,7%. Die Durchflusszytometrie lieferte für das Kontrollgewebe einen Endothelzellanteil von 0,94%+-0,3% und für das Tumorgewebe 2,9%+-1,0%.



**Abbildung 4.4**: Methodenvergleich zur Analyse des Endothelzellanteils an der Gesamtzellzahl (FACS) bzw. an der Gesamtgewebsfläche (Histologie) in Kontrollgewebe (**A**) und in Tumorgewebe (**B**) *ex vivo*. Die Gewebezahl beträgt für die Kontrollgruppen n=8-10, für die histologischen Untersuchungen im Tumorgewebe n=10 und für die FACS-Analysen im Tumorgewebe n=8. Beide Methoden zeigten eindeutig höhere Endothelzellanteile und höhere Standardabweichungen im Tumorgewebe. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Die Daten zeigten, dass beide Methoden für den Vergleich der Vaskularisierung in Kontroll- und Tumorgewebe verwendet werden können.

Hierbei waren die Endothelzellanteile bei beiden Methoden im Tumorgewebe signifikant um das zweifache erhöht.

Nach Vergleich der beiden Methoden wird deutlich, dass im Pankreaskarzinom eine hohe Vaskularisierung vorliegt, welche sich durch gesteigerte Expression von CD31 bemerkbar macht und sowohl histologisch als auch zytometrisch nachweisbar ist.

### 4.2 Die endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Tumorund Kontrollpankreasgewebe

4.2.1 Die immunhistologische Bestimmung der endothelialen Expression von Zelladhäsionsmolekülen

Die Vaskularisierung des Tumorgewebes ist eine notwendige Voraussetzung für die verstärkte T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe. Der Ein- und Austritt von Zellen wird durch das Endothel "kontrolliert". Die molekularen Determinanten, die für die Koordination dieser Funktionen verantwortlich sind, heißen Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules, CAMs*).

Die Emigration der Tregs erfordert neben der Vaskularisierung des Gewebes, auch die Interaktion mit endothelialen CAMs.

Um den Status der CAM-Expressionen auf Tumor- und Kontrollendothel *ex vivo* zu vergleichen, wurden immunhistologische Färbungen auf unterschiedlichen Kontroll- und Tumorgeweben angefertigt. Die Färbungen sollten das Endothel durch die Expression von CD31 markieren und gleichzeitig die endotheliale CAM-Expression im Tumorgewebe, mit der des Kontrollgewebes vergleichen.

Wie schon bei der Bestimmung des Grads der Vaskularisierung der Gewebe wurde hierzu eine computergestützte Berechnungen zur Bestimmung der Fluorochrom-gefärbten Endothelzellfläche durchgeführt. Zusätzlich wurden auf dem gleichen Gewebe jeweilige CAMs mit einem farblich abweichendem Fluorochrom gefärbt (Doppelfärbung), so dass eine endotheliale Expression von CAMs durch eine Farbüberlagerung lokalisiert werden konnte. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils endothelialer CAM-Expression (Fläche der Farbüberlagerung) am Gesamtendothel im Gewebe (Fläche der Endothelfärbung) wurde der jeweilige Quotient gebildet. Danach wurden die aus Tumorgewebe erstellten Quotienten mit denen aus Kontrollgewebe verglichen (Abbildung 4.5).



Abbildung 4.5: Repräsentative immunhistologische Färbungen infiltrationsrelevanter Zelladhäsionsmoleküle auf Endothelzellen (CD31) in Kontroll- und Tumorgewebe (250x) *ex vivo*. Das Tumorgewebe zeigte im Vergleich zum Kontrollgewebe stärkere Vaskularisierung (→) und erhöhte endotheliale ICAM-1-Expression (→). Prozentuale Kolokalisierung wurde mit der Analysis<sup>®</sup>-Software anhand der Farbüberlagerung berechnet. Es wurden jeweils mindestens drei Sichtfelder von jeweils zwei Kryoschnitten eines Donorgewebes quantifiziert. Die Belichtungseinstellungen aller Aufnahmen sind identisch.

Der Status der Koexpression von CAMs ist für die adhäsiven Fähigkeiten der Endothelzellen und damit auch für die Treg-Transmigration von besonderer Bedeutung.

Die Endothelien der Kontrollgewebe zeichneten sich durch eine geringe Expressionrate der meisten CAMs aus. Die Mehrheit der gefärbten CAMs überlagerten die Endothelfläche (CD31 Färbung) nur zu ca. 12%. Hierbei streute die prozentuale Koexpression zwischen 1,4% (ß–7 Integrin) und 38,9% (CD62–P). Dieses sind die Extrema der durchschnittlichen Koexpressionen, hingegen wurden CD56 bzw. CD166 auf Endothel kaum koexprimiert (1,6%+–0,2% und 1,6%+–0,1%). Die interindividuellen Unterschiede waren gering.

Im Tumorgewebe wurden durchschnittlich ca. 30% der gefärbten Endothelien von der CAM-Färbung überlagert. Die prozentuale Koexpression streute zwischen 3,8% (CD56) und 37,6% (MAdCAM-1).



**Abbildung 4.6:** Prozentuale Überlagerung fluoreszenzmarkierter Endothelfläche (CD31<sup>+</sup>-Fläche) mit fluoreszenzmarkierten CAMs in Kontroll- (n=4) und Tumorgewebe (n=10) *ex vivo*. Die Integrine, sowie die Ig-Superfamilien-Moleküle waren im Tumorgewebe stärker induziert als die Selektine. Die Gesamtfläche gefärbten Endothels entspricht 100%. Signifikanzniveau: \*p<0,1; \*\*p<0,05.

Die höchsten Koexpressionswerte auf Endothelien zeigten ß–7 Integrin, ICAM–2 sowie MAdCAM–1 und CD44 (34,9%+–14,1\%; 36,1%+–6,2%; 37,6%+–13,0% und 35,6%+–13,4%). Andererseits zeigten VCAM–1, CD56 und CD166 eine nur schwache Überlagerung des Endothels (19,7%+–8,6%; 3,8%+–6,0%; 10,2%+–12,9\%).

Der Vergleich der endothelialen Expressionsraten des Tumorgewebes mit dem Kontrollgewebe wies eine durchschnittlich 20% höhere Überlagerung der CAM-Expressionen aus. Hierbei waren 8 von 11 CAMs signifikant differentiell induziert.

Besonders hervorzuheben ist die endotheliale Expressionssteigerung beider Integrine  $\beta$ -1– und  $\beta$ -7, wie auch der Ig–Superfamilien–Moleküle ICAM–1 und -2, MAdCAM–1 und CD44. Geringere Unterschiede zwischen Tumor– und Kontrollgewebe zeigten die Selektine. CD62–E zeigte eine nur um 12,2% gesteigerte Überlagerung auf Tumorendothel und die CD62–P Überlagerung auf Tumorendothel war sogar vermindert (–7,3% Fläche), markierte jedoch in Tumor– und Kontrollgewebe stets über 30% der Endothelfläche.

Zusammenfassend sind die Expressionsraten der CAMs auf Tumorendothel im Vergleich zum Kontrollendothel im Sinne einer inflammatorischen Reaktion erhöht (Ausnahme: CD62-P), was für eine Stimulation des Tumorendothels spricht.

# 4.2.2 Die durchflusszytometrische Bestimmung der endothelialen Expression von Zelladhäsionsmolekülen

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der endothelialen Expression von CAMs wurden die bisher verwendeten FACS-Parameter (Abbildung 4.2) genutzt. In den so erhaltenen Endothelzellpopulationen wurde jeweils die CAM-Expression quantifiziert. Dazu wurde jeweils das Kontroll- und das Tumorgewebe des gleichen Patienten mechanisch dissoziiert. Beide Gewebe wurden mittels FACS-Färbung mit anti-CD31-Antikörper und Propidiumiodid gefärbt, um später vitale Endothelzellen detektieren zu können. Zusätzlich wurde eines der jeweiligen CAMs mitgefärbt. Dies ist in einem Beispiel für ICAM-1 in Abbildung 4.7 veranschaulicht.

Für alle in die Analysen einbezogenen Donoren wurden, soweit vorhanden, Kontroll- und Tumorgewebe untersucht. Bei den Einzelanalysen wurden identische Messparameter angelegt, wodurch ein direkter Expressionsvergleich zwischen Kontroll- und Tumor(-beeinflusstem)endothel ermöglicht wurde. Die in die Messungen einbezogenen Endothelzellen entsprechen den festgelegten Voraussetzungen in Vitalität, Größe und Granularität und exprimieren konstitutiv CD31. Hierbei wurden in beiden Geweben jeweils identische Zellzahlen gemessen.

In Abbildung 4.8 werden die Expressionsstärken drei migrationsrelevanter CAMs aus Kontroll- und Tumorgewebe beispielhaft miteinander verglichen. Hierbei sind die Expressionsstärken aller dargestellten endothelialen CAMs im Tumorgewebe erhöht, wie schon am Beispiel von ICAM-1 in Abbildung 4.7 zu sehen war.



**Abbildung 4.7**: Repräsentative FACS-Analyse der endothelialen ICAM-1 Expression in Kontroll- und Tumorgewebe eines Donors *ex vivo*. Die Abbildung zeigt eine deutlich stärkere ICAM-1 Expression der Endothelzellen im Tumorgewebe (Erhöhung um 82,3%). Die dargestellten Endothelzellen entsprechen den festgelegten Voraussetzungen in Vitalität, in Größe und Granularität und exprimieren konstitutiv CD31.

Die in Abbildung 4.8 dargestellten Koexpressionen stellen repräsentative Beispiele dar. Alle gezeigten Beispiele zeigen im Kontrollgewebe eine basale, konstitutive Expression von CAMs in Endothelzellen des Pankreasgewebes. Hierbei ist die Expression von ß-1 Integrin am stärksten. ICAM-2 zeigte im Kontrollgewebe eine nur sehr schwache Expression.



**Abbildung 4.8:** Repräsentative Expressionsvergleiche endothelialer CAMs zwischen Kontrollund Tumorgewebe des jeweils gleichen Patienten *ex vivo*. Im Kontrollgewebe zeigten vor allem MAdCAM-1 und ß-1 Integrin eine basale Expression auf Endothelzellen, wobei die Expression von ß-1 Integrin etwas höher war ( $\rightarrow$ ). ICAM-2 war nur sehr schwach exprimiert ( $\rightarrow$ ). Im Tumorgewebe zeichneten sich die Endothelzellen vor allem durch gesteigerte Expression von ß-1 Integrin und ICAM-2 aus, aber auch die Expressionsrate von MAdCAM-1 wurde gesteigert.

Um eine Übersicht über die Expressionsänderungen endothelialer CAMs zu erhalten, wurden weitere Integrine, Selektine und Ig-Superfamilien-Moleküle zu Expressionsvergleichen in Kontroll- und Tumorgeweben herangezogen. Dazu wurden die gleichen CAMs wie in den immunhistologischen Untersuchungen analysiert. In Abbildung 4.9 werden die Expressionsmuster aller gemessenen CAMs in Kontroll- und Tumorgewebe dargestellt.

Die FACS-Analyse mit Endothelzellen aus dem Kontrollgewebe zeigte ein eher homogenes Expressionsmuster von endothelialen CAMs. Die prozentuale Koexpression streute zwischen 19,7% (CD166) und 58,0% (ß-1 Integrin). Die meisten der gemessenen CAMs (7 von 11) wurden von ca. 30% der Endothelzellen exprimiert. Von den restlichen zeigten drei von vier CAMs mindestens 40% Koexpression. Hierzu gehören: ß-1 Integrin, CD62-P und VCAM-1 (58,0%+-9,1%; 42,5%+-10,0%; 44,0%+-7,6%). CD166 wurde als einziges CAM von weniger als 20% der Endothelzellen exprimiert (19,7%+-7,5%).



**Abbildung 4.9:** Die endotheliale Koexpression von CAMs *ex vivo*. Mittels FACS-Analyse wurde die Expression der jeweiligen CAMs auf Endothelzellen in Kontroll- und Tumorgewebe gemessen. Die Integrine, sowie die Ig-Superfamilien-Moleküle sind im Tumorgewebe stärker induziert als die Selektine. Kontrollgewebe: n=5-7; Tumorgewebe: n=8-10. Signifikanzniveau: \*p<0,1; \*\*p<0,05.

Die Erfassung selbiger Daten im Tumorgewebe zeigte eine differentielle CAM-Expression des Tumorendothels. Die endothelialen Expressionsraten der CAMs im Tumorgewebe waren hierbei eher inhomogen und streuen zwischen 33,9% (MAdCAM-1) und 87,8% (ß-1 Integrin). Die prozentuale Koexpression mit CD31 lag durchschnittlich bei 50% (20% höher als im Kontrollgewebe). Eine hohe prozentuale Koexpression auf Tumorendothel zeigten ß-1 Integrin (87,8%+-4,0%), ICAM-1 (69,2%+-7,4%) und VCAM-1

(68,5%+-8,2%). Eine niedrigere Koexpression zeigten CD62-E (40,8%+-10,1), MAdCAM-1 (33,9%+-8,3%), CD44 und CD56 (37,3%+-7,5%; 37,1%+-8,1%). Die Mittelwerte der Expressionsraten aller gemessenen CAMs waren im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe gesteigert (6 von 11 signifikant).

4.2.3 Der Vergleich von histologisch- und durchflusszytometrischbestimmten CAM-Expressionsmustern im Pankreas

Das durch die FACS-Färbung erstellte Expressionsmuster unterschied sich vor allem in den Expressionsstärken von dem histologisch erstellten Muster. Die FACS-Resultate ergaben bei allen gemessenen CAMs höhere prozentuale Koexpressionen.

Bei der FACS-Analyse, wie auch bei der histologischen Auswertung, zeigte das Tumorgewebe höhere Koexpressionen auf dem Endothel als das korrespondierende Kontrollgewebe. Dabei wurden bei der FACS-Analyse sechs von elf gemessenen CAMs als signifikant erhöht im Tumorgewebe identifiziert, während bei den histologischen Bestimmungen neun von elf CAMs im Tumor signifikant erhöht waren. Jede der sechs in der FACS-Analyse signifikant erhöhten Koexpressionen wurden ebenfalls in der histologischen Bestimmung als signifikant erhöht identifiziert (Abbildung 4.10; grau unterlegte CAMs). Dazu gehören  $\beta$ -1- und  $\beta$ -7 Integrin, ICAM-1, ICAM-2, sowie VCAM-1 und CD166. Die Expression dieser CAMs war in beiden Methoden im Vergleich zu den anderen gemessenen CAMs am stärksten induziert. Die histologische Auswertung zeigte höhere Standardabweichungen als die FACS-Analyse innerhalb eines Individuums. Interindividuelle Unterschiede waren bei beiden Methoden vergleichbar. Zusammenfassend waren die Daten inhaltlich vergleichbar.


**Abbildung 4.10**: Der Vergleich endothelialer Koexpression von CAMs zwischen FACS-Färbung und histologischer Färbung *ex vivo*. Die prozentuale Koexpression stimmte tendenziell in beiden Methoden überein. Die FACS-Analyse zeigte höhere Expressionsraten auf Endothelien. Die Ergebnisse beider Methoden verdeutlichen die mikromilieuabhängige CAM-Expression auf Endothelien. Die Integrine, sowie die Ig-Superfamilien-Moleküle waren im Tumorgewebe stärker induziert als die Selektine. Kontrollgewebe: n=5-7; Tumorgewebe n=8-10. Grau unterlegt sind CAMs, die durch beide Methoden im Tumorgewebe als siknifikant erhöht verifiziert wurden. Signifikanzniveau : \*p<0,1; \*\*p<0,05.

# 4.3 Der Vergleich der endothelialen CAM-Expressionsmuster *ex vivo* und *in vitro*

Um spätere *in vitro* Versuche durchführen zu können, sollte untersucht werden, ob das *ex vivo* Expressionsmuster der CAMs *in vitro* qualitativ erhalten bleibt. So mussten die CAM-Expressionsmuster der Endothelzellen ebenfalls für die *in vitro* Situation festgestellt werden. Dabei wurden die Endothelzellen unter Standardkultivierungsbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 48h kultiviert. So konnte sichergestellt werden, dass funktionelle Eigenschaften bestimmter CAMs bei der Transmigration *in vitro* auch *ex vivo* anzunehmen sind.

*In vitro* zeigten Endothelzellen aus dem Tumorgewebe eine höhere Expressionsrate für CAMs als Endothelzellen aus dem Kontrollgewebe (Abbildung 4.11).

Somit ähneln die CAM-Expressionen der *ex vivo* Situation, denn auch *ex vivo* konnte das Tumorendothel durch tendenziell höhere CAM-Expressionsraten charakterisiert werden, die Unterschiede waren hierbei aber gering.

Die CAM-Expressionsraten im Tumorendothel waren im Vergleich zum Kontrollendothel *in vitro* jedoch schwächer erhöht als *ex vivo*. Dies könnte durch die fehlende Versorgung mit tumorsezernierten Molekülen bedingt worden sein.



**Abbildung 4.11:** Differentielle Expression von CAMs auf Tumorendothelzellen nach Kultivierung mit allogenem Pankreastumor-Lysat *in vitro*. Alle Zellen wurden nach Isolation 48h kultiviert. **Grün:** Kontrollendothel + ECBM; **Schwarz:** Tumorendothel + ECBM; **Rot:** Tumorendothel + ECBM + autologes Tumor-Lysat (50µg/ml).

Um das Tumormilieu zu imitieren, wurden Tumorendothelzellen einerseits mit Endothelzell Basal Medium (*endothelial cell basal medium*, ECBM) kultiviert und andererseits auch mit ECBM, welches autologes Tumor-Lysat (50µg/ml) aus Pankreasgewebe enthielt. Dieses Lysat sollte das Tumormikromilieu imitieren, da der direkte Einfluss des Tumors auf die Endothelzellen bei der Kultivierung *in vitro* fehlt. Die Ergebnisse zeigten höhere Expressionsunterschiede von Tumorendothel zu Kontrollendothel, wenn das Tumorendothel zusätzlich *in vitro* mit Tumor-Lysat kultiviert wurde (Abbildung 4.12).

Die genauen Expressionsabweichungen der behandelten und nichtbehandelten Tumorendothelzellen *in vitro* von den Expressionen *ex vivo* sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Sie verdeutlichen eine Annäherung der CAM-Expressionen der Tumorendothelzellen nach Behandlung mit autologem Tumor-Lysat an die *ex vivo* Situation. In neun von elf Fällen (82%) zeigten die behandelten Tumorendothelzellen geringere Abweichung von der physiologischen Situation. Die beiden Ausnahmen sind ß-1 und ß-7 Integrine.



**Abbildung 4.12:** Endotheliale Koexpression von CAMs *in vitro*. Endothelzellen wurden aus humanem Tumor- und Kontrollpankreasgewebe isoliert und 48h in ECB Medium kultiviert. Zusätzlich wurden Endothelzellen aus Tumorpankreasgewebe isoliert und in ECBM +  $50\mu$ g/ml autologem Tumor-Lysat kultiviert, um ein Tumormikromilieu zu imitieren. Wurde ein Tumormikromilieu imitiert, steigte die Expressionsrate der meisten CAMs auf den Tumorendothelzellen. Signifikanzniveau : \*p<0,1; \*\*p<0,05. n=2-3.

Da in den *in vitro* Transmigrations-Versuchen eine möglichst genaue Annäherung an die physiologischen Bedingungen stattfinden sollte, wurde das Tumorendothel mit autologem Tumor-Lysat vorbehandelt. Die Behandlung sollte gewährleisten, dass die endotheliale CAM-Expression nahezu identisch zum *ex vivo* Expressionsmuster auf den Endothelzellen ist. Die Behandlung wurde während den Versuchsansätzen ausgesetzt und konnte somit nicht direkt die Transmigration oder folgende Versuchsansätze beeinflussen.

**Tabelle 4.1** In vitro gemessene prozentuale Koexpressionen von CAMs im Vergleich zumTumorendothel ex vivo. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung der Lysat-behandeltenund nicht-behandelten Tumorendothelzellen in vitro von der Tumorendothelzell-Expressionex vivo. Die geringere prozentuale Abweichung der behandelten Tumorendothelzellenverdeutlicht eine Annäherung an ex vivo Bedingungen. n=2-3.Abweichung von der ex vivo Situation.

	Integrine		Selektine		lg-Superfamilie						
	ß-1 Integrin	ß7 Integrin	CD62-E	CD62-P	ICAN-1	ICAW2	MadCAW-1	VCAM-1	CD44	CD56	CD166
in vitro Tumorendothel	10,2	-7,2	) -6,1	-24,4	-24,6	-22,1	-9	-15,4	-9,3	-18	-15,6
in vitro Tumorendothel + Tumorlysat	12,2	12	-3,7	-12,9	8	-10,4	-37	-9	-2,8	-7,9	-0,8

Zusammenfassend zeichneten sich die tumorbeeinflussten Endothelzellen im Vergleich zu Endothelzellen aus Kontrollgeweben *in vitro* durch erhöhte CAM-Expression aus. Diese Unterschiede waren oft nur gering und konnten durch Behandlung mit autologem Tumor-Lysat verstärkt werden. So bleiben die Expressionsunterschiede, die *ex vivo* festgestellt wurden, *in vitro* erhalten, um weiterhin morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollendothel untersuchen zu können.

### 4.4 Die Morphologie von Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollpankreasgewebe

4.4.1 Die differentielle Morphologie von Tumor- und Kontrollendothelzellen nach Kurzzeitkultivierung (2d)

Nachdem durch die Analyse der endothelialen CAM-Expressionsmuster eine erhöhte Expression auf Tumorendothelien gezeigt werden konnte, stellte sich Frage, ob dies ein Hinweis für eine Aktivitätssteigerung die der Endothelzellen darstellt. Aus diesem Grund wurde die Bildung sogenannter "Stressfasern" (Aktinfilamente) im Zytoskelett von Endothelzellen untersucht, die aus Tumor- und Kontrollpankreasgewebe isoliert wurden. Sofort nach Isolierung der Primär-Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollpankreas (nach 4h), wurden die Zellen auf Glasobjektträgern unter identischen Standard-Bedingungen für 2 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und auf CD31 gefärbt. Zusätzlich wurde mit fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin inkubiert, welches der Hauptgiftstoff des grünen Knollenblätterpilzes ist und als hoch toxisches zyklisches Polypeptid an intrazelluläres Aktin bindet. Somit war es möglich, das Zytoskelett der Zellen sichtbar zu machen und zu vergleichen. Zudem wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt (Abbildung 4.13). Die Färbungen wurden an isolierten Zellen von drei Kontroll- und drei die Tumorgeweben durchgeführt. Dabei wurden intrazellulären Aktinfilamente von jeweils 20 Zellen ausgezählt. Die Abbildung 4.11 zeigt den Vergleich der Zytoskelettfärbung zwischen Tumorendothelzellen und Kontrollendothelzellen.

Durch die Färbung mit Phalloidin zeigten sich jedoch starke Unterschiede in der Anzahl zytoplasmatischer Aktinfilamente. Im nicht-aktivierten Zustand können kultivierte Endothelzellen durch einen typischen peripheren, unterhalb der Zellmembran liegenden, Aktinring charakterisiert werden. Im aktivierten Zustand ändert sich die Signaltransduktion und damit auch die Morphologie der Zelle, die sich an die Aktivierungssituation anpasst. Dabei bilden sich sogenannte intrazytoplasmatische Stressfasern (Aktinfilamente). In Abbildung 4.13.B ist die Ausbildung der Stressfasern in kultivierten Endothelzellen aus Pankreastumorgewebe dargestellt. Diese Stressfasern wurden in aus Kontrollgewebe stammenden Endothelzellen kaum ausgebildet (Abbildung 4.13.A). Die Anzahl der Stressfasern war in Tumorendothelzellen ca. 7-fach höher als in Kontrollendothelien (Abbildung 4.13.C).



Abbildung 4.13: Endothelzellen aus Tumorpankreasgewebe zeigen differenzielle Morphologie. **A** und **B** zeigen Fluoreszenzfärbungen mit anti-CD31 mAB und Phalloidin (630x) als Zytoskelettmarker ( $\rightarrow$ ). **A** Kontrollendothel; **B** Tumorendothel; Das Tumorendothel zeigte eine deutliche Erhöhung der Anzahl von transzytoplasmatischen Aktinfilamenten (**C**), ein Anzeichen eines geänderten Aktivierungsstatus. Signifikanzniveau : \*\*p<0,05. n=3. Diese Feststellung impliziert zusammen mit den CAM-Expressionsdaten einen geänderten Aktivierungsstatus der Endothelzellen im Tumorgewebe. Dieser tumor-induzierte Aktivierungsstatus könnte Auswirkungen auf die Motilität und die Interaktion mit T-Zellen haben, was wiederum Effekte auf Ebene der transendothelialen Migration dieser Zellen zeigen könnte.

## 4.4.2 Die differentielle Morphologie von Tumor- und Kontrollendothelzellen nach Langzeitkultivierung (14d)

Frisch isolierte Endothelzellen bilden *in vitro* eine geschlossene "Pflastersteinstruktur", in der die langgestreckten Zellen die Fläche dicht bedecken. In Abbildung 4.14 ist die typische Pflastersteinstruktur der Kontrollendothelzellen aus nicht-Tumorgewebe von Patienten dargestellt.

Die mikrovaskulären Endothelzellen zeichneten sich dabei nach drei Tagen Kultivierung (Passage 1; P1) durch eine homogene Morphologie aus, denn ca. 70% der Zellen der Monolayer von Tumor- und Kontrollendothel zeigten eine typische bipolare Struktur. Nach einer Woche (P2) unter Kultivierungsbedingungen zeichneten sich erste Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollendothel unter Kultivierungsbedingungen ab. Dabei schienen die Tumorendothelzellen stark zu proliferieren, so dass einige der Zellen ihre adhärenten Eigenschaften verloren und in Apoptose traten. Sie waren im Zellkulturüberstand auffindbar. Zusätzlich zeigten wesentlich weniger Tumorendothelzellen die typische bipolare Morphologie (nur noch 30–40%), sondern einen abgerundeten polygonalen Phänotyp.

Dies war bei den Kontrollendothelzellen nicht festzustellen. Sie behielten ihre typische Morphologie und schienen auch etwas langsamer zu proliferieren. Insgesamt verloren wesentlich weniger Kontrollendothelzellen ihre adhäsiven Eigenschaften, wie anhand der geringen Zellzahlen im Medium festzustellen war. Die gleichen Effekte zeigten sich auch nach zwei Wochen in Kultivierungsbedingungen (P3). Insgesamt zeichneten sich die Tumorendothelzellen durch eine geänderte Morphologie (Abbildung 4.14), als auch durch verstärkte Modulation des Zytoskeletts aus (Abbildung 4.13). Dies wirft die Frage auf, ob diese Anpassungen an das Tumormikromilieu auf die Motilität die Interaktionsfähigkeit sich auch und der Tumorendothelzellen auswirkt. Um diese Fragen zu beantworten, wurden Zeitrafferaufnahmen durchgeführt, die die direktionale Lokomotion von Tumorendothelzellen Kontrollendothelzellen mit vergleichen sollten.

Zusätzlich wurden Angiogenese-Tests durchgeführt, um Motilität und Interaktionsfähigkeit zwischen Tumor- und Kontrollendothelzellen zu vergleichen.



**Abbildung 4.14:** Mikrovaskuläre Endothelzellen aus humanem Pankreasgewebe in ECBM kultiviert (100x). Die Zellen wurden 4–8h nach der Operation aus dem Primärgewebe der Donoren isoliert und an Tag 3, 7 und 14 nach Kulturbeginn mikroskopisch untersucht. Die Tumor- und Kontrollendothelzellen unterscheiden sich nach 3 Tagen kaum voneinander. Nach 7 Tagen zeichnen sich immer mehr Tumorendothelzellen durch eine polygonale- ( $\rightarrow$ ) und nicht bipolare Morphologie aus ( $\rightarrow$ ), wie es für mikrovaskuläre Endothelzellen typisch ist. Dieser Effekt wird nach 14 Tagen noch deutlicher. Die Tumorendothelzellen schienen schneller zu proliferieren, was sich in einer erhöhten Rate von nicht-adhärenten apoptotischen Zellen im Überstand feststellen lies ( $\rightarrow$ ).

4.4.3 Die morphologisch-lokomotorischen Eigenschaften von Tumor- und Kontrollendothelzellen

Die Frage, ob die festgestellten morphologischen Anpassungen der Tumorendothelzellen an das Tumormilieu auch Auswirkung auf die Motilität der Zellen hat, wurde mittels Zeitrafferaufnahmen beantwortet. Hierzu wurden Endothelzellen von je drei Tumor- und Kontrollpankreasgeweben 4-8h nach der Operation der Donoren isoliert. Diese wurden 7 Tage kultiviert und in einem subkonfluenten Zustand mikroskopisch untersucht.

#### Kontrollendothel



**Abbildung 4.15**: Repräsentative Zeitrafferaufnahmen von Tumor- und Kontrollendothelzellen unter Kultivierungsbedingungen zeigen eine Motilitätssteigerung von Tumorendothelzellen (100x). Die Zellen wurden 4–8h nach der Operation der Donoren aus dem Primärgewebe isoliert und 7d kultiviert (P2). Dabei wurde dem Medium der Tumorendothelzellen zusätzlich autologes Tumor-Lysat (50µg/ml) zugesetzt. Als Kontrollen wurde PBMZ- und Tumor-Lysat mit Kontrollendothelzellen kultiviert. Im subkonfluenten Zustand wurden gleiche Zellzahlen für die Aufnahmen eingesetzt. In jedem Bildausschnitt wurde die Bewegung der farblich markierten Zellen anhand der Quadranten verfolgt. Nach der Aufnahme wurde die Geschwindigkeit und die Richtungs-Persitenz der Zellen kalkuliert. Die Abbildung 4.15 zeigt eine repräsentative Zeitrafferaufnahme von Tumorund Kontrollendothelzellen in Kultur. Hierbei wurden jeweils gleiche Zellzahlen verwendet. Um das Tumormikromilieu nachzuahmen, wurden die Tumorendothelzellen in ECBM + autologem Tumor-Lysat (50µg/ml) kultiviert, während die Kontrollendothelzellen nur in ECBM kultiviert wurden. Als Kontrollen wurden Kontrollendothelzellen in PBMZ- und Tumor-Lysat kultiviert (je 50µg/ml). Ebenso wurden die Tumorendothelzellen mit PBMZ-Lysat kultiviert um auszuschliessen, dass Gewebe-Lysat im Allgemeinen eine Auswirkung auf die Untersuchungen hat.

Pro Donor wurde eine Zeitrafferaufnahme durchgeführt. Die Aufnahmen wurden ausgewertet, indem zehn Zellen aus verschiedenen Arealen pro Bildausschnitt ausgewählt wurden. Die Bewegungen dieser Zellen wurden über den Zeitraum der Aufnahme analysiert, indem die zurückgelegte Wegstrecke, wie auch die Richtung der Bewegung festgehalten wurde. Die zurückgelegte Strecke und die Geschwindigkeit der Bewegungen konnte mit Hilfe der AxioVison LE Software<sup>®</sup> computerunterstützt berechnet werden. Die Richtung der Bewegung wurde festgestellt, indem das Sichtfeld in Quadranten eingeteilt wurde, deren Schnittpunkt am Anfang der Aufnahme über der untersuchten Zelle liegt (Abbildung 4.15; 0 min.). Die Bewegungen der Zelle führt sie in unterschiedliche Quadranten. Je gerichteter die Bewegung der Zelle, desto weniger Quadranten wurden durchlaufen und desto länger bewegte sich eine Zelle innerhalb eines Quadranten. Die Zeit der gerichteten Bewegung innerhalb eines Quadranten wurde als Maß für die gezielte Motilität festgehalten (*persitance time*; pt). Nach Auswertung der Zellbewegungen in Abbildung 4.15 fällt auf, dass die Zellen des Kontrollgewebes (orange und grün markiert) sich nur innerhalb eines oder innerhalb von zwei Quadranten bewegten. Hingegen bewegten die Tumorendothelzellen (blau und schwarz markiert) sich beide innerhalb von drei Quadranten. Sie zeigten also innerhalb der selben Zeitspanne eine höhere Motilität als die Kontrollendothelzellen. Die Bewegung ist im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen als eher "ungerichtet" einzustufen. Ergebnisse dieser Abbildung Die Untersuchungen sind in 4.16 zusammengefasst.

Die Untersuchungen zeigten dabei eine höhere Motilität der Tumorendothelzellen, die mit Tumor-Lysat kultiviert wurden (0,41 µm/min.), im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen (0,12 µm/min.). Die Kontrollendothelzellen, welche mit Tumor-Lysat behandelt wurden, zeigten eine leichte Steigerung der Bewegungsgeschwindigkeit (0,23µm/min.),

#### ERGEBNISSE

welche aber nicht die Geschwindigkeit der Tumorendothelzellen, die mit Tumor-Lysat behandelt wurden, erreichte (Abbildung 4.16). Die Bewegung der Kontrollendothelzellen, welche mit Tumor-Lysat kultiviert wurden Vergleich (pt=490 min.). blieb im zu den unbehandelten Kontrollendothelzellen (pt=480 min.) sehr gerichtet. Die Kultivierung der Kontrollendothelzellen mit PBMZ-Lysat zeigte keine Effekte. Die Bewegungsgeschwindigkeit, wie auch die Richtung der Bewegungen war nahezu identisch mit den unbehandelten Kontrollendothelzellen. Hingegen zeigten Tumorendothelzellen, welche statt mit Tumor-Lysat mit PBMZ-Lysat kultiviert wurden, einen leichten Rückgang der Bewegungsgeschwindigkeit (von 0,41µm/min. auf 0,35µm/min.). Hierbei blieb die Dauer der Bewegungsrichtung unverändert bei 280 min.



**Abbildung 4.16**: Die lokomotorischen Eigenschaften von Tumor- und Kontrollendothelzellen *in vitro* unterscheiden sich. Die Tumorendothelzellen wurden zusätzlich mit autologem Tumor-Lysat kultiviert (50µg/ml). Pro Donor wurden zehn Zellen aus verschiedenen Arealen der Zeitrafferaufnahme ausgewertet; n=3. Die Linien geben den polynomischen Ausgleich der jeweils zehn Messwerte pro Donor an. Deutlich zu erkennen ist die höhere Motilität der Tumorendothelzellen *in vitro*. Die Bewegung der Tumorendothelzellen war im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen jedoch ungerichtet. Die Kontrollendothelzellen, welche mit Tumor-Lysat kultiviert wurden, zeigten erhöhte Motilität, erreichten jedoch nicht die Motilitätsniveaus von Tumorendothelzellen, die mit Tumor-Lysat inkubiert wurden. Die Dauer der gerichteten Bewegung bleibt hingegen unverändert. Die Abbildung 4.17 fasst die signifikanten Unterschiede zwischen den lokomotorischen Eigenschaften der Tumor- und Kontrollendothelzellen zusammen. Kennzeichnend ist, dass das Mikromilieu des Tumors die beiden Tumorendothelzellen zur Motilitätssteigerung induzierte. Die erhöhte Motilität ging mit einer ungerichteten Bewegung der Tumorendothelzellen *in vitro* einher.



**Abbildung 4.17**: Tumor- und Kontrollendothelzellen unterscheiden sich in (**A**) der Dauer der gerichteten Bewegung (*persistance time*; pt) und (**B**) der Bewegungsgeschwindigkeit unter Kultivierungsbedingungen (n=3). Die Endothelzellen wurden aus Tumor- und Kontrollgewebe isoliert und zwei Wochen in Kulturbedingungen gehalten (P3). Um das Mikromilieu des Tumors unter Kultivierungsbedingungen nachzuahmen, wurden die Tumorendothelzellen mit autologem Tumor-Lysat (50µg/ml) kultiviert. Als Kontrolle wurde den Kontrollendothelzellen PBMZ-Lysat (50µg/ml) beigefügt. Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

Die Motilitätssteigerung könnte dafür verantwortlich sein. dass Tumorendothelzellen eine höhere Wahrscheinlichkeit zur gegenseitigen Interaktion besitzen. Der Grad der Interaktion ist für die Angiogenese besonders wichtig. Es ist bekannt, dass das Tumormikromilieu durch sezernierte Faktoren für eine Neoangiogenese verantwortlich ist. Diese ist für die Versorgung des schnell wachsenden Tumorgewebes besonders wichtig. So stellte sich die Frage, ob die beobachteten Ergebnisse sich auch auf die Angiogenesefähigkeit der Endothelzellen auswirken. Deshalb wurden Kontrollendothelzellen Angiogenese-Versuche mit Tumorund durchgeführt.

In Abbildung 4.18 sind die Ergebnisse der Angiogenese-Versuche dargestellt. Dabei wurden Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollgewebe isoliert und für sieben Tage unter Normalbedingungen kultiviert. Danach wurden 20000 Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollgewebe auf Matrigel ausgesät. Anschließend wurden die Zellen zwei Tage in ECB-Medium, das mit PBMZ-Lysat zur Kontrolle, oder mit Tumor-Lysat (je 50µg/ml) zur Tumorimitation versetzt wurde, kultiviert. Nach zwei Tagen hatte ein Teil der Zellen angefangen, tubuläre Fortsätze auszubilden, die es erlauben den Grad der Angiogenese-Induktion in vitro zu messen (Abbildung 4.18.B). Die wurden an jeweils drei Tumorund Kontrolldonoren Messungen durchgeführt und jeweils dreimal unabhängig voneinander als Tripletten ausgewertet. Abbildung 4.18.A zeigt, dass das Kontrollendothel unter Einfluss von PBMZ-Lysat nur sehr wenige tubuläre Fortsätze bildete. Die Ausbildung der Fortsätze von Kontrollendothel wurde unter Einfluss des Tumor-Lysats signifikant gesteigert, was für das Vorhandensein von proangiogenen Molekülen im Tumor-Lysat spricht. Im Vergleich zum Kontrollendothel bildete das Tumorendothel unter Einfluss von PBMZ-Lysat sehr viel mehr tubuläre Fortsätze aus, was für eine höhere Grundtendenz zur Angiogenese spricht.



**Abbildung 4.18**: Die Fähigkeiten von Tumor- und Kontrollendothelzellen zur Angiogenese-Induktion *in vitro* (100x). **A** Es wurden je 20000 Endothelzellen auf Matrigel ausgesät und mit PBMZ- oder Tumor-Lysat behandelt (50µg/ml; 2d). **B** Nach zwei Tagen wurde die Anzahl der ausgebildeten tubulären Fortsätze pro mm<sup>2</sup> kalkuliert. Dabei wurden drei Tumor- und drei Kontrolldonoren herangezogen. Zu jedem Donor wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Tumorendothelzellen zeigten ein deutlich erhöhtes Potenzial zur Neoangiogenese. Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

Diese höhere Tendenz zur Angiogenese kann sich mit den pro-angiogenen Effekten des Tumor-Lysats addieren, so dass die Inkubation von Tumorendothelzellen mit Tumor-Lysat zu der Ausbildung sehr vieler Fortsätze führte. Diese bildeten sehr viele Knotenpunkte aus, sowie größere Flächen zur Zell-Zellinteraktion.

Zusammenfassend sprechen die morphologischen Untersuchungen, die Zeitrafferaufnahmen, die Adhäsionsmolekül-Expressionen, wie auch die Angiogenese-Untersuchungen für ein differentielles Verhalten der Tumor-Die und Kontrollendothelzellen. Unterschiede zwischen beiden Endothelzellpopulationen wurden schon *ex vivo* nach Isolierung aus den deutlich, jeweiligen Geweben konnten aber auch unter Kultivierungsbedingungen in vitro festgestellt werden. Da in vitro die vom Tumor sezernierten Moleküle fehlen, können die Endothelzellen in vitro ersatzweise mit autologem Tumor-Lysat kultiviert werden, was der Imitation des Tumormikromilieus dient. Da sich Tumor- und Kontrollendothelzellen in allen untersuchten Parametern unterscheiden, ist anzunehmen, dass die morhologisch-lokomotorischen Unterschiede, wie auch die differentielle CAM-Expression und Angiogeneserate, zu funktionellen Unterschieden führt. Diese werden möglicherweise durch das Tumormilieu bestimmt. Die endothelialen Änderungen der Expressionsraten oder der Morphologie in Bereichen des lokalen Tumors könnte durch geänderte mit T-Zellen zu starken Unterschieden des Interaktionsmöglichkeiten Migrationsverhaltens dieser Zellen führen, welches im Folgenden untersucht werden sollte.

#### 4.5 Die CD3<sup>+</sup> T–Zell Infiltration in Tumor– und Kontrollpankreasgewebe

Die Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen durch T-Zellen erfordert die Infiltration in das Tumorgewebe. Da in vorausgegangenen Versuchen festgestellt wurde, dass tumorreaktive T-Zellen im Blut und vor allem im Knochenmark von Pankreaskarzinompatienten existieren, sollte nun festgestellt werden, ob T-Zellen überhaupt in das Pankreasgewebe einwandern. Für die Einwanderung der T-Zellen in umliegendes Gewebe ist eine Adhäsionsmolekül-vermittelte Interaktion mit den Endothelzellen nötig. Hierbei sorgen hohe CAM-Expressionsraten auf Endothelzellen und T-Zellen für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Interaktion und zur Transmigration durch das Endothel. Um festzustellen ob es Unterschiede im T-Zell Vorkommen in Tumor- und Kontrollgewebe gibt, wurden Pankreasgewebe von jeweils 15 unterschiedlichen Tumor- und Kontrolldonoren im Kryostat geschnitten. Die Einzelschnitte wurden dann auf CD3, ein typisches T-Zell Membranprotein, angefärbt. Repräsentative Färbungen werden in Abbildung 4.19 gezeigt.

Die Zellzahl wurde in Relation zur Gewebefläche ausgewertet. Dabei wurde die Gewebefläche mit Hilfe der Analysis Software<sup>®</sup> computerunterstützt bestimmt. In Abbildung 4.19.C ist der direkte Vergleich der T-Zellzahl von Tumor- und Kontrollgewebe dargestellt. Dabei betrug die durschnittliche Anzahl von T-Zellen im Kontrollgewebe  $84+-10/mm^2$ , während sie im Tumorgewebe wesentlich höher war ( $120+-21/mm^2$ ). Diese höhere T-Zellzahl im Tumorgewebe entspricht einer Steigerung von 42+-13% im Vergleich zum Kontrollgewebe.



**Abbildung 4.19**: Die T-Zellinfiltration in Pankreasgewebe. Immunhistologische Färbungen gegen CD3 Antigen im Tumor- (**B**) und Kontrollpankreasgewebe (**A**). Hierzu wurden Kryostatschnitte von jeweils 15 Donoren angefertigt. Die Kernfärbungen mit DAPI ermöglichen ein einfacheres Quantifizieren der Zellzahlen. Zusätzlich wurde die Fläche der Gewebeausschnitte mit Hilfe der Analysis Software<sup>®</sup> berechnet. Dies ermöglicht die Angabe von Zellzahl pro mm<sup>2</sup> Gewebefläche (**C**). Die prozentuale Verteilung der T-Zellen im Vergleich zum Kontrollgewebe wird in (**D**) gezeigt. Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

Bei den immunhistologischen Auswertungen der Einzelschnitte fiel jedoch nicht nur eine höhere Anzahl von T-Zellen im Tumorgewebe auf, sondern auch eine Anhäufung der T-Zellen in Verbänden von 10-30 Zellen (Abbildung 4.19.B).

Diese Anhäufung könnte durch ein tumorspezifisches Zytokinmilieu hervorgerufen werden. Deshalb stellt sich die Frage, welche Mechanismen der stärkeren Infiltration von T-Zellen ins Tumorgewebe unterliegen. Wie schon festgestellt wurde, war das CAM-Expressionsmuster der Endothelzellen im Tumorgewebe gegenüber dem Kontrollgewebe stark erhöht (Abbildung 4.10). Diese Expressionserhöhung kann durch verstärkte Interaktion mit Blutzellen entstehen. Deshalb sollte in folgenden FACS-Färbungen geklärt werden, ob die erhöhten T-Zellzahlen im Tumorgewebe mit erhöhten CAM-Expressionen der T-Zellen korreliert. Dies würde zur Vermutung führen, dass verbesserte Interaktionsmöglichkeiten von Endothelzellen und T-Zellen über CAMs zur verstärkten Infiltration in das Tumorgewebe führen.

#### 4.6 Das CAM-Expressionsmuster der CD3+ T-Zellen

Um die Expression der CAMs auf T-Zellen im peripheren Blut zu untersuchen, wurden die mononukleären Zellen aus den Blutproben der Donoren mit Hilfe eines Dichtegradienten isoliert. Um die Expression der CAMs auf T-Zellen im Gewebe zu untersuchen, wurden Tumor- und Kontrollpankreasgewebe frisch aus der jeweiligen OP entnommen, in Transportmedium überführt und 2-4h später mechanisch dissoziiert. Dabei diente die Dissoziation der Gewinnung von Einzelzellen aus dem Gewebe. Diese Einzelzellen wurden dann einer Fluoreszenz-Doppelfärbung unterzogen. Dazu wurden die isolierten Zellen mit Antikörpern gegen CD3 Antigen und gegen ein jeweiliges CAM Antigen inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software. Hierbei wurden die detektierten Zellen aus der Zellsuspension zunächst durch typische Größenund Granularitätsparameter als Lymphozyten Anschließend wurden einer charakterisiert. tote Zellen mit Hilfe Propidiumiodidfärbung detektiert und aus den zukünftigen Auswertungen ausgeschlossen. Die Lymphozyten wurden dann auf CD3 Expression ausgewertet. Die CD3<sup>+</sup> Zellen wurden wiederum auf die Expression von diversen CAMs überprüft, um eine prozentuale Aussage über die Expressionsstärke der CAMs auf CD3<sup>+</sup> T–Zellen treffen zu können. Die verwendeten Größen- und Granularitätsparameter sind in Abbildung 4.20 dargestellt.



**Abbildung 4.20:** Beispiel für die angewendeten Größen- und Granularitätsparameter zur Charakterisierung der CD3<sup>+</sup> T-Zellpopulation im peripheren Blut und Gewebe der Donoren (FACS-Messung). Zunächst wurde die typische Lymphozytenpopulation zur Auswertung herangezogen (links). Die ausgewählten Zellen wurden dann auf die CD3 Expression überprüft (mittlere Abbildung). CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden abschließend auf der CAM-Expression basierend quantifiziert (hier CD24; rechts).

Nachdem die T-Zellen entsprechend den vorgegebenen Parametern analysiert wurden, konnten CAM-exprimierende CD3<sup>+</sup> T-Zellen von nichtexprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen unterschieden werden. Der prozentuale Anteil exprimierender CD3<sup>+</sup> T-Zellen konnte daraufolgend zwischen verschiedenen Donoren und verschiedenen Kompartimenten (peripheres Blut und Gewebe) verglichen werden.

4.6.1 Das CAM-Expressionsmuster von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut

Hierbei war es zunächst wichtig, ein basales Expressionsmuster von CD3<sup>+</sup> T– Zellen im peripheren Blut von Tumor– und Kontrolldonoren feststellen zu können, welches im Anschluss mit dem Expressionsmuster im Tumor– und Kontrollgewebe verglichen werden konnte. Hierbei sollten differentielle Regulationen der CAM–Expressionsstärke zu erkennen sein. In Abbildung 4.21 ist der prozentuale Vergleich der CAM–Expression von CD3<sup>+</sup> T–Zellen im peripheren Blut von Tumor– und Kontrolldonoren dargestellt. Hierbei wurden pro CAM 4–10 Donoren gemessen und ausgewertet. Zwischen den Tumor– und Kontrolldonoren zeigte sich im peripheren Blut keine differenzielle CAM–Expression auf CD3<sup>+</sup> T–Zellen.



**Abbildung 4.21**: Das Expressionsmuster von CD3<sup>+</sup> T–Zellen im peripheren Blut von Tumorund Kontrolldonoren (n=4–10). Der Vergleich zwischen Tumor– und Kontrolldonoren zeigte für die Moleküle ß–1 Integrin, PSGL, LFA–1 sowie CD6 besonders hohe Expressionsraten in beiden Gruppen (>80% der CD3<sup>+</sup> T–Zellen). Das ß–7 Integrin sowie CD56 und CD166 werden ebenfalls in beiden Donorgruppen gering exprimiert (<25% der CD3<sup>+</sup> T–Zellen).

Die Moleküle ß-1 Integrin, PSGL, LFA-1 sowie CD6 zeigten besonders hohe Expressionsraten in beiden Gruppen (>80% der CD3<sup>+</sup> T-Zellen). Das ß-7 Integrin sowie CD56 und CD166 wurden ebenfalls unabhängig von der Donorgruppe gering exprimiert (<25% der CD3<sup>+</sup> T-Zellen). Die Moleküle CD24 und CD62L zeigten mittlere Expressionshäufigkeiten auf den CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Die Messungen der Expressionshäufigkeiten der CAMs auf T-Zellen im peripheren Blut gaben Aufschluss darüber, wie groß der Anteil der T-Zellen war, der ein transmigrations-relevantes Protein exprimierte. Dieser Anteil der Zellen kann im Blut sehr gering sein (weniger als 10% der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Blut exprimieren ß-7 Integrin; Abbildung 4.21). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass genau dieser Teil der CD3<sup>+</sup> T-Zellen durch die Expression befähigt wird, durch das Endothel zu transmigrieren und das Gewebe zu infiltrieren. Um die Änderung der T-Zell-Expressionsmuster beim Eintritt in das Tumor- oder Kontrollgewebe zu analysieren, wurden folgende Versuche durchgeführt.

4.6.2 Das CAM-Expressionsmuster von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe

Um feststellen zu können, ob die Infiltration der CD3+ T-Zellen in das Pankreasgewebe zu Expressionsänderungen der CAMs auf CD3+ T-Zellen führt, sollte als nächstes ein Expressionsmuster für das Tumor- und Kontrollgewebe erstellt werden. Nachdem sowohl Tumorals auch Kontrollgewebe dissoziert waren, wurden die etablierten Doppelfärbungen, die an den Blut T-Zellen durchgeführt wurden, an den Gewebezellen wiederholt. Hierbei wurden jeweils 4-9 Tumor- und Kontrollgewebe eingesetzt. Der prozentuale Anteil der CAM-exprimierenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde, wie vorher beschrieben, bestimmt. In Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse der FACS-Färbungen zusammengefasst. Sie zeigten, dass CD6, PSGL und B-1 Integrin stark exprimiert werden (>60% der gewebsresidenten CD3<sup>+</sup> T-Zellen). Hingegen ist das Vorkommen von CD62L, CD56 sowie CD166 auf gewebsresidenten CD3<sup>+</sup> T–Zellen eher selten (<35% der T–Zellen). 7 von 9 untersuchten Protein-Expressionen unterschieden sich im Vergleich zwischen Tumor- und Kontrollgewebe nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der ß-7 Integrin Expression und der LFA-1 Expression auf CD3<sup>+</sup> T–Zellen aus Tumor– und Kontrollgewebe. Hierbei war die B-7 Integrin Expression auf T-Zellen im Tumorgewebe signifikant erniedrigt, während die Expression von LFA-1 auf T-Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe signifikant erhöht war.



**Abbildung 4.22**: Das Expressionsmuster von CD3<sup>+</sup> T–Zellen im Tumor– und Kontrollgewebe (n=4–9). Der Vergleich zwischen Tumor– und Kontrolldonoren zeigte für die Moleküle CD6, ß–1 Integrin und PSGL besonders hohe Expressionsraten in beiden Gruppen (>60% der CD3<sup>+</sup> T–Zellen). Das CD62L, sowie CD56 und CD166 wurden in beiden Donorgruppen besonders gering exprimiert (<35% der CD3<sup>+</sup> T–Zellen). Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

4.6.3 Das Expressionsmuster der CD3+ T-Zellen im peripheren Blut im Vergleich mit dem Expressionsmuster im Pankreasgewebe

Die Abbildung 4.23 fasst die unterschiedlichen Expressionsmuster der T-Zellen im Blutstrom und im Gewebe zusammen.

Hier zeigte sich, dass die Expressionsmuster der T-Zellen in den verschiedenen Kompartimenten (Blut und Gewebe) die unterschiedlichen Bedingungen wiederspiegeln. Der Vergleich vom T-Zell-Expressionsmuster im Blut zu dem im Gewebe zeigte signifikante Änderungen der Expressionen von ß-7 Integrin, CD62L sowie LFA-1 und PSGL.

Das CD62L zeigte im Gewebe eine erniedrigte Expressionsrate unter den vergleichbaren Kontroll- und Tumorbedingungen. Die jeweiligen Expressionsstärken von T-Zellen aus Tumor- und Kontrollblut sowie aus Tumor- und Kontrollgewebe waren nahezu unverändert (Ausnahme: ß-7 Integrin ist im Tumorgewebe signifikant reduziert). Die Expressionsraten waren im Gewebe viel geringer als im Blut. Beim Vergleich von Kontrollblut mit Kontrollgewebe sank die Expression auf T-Zellen um 51,4%.



**Abbildung 4.23**: Das Expressionsmuster von CD3+ T-Zellen in Tumor- und Kontrollgewebe (n=4-9) sowie in Blutproben aus Tumor- und Kontrolldonoren (n=4-10). Der Vergleich zeigte eine signifikante Expressionserhöhung von ß-7 Integrin auf CD3+ T-Zellen im Gewebe im Vergleich zur Expression im Blutstrom. Ebenso zeigten sich differentielle Expressionen für CD62L und LFA. Beide Proteine waren auf T-Zellen im Gewebe schwächer exprimiert als im Blutstrom. Geänderte Expressionen zeigten sich auch bei PSGL, tendenziell erniedrigt im Tumorgewebe, sowie bei CD56, welches tendenziell erhöhte Expression im Gewebe zeigte. Signifikanzniveau : \*p<0,1; \*\*p<0,05.

Beim Vergleich von Tumorblut mit Tumorgewebe betrug die Differenz 33,3%. Die Unterschiede zwischen Blut und Gewebe sprachen hierbei für eine Expressionsänderung, die wahrscheinlich tumor-unabhängig stattfindet, da die Expressionsänderung auch im Kontrollgewebe festzustellen war.

Das ß–7 Integrin hingegen zeichnete sich vor allem durch höhere Expression im Kontrollgewebe als im Kontrollblut aus (von 9,2%+-4,5% auf 68,6%+-7,0%exprimierende T–Zellen). Der Vergleich der Expressionen in Tumorblut und Tumorgewebe zeigte, dass die Expression von ß–7 Integrin im Tumorgewebe ebenfalls induziert wurde (+26% exprimierende T–Zellen), jedoch im Vergleich zum Kontrollgewebe sehr viel schwächer war (–37,3%).

Das LFA-1 zeigte interessanterweise ähnliche, wenn auch inverse Effekte wie das ß-7 Integrin. Hierbei war die Expression des LFA-1 auf T-Zellen im Gewebe schwächer als auf T-Zellen im Blut, wo über 90% der T-Zellen, unabhängig von Tumor- und Kontrollbedingungen, das LFA-1 Protein exprimierten. Der Vergleich der Expressionsraten von T-Zellen zwischen Tumor- und Kontrollgeweben, zeigte eine wesentlich höhere Expression auf T-Zellen im Tumorgewebe (21,5%+-4,0% im Kontrollgewebe und 60,5%+-23,3% im Tumorgewebe). Auch in diesem Fall kann, wie beim ß-7 Integrin, vermutet werden, dass das Tumormilieu dafür verantwortlich ist, dass sich die Expressionsstärken auf residenten T-Zellen erhöhen.

Ebenso zeigte das PSGL, welches im Blut von Tumor- und Kontrolldonoren von über 95% der T-Zellen exprimiert wird, eine signifikante Expressionserniedrigung auf T-Zellen im Tumorgewebe (von >95% im Tumorblut auf 64,6%+-17,3% im Tumorgewebe), jedoch nicht auf T-Zellen im Kontrollgewebe (von >95% im Kontrollblut auf 83,7%+-10,0% im Kontrollgewebe).

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass eine wesentlich größere Zahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe vorzufinden ist, stellte sich nun die Frage, zu welcher Subpopulation die zusätzlich infiltrierenden T-Zellen gehören.

# 4.7 Die CD4+ und CD8+ T-Zell Infiltration in Tumor- und Kontrollpankreasgewebe

Die folgenden Ergebnisse sollten klären, ob sich die erhöhten T-Zellzahlen im Tumorgewebe durch erhöhte Infiltration einer bestimmten Subpopulation der T-Zellen erklären lässt. Dazu wurden Tumor- und Kontrollgewebe mechanisch dissoziiert und die Einzelzellpopulationen aus Tumor- und Kontrollgewebe wurden mit anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern, die Fluorochrom gekoppelt waren, gefärbt. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte durch eine FACS-Analyse.

Zunächst wurden die Zellen mittels Größe und Granularität auf typische Lymphozyteneigenschaften überprüft (Abbildung 4.24). Dabei wurden nur die Zellen innerhalb der vorgegebenen Parameter in die weiteren Analysen eingeschlossen.



Abbildung 4.24: FACS-Analyse zur Quantifizierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Tumorund Kontrollgewebe. Die Gewebe wurden 2-6h nach der Operation mechanisch dissoziiert. Die Zellen wurden mit anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern gefärbt. Zunächst wurden die dissoziierten Zellen auf Größe und Granularität untersucht. Dargestellt sind repräsentative Auswertungen mit prozentualer Zugehörigkeit. Die T-Zellen im Tumorgewebe zeigten eine leicht erhöhte CD3 Expression. Im Tumorgewebe befinden sich wesentlich mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen als im Kontrollgewebe (Kasten). Es zeigten sich keine Quantitätsunterschiede bei der CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl in Tumor- und Kontrollgewebe.

Die Färbungen in Abbildung 4.24 zeigen repräsentative Ergebnisse zur T-Zellfärbung. Dabei zeigten sich beim Vergleich zwischen Tumor- und Kontrollgewebe zwei Unterschiede. Erstens zeigten die T-Zellen im Tumorgewebe eine leicht erhöhte Expression von CD3, was durch die Verschiebung der Populationen auf der x-Achse zu erkennen ist.

Zweitens wird deutlich, dass die T-Zellpopulation, die im Kontrollpankreasgewebe vorliegt, zu etwa 50 % aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen und zu 50% aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen besteht. Beide Populationen zusammen umfassten etwa 1-5% der Gesamtzellen des Gewebes nach Aufreinigung.

Im Unterschied dazu zeigten sich im Tumorgewebe wesentlich höhere Zahlen von CD4<sup>+</sup> T–Zellen (13,7% der Lymphozyten im Kontrollgewebe und 25,2% im Tumorgewebe), nicht aber höhere CD8<sup>+</sup> T–Zellzahlen (14,7% im Kontrollgewebe und 11,2% im Tumorgewebe).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.25 zusammengefasst.



**Abbildung 4.25**: Prozentualer Anteil der T-Zell-Subpopulationen CD4+ und CD8+ im Tumorund Kontrollgewebe an der Gesamtzellzahl. Die angegebenen Werte wurden mittels FACS-Analyse bestimmt. **A** zeigt den prozentualen Anteil der CD8+ T-Zell Population an der Gesamtzellzahl im Tumor- und Kontrollgewebe. **B** zeigt den prozentualen Anteil der CD4+ T-Zell Population an der Gesamtzellzahl im Tumor- und Kontrollgewebe. Es ergaben sich beim Vergleich von Tumor- und Kontrollgewebe keine Unterschiede beim Vorkommen der CD8+ T-Zellen. Die Anzahl der CD4+ T-Zellen war jedoch im Tumorgewebe erhöht. n=8-10. Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

Der Mittelwert des prozentualen Anteils an der Gesamtzellzahl lag für CD8+ T-Zellen im Tumor- und Kontrollgewebe zwischen 0,8 und 1,1%. Der Mittelwert des prozentualen Anteils an der Gesamtzellzahl lag für CD4+ T-Zellen beim Kontrollgewebe bei 0,65% und beim Tumorgewebe bei 1,5%. Das heißt, dass die Zahl von CD4+ T-Zellen im Tumorgewebe um das 2,3-fache höher ist als im Kontrollgewebe. Dabei lag der höchste prozentuale CD4+ T-Zellanteil im Kontrollgewebe bei 1,2%. Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass CD4+ T-Zellen einen selektiven Infiltrationsvorteil in Tumorgewebe haben.

### 4.8 Das CAM-Expressionsmuster der CD4+ und CD8+ T-Zellen

Die Expressionsstärken der einzelnen CAMs lassen Rückschlüsse über die Interaktionsstärke mit Endothelzellen zu. Dabei ist anzunehmen, dass Zellen mit höherer CAM-Expression auch eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Interaktion mit dem jeweiligen Bindungspartner haben. Die erstellten Expressionsmuster konnten charakterisieren, ob CD4+ und/oder CD8+ T-Zellpopulationen durch ihr Expressionsmuster für eine Infiltration in Tumorund/oder Kontrollgewebe begünstigt sind.

### 4.8.1 Das CAM-Expressionsmuster von CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut

Da der Weg der T-Zellen zur Infiltration in das Pankreasgewebe über das periphere Blut und die Interaktion mit dem Endothel führt, sollte zunächst ein CAM-Expressionsmuster der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut erstellt werden. Dieses sollte später mit den T-Zell Expressionsmustern des Tumor- und Kontrollgewebes verglichen werden.

Die Abbildung 4.26 zeigt den prozentualen Anteil der CAM-exprimierenden T-Zell Subpopulationen in Blutproben von Tumorgewebsdonoren und Kontrollgewebsdonoren (n=4-8). Beide Subpopulationen exprimierten zu sehr hohen Anteilen ß-1 Integrin, PSGL, LFA-1 und CD6. Dabei machte der Anteil der exprimierenden Subpopulation von der Gesamtsubpopulation 62%-98% aus.

Hingegen wurden  $\beta$ -7 Integrin, wie auch CD24, CD56 und CD166 im peripheren Blut nur von einem kleinen Teil der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert (5%-30%). Manche Proteine zeigten differentielle Expressionsraten in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, nach Vergleich im Tumor- und Kontrolldonor Blut. Hiervon wurden hauptsächlich die CD4+ T-Zellen betroffen (5 von 9 sind reguliert). Im Vergleich dazu waren nur 2 von 9 Expressionsraten auf den CD8+ T-Zellen hoch- oder runterreguliert. Von den 5 regulierten Proteinexpressionen der CD4+ T-Zellen zeigten 4 von 5 eine schwächere Expression auf CD4+ T-Zellen (ß-7 Integrin, CD24, LFA-1 und CD56). Lediglich das CD62L zeigte eine Expressionssteigerung auf CD4+ T-Zellen im Blut von Tumorgewebsdonoren (45,9%+-1% der T-Zellen exprimieren CD62L in Kontrollgewebsdonoren und 84,1%+-8,3% in Tumorgewebsdonoren).



**Abbildung 4.26**: Prozentualer Anteil von CAM-exprimierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von Tumor- und Kontrollgewebsdonoren (n=3-6). Die mononukleären Zellen der Blutproben wurden aufgereinigt und gegen CD4 bzw. CD8 und die jeweiligen CAMs gefärbt. Die Expressionsdaten wurden fluoreszenz-zytometrisch bestimmt. 5 von 9 CAMs sind auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen reguliert. Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind nur 2 von 9 CAMs reguliert. Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

Mit Ausnahme von CD62L war die Proteinexpression auf CD4+ T-Zellen scheinbar schwächer. Interessanterweise zeigte der Vergleich der Expressionsstärken im Blut von Tumor- und Kontrollgewebsdonoren, dass die CAM-Expressionen von CD8+ T-Zellen sich weniger unterscheiden. Auf CD8+ T-Zellen waren lediglich CD24 und CD62L reguliert.

Hierbei zeigten CD24, wie auch schon auf CD4<sup>+</sup> T–Zellen, eine geringere Expression im Blut von Tumorgewebsdonoren (von 18,8%+–1,4% auf 3,1%+–2,3% im Blut von Tumorgewebsdonoren). CD62L hingegen war, wie auch schon auf CD4<sup>+</sup> T–Zellen zu beobachten, im Blut von Tumorgewebsdonoren auf CD8<sup>+</sup> T–Zellen induziert (von 28,2%+–2,0% auf 56,8%+–9,2% im Blut von

Tumorgewebsdonoren). Dabei lag das Expressionsniveau von CD62L auf CD8+ T-Zellen im Blut von Tumor- und Kontrollgewebsdonoren unter dem Expressionsniveau auf CD4+ T-Zellen. So war CD62L in beiden Subpopulationen im Blut von Tumorgewebsdonoren induziert, während CD24 in beiden Subpopulationen von weniger Zellen exprimiert wurde.

Durch das Expressionsmuster konnte gezeigt werden, dass sich CD4+ und CD8<sup>+</sup> T–Zellen durch differentielle CAM–Expressionen im Blut von Tumorgewebsdonoren charakterisieren lassen. Diese Expressionsänderungen könnten einer Veränderung der Transmigrationsund zu Infiltrationseigenschaften der Zellen führen. Die Abbildung 4.25 zeigt eine signifikante, selektive Anreicherung von CD4+ T-Zellen im Tumorgewebe. Dabei stellte sich die Frage, welche CAMs für die selektive Anreicherung im Tumorgewebe mitverantwortlich sein könnten.

4.8.2 Das CAM-Expressionsmuster von CD4+ und CD8+ T-Zellen im Pankreasgewebe

Die Abbildung 4.27 zeigt die Expressionsmuster der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T– Zellen im Tumor– und Kontrollgewebe.

Die Expressionsmuster ähnelten sich für die meisten CAMs, allerdings fielen drei CAMs differentielle Expressionen auf. So bei waren die Expressionsstärken von ß-1 Integrin, ß-7 Integrin und CD166 auf bestimmten T-Zell Subpopulationen herunterreguliert. Im Falle von ß-1 Integrin war eine signifikante Expressionserniedrigung nur auf den CD4+ T-Zellen zu erkennen (98,3%+-2,0% exprimierende CD4+ T-Zellen im Kontrollgewebe und 74,7%+-16,6% im Tumorgewebe). Ebenso war auch die auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD166 Expression nur im Tumoraewebe herunterreguliert (von 61,5%+-26,2% exprimierender CD4+ T-Zellen im Kontrollgewebe auf 17,6%+-8,3% im Tumorgewebe), während es auf CD8+ T-Zellen keine Effekte gab.

Lediglich die B-7 Integrin Expression war sowohl auf CD4<sup>+</sup> wie auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe reduziert. 3 von 9 CAMs waren auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe herunterreguliert. Nur 1 von 9 CAMs ist auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe niedriger exprimiert als im Kontrollgewebe.



**Abbildung 4.27**: Prozentualer Anteil von CAM-exprimierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Tumor- und Kontrollgeweben (n=3-6). Die Gewebe wurden mechanisch dissoziiert und die Einzelzellen auf CD4 bzw. CD8 und die jeweiligen CAMs gefärbt. Die Expressionsdaten wurden fluoreszenz-zytometrisch bestimmt. 3 von 9 CAMs sind auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen reguliert (ß-1 und ß-7 Integrin sowie CD166). Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist nur 1 von 9 CAMs reguliert (ß-7 Integrin). Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

4.8.3 Das Expressionsmuster der CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut im Vergleich mit dem Expressionsmuster im Pankreasgewebe

In Abbildung 4.28 ist der Vergleich zwischen den Expressionsmustern von CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut und im autologen Gewebe dargestellt. Der Vergleich zeigte, dass 6 von 9 CAMs im Blut von Kontrolldonoren auf T-Zellen schwächer exprimiert werden als im autologen Gewebe. Die Expressionsraten von ß-1 Integrin, ß-7 Integrin, CD24, CD6, CD56 und CD166 sind tendenziell auf T-Zellen gesteigert, die im Gewebe liegen.

Außerdem könnte die Expressionssteigerung eine Möglichkeit sein, dass infiltrierende Zellen vor Ort über Zell-Zellkontakte interagieren können.

Auch könnten die Expressionssteigerungen Auswirkungen auf die Funktionalität der T-Zell Subpopulationen haben, indem durch Kostimulation spezielle Signaltransduktionswege aktiviert werden und die Zellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber ihrem Antigen aufweisen könnten.



**Abbildung 4.28**: Prozentualer Anteil von CAM-exprimierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Blut und autologem Gewebe der gleichen Kontrolldonoren (n=3-6). Die Gewebe wurden mechanisch dissoziiert und die Einzelzellen auf CD4 bzw. CD8 und die jeweiligen CAMs gefärbt. Die Blutproben wurden auf mononukleäre Zellen aufgereinigt und dann zur Färbung eingesetzt. Die Expressionsdaten wurden fluoreszenz-zytometrisch bestimmt. 6 von 9 CAMs sind tendenziell stärker exprimiert auf T-Zellen im Gewebe als auf T-Zellen im peripheren Blut (beide Integrine, CD24, CD6, CD56 und CD166). Den stärksten Expressionsunterschied lies  $\beta$ -7 Integrin erkennen (Blut: 20,4%+-11,5% exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen; Tumor: 99,4%+-1,0%). Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

Sollten die Expressionsänderungen eventuelle Auswirkungen auf die Funktionalität der T-Zellen haben, so müssten sich Tumor- und Kontrollgewebe im Vergleich durch unterschiedliche Expressionsmuster der T-Zell Subpopulationen charakterisieren lassen. Dazu war es notwendig, das Expressionsmuster der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zwischen peripherem Blut und Tumorgewebe darzustellen (Abbildung 4.29).

Bei dem Vergleich der Expressionsmuster aus peripherem Blut und Tumorgewebe der gleichen Tumordonoren fiel auf, dass vor allem ß-7 Integrin, CD24, CD56, und CD166 im Tumorgewebe auf den beiden T-Zell Subpopulationen stärker exprimiert wurde als im peripheren Blut.

LFA-1 wird auf CD4+ T-Zellen im Tumorgewebe induziert, während die Expression auf CD8+ T-Zellen unverändert hoch bleibt.



**Abbildung 4.29**: Prozentualer Anteil von CAM-exprimierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Blut und autologem Gewebe der gleichen Tumordonoren (n=3-6). Die Gewebe wurden mechanisch dissoziiert und die Einzelzellen auf CD4 bzw. CD8 und die jeweiligen CAMs gefärbt. Die Blutproben wurden auf mononukleäre Zellen aufgereinigt und dann zur Färbung eingesetzt. Die Expressionsdaten wurden fluoreszenz-zytometrisch bestimmt. 5 von 9 CAMs waren auf T-Zellen im Gewebe tendenziell stärker exprimiert, als auf T-Zellen im peripheren Blut (ß-7 Integrin, CD24, CD56 und CD166). Signifikanzniveau : \*\*p<0,05.

Zusammenfassend ähnelten sich die Expressions-Änderungen der CD4+ und CD8+ T-Zellen beim Vergleich der Expressionsstärken im peripherem Blut und im Tumorgewebe (Ausnahmen: LFA-1 und CD62L).

Um Unterschiede im Infiltrationsverhalten der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf das Expressionsmuster zurückzuführen, ist es notwendig, dass Abbildungen 4.28 und 4.29 miteinander verglichen werden. Dieser Vergleich ermöglichte die Identifizierung selektiv erhöhter CAM-Expressionen auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor und nach der Infiltration durch Tumor- und Kontrollendothel.

Der Vergleich verdeutlichte drei Unterschiede zwischen der Infiltration in Tumor- oder Kontrollgewebe.

Erstens war die Expression von ß-1 Integrin auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Infiltration aus dem Blut in das Kontrollgewebe gesteigert (von 84,6%+-2,7% auf 98,3%+-2,0%). Diese Steigerung war im Falle der Infiltration in Tumorgewebe nicht festzustellen (80,7%+-14,1% auf 74,7%+-16,6%).

Zweitens war die Expressionssteigerung von ß-7 Integrin auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Infiltration in das Kontrollgewebe sehr stark (von 20,4%+-11,5% auf 99,4%+-1,0% im Kontrollgewebe für CD4<sup>+</sup> T-Zellen und von 14,8%+-4,1% auf 93,0%+-8,6% für CD8<sup>+</sup> T-Zellen), sie wurde jedoch im Falle der Infiltration in das Tumorgewebe stark reduziert (von 99,4%+-1,0% im Kontrollgewebe auf 28,2%+-25% im Tumorgewebe für CD4+ T-Zellen und von 93,0%+-8,6% auf 36,0%+-20,2% im Tumorgewebe für CD8+ T-Zellen). Drittens war CD24 nach der Infiltration in das Kontrollgewebe auf den CD8+ T-Zellen erhöht (von 18,8%+-1,4% auf 46,9%+-0,4% im Tumorgewebe). Auf den CD4+ T-Zellen war CD24 bei der Infiltration in das Kontrollgewebe nicht induziert, jedoch bei der Infiltration in das Tumorgewebe stark erhöht (von 2,8%+-0,2% auf 35,6%+-28,9%).

### 4.9 Die CD4+CD25+ Population im peripheren Blut und die Infiltration in Tumor- und Kontrollpankreasgewebe

Der Tumor beeinflusst beim Wachstum auf vielfältige Art und Weise die Homöostase des lokalen Gewebes. Es ist anzunehmen, das immunologisch relevante Zellen, wie die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen diese Veränderungen durch Zell-Zellkontakt und Zytokinsekretion wahrnehmen können und dadurch aktiviert werden, die Tumorzellen zu attackieren. Wie der Verlauf der Krankheit jedoch beweist, scheint diese Aktivierung nicht stattzufinden, oder nicht ausreichend für die Abstossung der Tumorzellen zu sein. Hierbei könnten verschiedene Evasionsstrategien des Tumors von Bedeutung für fortgesetztes Wachstum sein. Eine dieser Strategien könnte die Anreicherung von inhibitorischen Tregs im Tumorgewebe sein. Dazu müsste der Tumor durch Änderung des Mikromilieus im Gewebe für eine selektive Infiltration von Tregs sorgen. Diese wiederum würden die zytotoxischen Funktionen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen stark inhibieren.

Ob tatsächlich eine Anreicherung von Tregs im Tumorgewebe stattfindet, wurden mittels FACS-Analysen überprüft. Tregs exprimieren konstitutiv membranständiges CD25. In den FACS-Analysen wurden zunächst die geeigneten Parameter etabliert, um CD4+CD25- Zellen von CD4+CD25+ Zellen unterscheiden zu können. In Abbildung 4.30 sind die Parameter zur Unterscheidung der unterschiedlichen CD4+T-Zell Populationen dargestellt.

Die relevanten Zellen wurden dazu aus den Blutproben, wie auch auch aus dem autologen Donorgewebe isoliert. Nach Isolation wurden die Einzelzellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 inkubiert.

Vor der Messung wurde zusätzlich mit Propidiumiodid inkubiert, um vitale Zellen bei der Messung separieren zu können. Die Parameter ermöglichen die Separation einer CD25 exprimierenden CD4<sup>+</sup> Population und einer CD25 nicht-exprimierenden CD4<sup>+</sup> Population.



Abbildung 4.30: Ausgewählte Parameter zur Unterscheidung zwischen CD4+CD25- Zellen und CD4+CD25+ Zellen in Blut und Gewebe. Hier beispielhaft dargestellt, ist die Messung an dissoziierten Tumorgewebe. Zunächst wurden die Größeneinem und Granularitätseigenschaften der Lymphozyten als Einschlussmerkmal festgesetzt. Aus der Lymphozyten-Population wurden alle vitalen und CD4+ Zellen ausgewählt. Diese Population enthielt einige autofluoreszente Zellen, die aufgrund ihrer höheren Granularität ausgeschlossen wurden. Die Parameter lieferten nun eine Population CD4+ Zellen, die einen Anteil von 4,6% an der anfänglichen Gesamtpopulation hatte. Davon exprimierten 28,7% CD25 und 71,6% der Zellen fehlte die CD25-Expression.

# 4.9.1 Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+ Population im peripheren Blut von Tumor- und Kontrolldonoren

Die Abbildung 4.31 zeigt die Zusammenfassung der Messungen und damit den prozentualen Anteil der CD25<sup>+</sup> Zellen an den CD4<sup>+</sup> Populationen.



**Abbildung 4.31**: Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+ Zellen an der CD4+ Population im peripheren Blut von Tumor- und Kontrolldonoren (n=10). Mononukleäre Zellen wurden aus frischen Blutproben isoliert und sofort für die FACS-Analyse gefärbt. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrolldonoren erkennbar.

Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+ Zellen an der CD4+ Population im peripheren Blut von Tumor- und Kontrolldonoren schwankte interindividuell zwischen 1,0 und 7,9%. Dabei blieb der jeweilige Anteil der CD4<sup>+</sup> Population an der Gesamtzellzahl vergleichbar. Der Mittelwert des Anteils im Kontrolldonorblut lag bei 3,1%+-1,9%, der Mittelwert des Anteils im Tumordonorblut lag mit 4,9%+-2,1% leicht höher, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Da sich im Blut der unterschiedlichen Donoren keine Unterschiede bezüglich des CD4+CD25+ Anteils an der CD4<sup>+</sup> Population ergaben, konnte davon ausgehen werden, dass sich die Existenz des Tumors nicht auf die Zusammensetzung der CD4+ Population auswirkte.

4.9.2 Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+ Population im Tumor- und Kontrollgewebe

Um festzustellen, ob die erhöhte Infiltration von CD4+ Zellen in das Tumorgewebe auf eine verstärkte Infiltration von Tregs zurückzuführen ist, wurden die Gewebe wie zuvor mechanisch dissoziiert und mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt. Die Zellen wurden nachfolgend einer FACS-Analyse unterzogen.



**Abbildung 4.32:** Der prozentuale Anteil der CD4+CD25+ Zellen an der CD4+ Population im Tumor- und Kontrollgewebe (n=10). Die Gewebe wurden 2-6h nach der OP mechanisch dissoziiert und sofort für die FACS-Analyse gefärbt. Der Anteil der CD4+CD25+ Zellen an der Gesamt-CD4+ Population ist im Tumorgewebe wesentlich höher. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Für die Analysen wurden jeweils 10 Tumorund Kontrollgewebe aufgearbeitet. Danach wurde deutlich, dass es eindeutige Unterschiede in der Zusammensetzung der CD4+ Population zwischen Tumorund Kontrollgewebe gibt. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Der Vergleich des CD4+CD25+ Anteils an der CD4+ Population zwischen Tumor- und Kontrollgewebe zeigte im Kontrollgewebe ein Anteil von 7,9%+-5,4%. Hingegen war der Anteil im Tumorgewebe mit 39,3%+-26,5% signifikant höher (p=0,0018). In den verschiedenen Kontrollgeweben betrug der höchste Anteil der CD4+CD25+ Zellen 12,4%. Im Tumorgewebe waren 9 von 10 gemessenen Anteilen höher als der höchste Anteil im Kontrollgewebe.

### 4.9.3 Der Vergleich des CD4+CD25+ Anteils zwischen peripherem Blut und Pankreasgewebe

Die FACS-Analysen mit Donorblut konnten belegen, dass der Anteil der CD4+CD25+ Population sich zwischen den Tumor- und Kontrolldonoren nicht signifikant unterscheidet. Hierbei lag der prozentuale Anteil im Mittel bei 3,1%+-1,9% für das Kontrolldonor Blut und bei 4,9%+-2,1% für das Tumordonor Blut. Es gibt also keine Anreicherung dieser Population im peripheren Blut von Tumordonoren.

Der Vergleich der Anteile der CD4+CD25+ Population mit den prozentualen Anteilen im Gewebe verdeutlicht jedoch eine Anreicherung der CD4+CD25+ Population im Tumorgewebe. Im Kontrollgewebe konnte ein Anteil der CD4+CD25+ Population von 7,9%+-5,4% gemessen werden. Dieser Anteil war tendenziell höher als im Blut, unterschied sich jedoch nicht sigifikant. Hingegen war der Anteil der CD4+CD25+ Population im Tumorgewebe signifikant höher als im Blut (39,3%+-26,5%; p≤0,05). Da diese Anreicherung selektiv im Tumorgewebe festzustellen war, könnte es sich hierbei um eine tumorspezifische Infiltration der CD4+CD25+ Population handeln.

Die Expression der Proteine CD4 und CD25 sind keine eindeutigen Merkmale für die Bestimmung von Tregs. So exprimieren auch aktivierte CD4<sup>+</sup> T–Zellen CD25. Eine Unterscheidung von Tregs und aktivierten CD4<sup>+</sup> T–Zellen ist in einem solchen Fall nicht sicher möglich. Um sicherzustellen, dass es sich bei der Anhäufung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population um Tregs handelte, musste ein zweites Merkmal herangezogen werden. Dazu wurde die Expression von FoxP<sub>3</sub> genutzt. Dies ist ein Transskriptionsfaktor, der in Tregs konstitutiv exprimiert wird.

# 4.9.4 Die immunhistologische Bestimmung des Anteils von FoxP<sub>3</sub> exprimierenden CD4+CD25+ Zellen im Gewebe

Zunächst sollte der Anteil der CD4+CD25+ Zellen an der CD4+ Population bestimmt werden, um die Ergebnisse der FACS-Analysen immunhistologisch bestätigen zu können. Dazu wurden 9 Tumor- und Kontrollgewebe auf CD4und CD25-Expression gefärbt. Die Auswertung der prozentualen Anteile wurde in Abbildung 4.33 dargestellt. Die Mittelwerte der prozentualen CD25 Koexpression auf CD4+ T-Zellen betrugen im Kontrollgewebe 19,9%+-8,8% und im Tumorgewebe 43,1%+-14,3%. 6 von 9 Tumorgeweben zeigten eine höhere prozentuale Koexpression als die höchste im Kontrollgewebe (33,0%).



**Abbildung 4.33**: Immunhistologische Färbung von Tumor- und Kontrollgewebe auf CD4 und CD25 zur Quantifizierung des Koexpressions-Anteils auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Hierbei wurden 100 CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus 4 verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt. Darauffolgend war eine Bestimmung des Anteils koexprimierender CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen möglich. A zeigt die prozentuale Koexpression von 9 Tumor- und Kontrolldonoren. Der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen war im Tumorgewebe signifikant erhöht. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05. B zeigt eine typische Kolokalisation ( $\rightarrow$ ) von CD4 und CD25 in einem Tumorgewebe, das zusätzlich mit DAPI gefärbt wurde, um die Zellkerne zu markieren (250x).

Nachdem die Ergebnisse der FACS-Analysen sich in immunhistologischen Färbungen reproduzieren ließen, wurden nun Dreifach-Färbungen mit anti-CD4, anti-CD25 und anti-FoxP<sub>3</sub> Antikörpern durchgeführt. Daraufhin konnte der Anteil der FoxP<sub>3</sub><sup>+</sup> Zellen an der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population festgestellt werden. Diese Färbungen sollten klarstellen, ob es sich bei der Anhäufung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen auch um Tregs handelt.

Die Abbildung 4.34 zeigt typische Immunfluoreszenzfärbungen aus dem Tumorgewebe auf CD4, CD25 und FoxP<sub>3</sub>, sowie die Auswertung des prozentualen Anteils der FoxP<sub>3</sub> exprimierenden Population. Dabei zeigte sich eine differentielle Expression von FoxP<sub>3</sub> in den CD4+CD25+ Populationen des Tumor- und Kontrollgewebes. Im Kontrollgewebe betrug der Anteil der FoxP<sub>3</sub> exprimierenden CD4+CD25+ Zellen 53,5%+-11,2%. Im Tumorgewebe war dieser Anteil signifikant erhöht (74,6%+-14,2%; p=0,0017). Diese Verhältnisse verdeutlichen, dass im Tumorgewebe nicht nur mehr CD4+CD25+ T-Zellen aufzufinden sind, sondern dass etwa  $\frac{3}{4}$  davon gleichzeitig FoxP<sub>3</sub> koexprimieren.



**Abbildung 4.34**: Immunhistologische Färbung von Tumor- und Kontrollgewebe auf CD4, CD25 und FoxP<sub>3</sub> zur Quantifizierung des Koexpressions-Anteils auf CD4+CD25+ T-Zellen. **A** zeigt eine repräsentative Dreifachfärbung auf CD4, CD25 und FoxP<sub>3</sub> (250x). Die membranständigen Expressionen von CD4 und CD25 sind deutlich von den FoxP<sub>3</sub> Färbungen in den Kernen zu unterscheiden (**B**; 640x). **C** zeigt die prozentuale Koexpression von 10 Tumor- und Kontrolldonoren. Der Anteil der FoxP<sub>3</sub> exprimierenden Zellen an der CD4+CD25+ Population ist hierbei dargestellt. Der Anteil der FoxP<sub>3</sub> exprimierenden Zellen war im Tumorgewebe signifikant erhöht. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Damit sind es phänotypisch Tregs. Im Kontrollgewebe konnten, wie zuvor gezeigt (Abbildung 4.32), weniger CD4+CD25+ T-Zellen als im Tumorgewebe detektiert werden. Zusätzlich waren signifikant weniger Zellen dieses Phänotyps FoxP<sub>3</sub>+.

#### 4.10 Die Zytokinexpression der gewebsresidenten Zellen

4.10.1 Die Konzentration von TGF-ß und IL-10 im Tumor- und Kontrollgewebe

Die wesentlichen Effektorzytokine von Tregs sind IL-10 und TGF-ß. Um festzustellen ob sich die Gewebskonzentrationen an TGF-ß und IL-10 zwischen Tumor- und Kontrollgewebe unterscheiden, wurden ELISA-Tests durchgeführt.



**Abbildung 4.35**: ELISA-Test zur Konzentrationsbestimmung von TGF-ß und IL-10 im Tumor- und Kontrollgewebe. Die Gewebe (n=10) wurden dissoziiert und homogenisiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der Suspensionen bestimmt und gleiche Proteinmengen für die Tests verwendet (50µg/ml). Das Tumorgewebe zeigte durchschnittlich signifikant höhere TGF-ß Konzentrationen (A). Die Konzentrationen von IL-10 zeigten keinen Unterschied zwischen Tumor- und Kontrollgewebe (**B**). Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Dazu wurden zunächst jeweils zehn Tumor- und Kontrollgewebe dissoziiert und homogenisiert. Aus der Suspension wurde der Proteingehalt bestimmt und anschließend gleiche Proteinmengen (50µg/ml) zur Bestimmung der Zytokine im ELISA-Test eingesetzt. Die Abbildung 4.35 zeigt die berechneten Konzentrationen an TGF-ß und IL-10 im Tumor- und Kontrollgewebe als Mittelwerte der Einzelkonzentrationen.
Die Konzentration von TGF-ß war im Tumorgewebe signifikant erhöht, während sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den IL-10 Konzentrationen feststellen liessen. Die TGF-ß Konzentration betrug im Kontrollgewebe durchschnittlich 52,82pg/ml+-34,76pg/ml.

Im Tumorgewebe war sie im Durchschnitt mehr als 3-fach erhöht (178,8pg/ml+-172,6pg/ml). Weiterhin auffällig war die hohe Varianz der Konzentrationen beim Vergleich der Tumorgewebe, während die Konzentrationen von TGF-ß im Kontrollgewebe relativ konstant bei ca. 70pg/ml lagen. Bei 3 von 10 Kontrolldonoren konnte kein TGF-ß festgestellt werden (Nachweisgrenze liegt bei 10pg/ml). Im Tumorgewebe hingegen lag niedrigste der gemessenen Werte bei 37,2pg/ml. der 5 von 10 Tumordonoren zeigten TGF-ß Werte von über 120pg/ml, 4 von 10 sogar über 200pg/ml. Im Vergleich dazu war der höchste gemessene Wert der Kontrollgewebe 80,1pg/ml. Diese Resultate zeigen eine deutliche Erhöhung der TGF-ß Konzentration im Tumorgewebe.

Im Folgenden wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt, die beweisen sollten, welche Zellspezies im Gewebe TGF-ß produziert.

# 4.10.2 Die Zytokinexpression einzelner Zelltypen im Tumor- und Kontrollgewebe

Mit immunhistologischen Färbungen sollte überprüft werden, welche der im Gewebe vorkommenden Zellspezies pro- und anti-inflammatorische Zytokine produziert. Hierzu wurden zunächst einzelne Zelltypen durch Färbung eines von ihnen typisch exprimierten Proteins markiert. Zusätzlich wurde auf die anti-inflammatorischen Zytokine TGF-ß und IL-10, sowie die proinflammatorischen Zytokine Interferon- (IFN-) gamma und -alpha gefärbt. So konnte die Expression der einzelnen Zytokine von den unterschiedlichen Zelltypen im Gewebe quantifiziert werden.

Dazu wurden mehrere Kryoschnitte von je 3 Tumor- und Kontrollgeweben angefertigt. Diese wurden anschließend auf die einzelnen Zelltypen und die Zytokine gefärbt, so dass die Expression jedes Zytokins in jedem Zelltyp untersucht werden konnte. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden 100 Zellen des jeweiligen Zelltyps aus vier Gesichtsfeldern ausgezählt. Dann wurde bestimmt, wie viele dieser Zellen tatsächlich ein jeweiliges Zytokin exprimieren. Hieraus wurde der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation im Gewebe berechnet (Tabelle 4.2). **Tabelle 4.2**: Die Tabelle zeigt die Resultate der immunhistologischen Untersuchungen zur Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in Tumor- (**B**) und Kontrollgewebe (**A**). In jeweils 3 Tumor- und Kontrollgeweben wurden verschiedene Zellspezies durch ein von ihnen typisch exprimiertes Protein mittels Antikörperfärbung fluoreszenzgekoppelt. Dentritische Zellen mit DC-Sign, Fibroblasten mit CD90, Endothelzellen mit CD31, T-Zellen mit CD3 und Tumorzellen sowie Epithelzellen mit Zytokeratin. Zusätzlich wurde jeweils auf die anti-inflammatorischen Zytokine TGF-ß und IL-10, sowie auf die inflammatorischen Zytokine IFN-alpha und -gamma gefärbt. Die Zytokeratinfärbung war im Kontrollgewebe wesentlich schwächer, da keine Tumorzellen, sondern nur Epithelzellen markiert wurden. Die Sterne repräsentieren die prozentuale Koexpression der Zellspezies mit dem Zytokin. n.d.= nicht detektierbar.

\*=10-20% der Zellspezies koexprimiert das Zytokin; \*\*=20-30%; \*\*\*>30%

Kontroligewebe								
Α	DC-SIGN	CD90	CD31	CD3	Zytokeratin			
TGF-ß	n.d.	*	n.d.	*	n.d.			
IL-10	n.d.	n.d.	*	*	**			
IFN gamma	n.d.	n.d.	***	**	n.d.			
IFN alpha	n.d.	*	n.d.	n.d.	n.d.			

Kontrollgewebe

_					
В	DC-SIGN	CD90	CD31	CD3	Zytokeratin
TGF-ß	n.d.	*	*	**	**
IL-10	n.d.	n.d.	**	***	*
IFN gamma	n.d.	n.d.	**	*	*
IFN alpha	n.d.	**	n.d.	n.d.	n.d.

Der Vergleich der exprimierten Zytokine in Tumor- und Kontrollgewebe zeigte ein differentielles Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Tumormikromilieu. Dentritische Zellen exprimierten dabei keines der getesteten Zytokine. Von den Fibroblasten, die in beiden Gewebetypen in großen Mengen vorhanden waren, exprimierten im Tumorgewebe etwa 10% mehr Zellen Interferon- $\alpha$ . Die Endothelzellen wichen im Tumorgewebe ebenfalls von ihren Expressionsniveaus im Kontrollgewebe ab. Dabei exprimierten sie beide anti-inflammatorischen Zytokine (TGF-ß und IL-10) stärker. während die Expressionsrate des pro-inflammatorischen Interferon-y von einer starken Expression im Kontrollgewebe auf eine mittlere Expressionsstärke im Tumorgewebe abfiel. Interessanterweise verhielten sich die Expressionsraten der T-Zellen zwischen Tumor- und Kontrollgewebe ähnlich.

Die T-Zellen exprimierten im Tumorgewebe etwas mehr TGF-ß und wesentlich mehr IL-10. Gleichzeitig exprimierten sie, wie die Endothelzellen, Die Interferon– $\gamma$ . Tumorzellen wurden aufgrund weniger ihrer Zytokeratinexpression markiert. Dieses wird jedoch auch im Kontrollgewebe von Epithelzellen exprimiert. Somit war der direkte Expressionsvergleich nicht möglich, da es im Kontrollgewebe keine Tumorzellen gab. Die Epithelzellen im Kontrollgewebe exprimierten IL-10 auf mittlerem Niveau. Im Tumorgewebe waren nicht nur die Epithelzellen, sondern auch eine Vielzahl von Tumorzellen markiert. Die Tumorzellen exprimierten im Tumorgewebe deutlich mehr TGF-ß als die Epithelzellen im Kontrollgewebe. Ebenfalls konnte eine erniedrigte Expression von IL-10 im Tumorgewebe festgestellt werden.

Zusammenfassend spiegeln die Expressionsmuster der gewebsresidenten Zellen ein verändertes Zytokin-Mikromilieu wieder. Dabei waren vor allem die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF-ß im Tumorgewebe verstärkt exprimiert. Ein Großteil der T-Zellen exprimierte deutlich mehr TGF-ß wie auch IL-10 im Tumorgewebe. Aber auch die Endothelzellen exprimierten beide Zytokine deutlich stärker. Die Tumorzellen ergänzten diesen Effekt durch starke TGF-ß Expression, die im Kontrollgewebe fehlte. Während die anti-inflammatorischen Zytokinexpressionen im Tumorgewebe gesteigert waren, zeichneten sich die pro-inflammatorischen Zytokine durch abgeschwächte Expressionsraten im Tumorgewebe aus. Vor allem Endothelzellen und T-Zellen zeigten im Kontrollgewebe deutlich höhere Expressionsraten von Interferon- $\gamma$ .

4.10.3 Die Zytokinexpression von Tregs im Tumor- und Kontrollgewebe

In einem weiteren Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob insbesondere die tumorinfiltrierenden Tregs IL-10 und TGF-ß exprimieren.

Dazu wurden jeweils 3 Tumor- und Kontrollgewebe dissoziiert. Aus den Zellsuspensionen wurden die Tregs mittles magnetischer Separation isoliert. Die erfolgreiche Isolation erforderte zwei Teilschritte.



**Abbildung4.36**: Die Zytokinexpression von Tregs und CD4+CD25- Zellen im Tumor- und Kontrollgewebe. Jeweils 3 Gewebe wurden dissoziiert und die Tregs und CD4+CD25- Zellen durch magnetische Separation aufgereinigt. Nach der Aufreinigung der Zellpopulationen wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, fixiert und auf Expression von CD25 und TGF- $\beta$  oder IL-10 immunzytologisch gefärbt. **A** und **B** zeigen typische Färbungen von aufgereinigten Tregs aus dem Tumorgewebe auf IL-10 (**A**) und TGF- $\beta$  (**B**) (640x). Die Pfeile markieren die lokale Zytokinexpression der Zellen. In **C** ist die quantitative Auswertung der Einzelfärbungen zusammengefasst. Der Anteil der CD4+CD25- Zellen, die im Tumor- und im Kontrollgewebe Zytokine produzierten, war nahezu identisch. Er lag zwischen 18% und 27%. Von den Tregs im Kontrollgewebe produzierten etwa 8%–10% mehr Zellen im Vergleich zu den CD4+CD25- Zellen anti-inflammatorische Zytokine (33%–36). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Hingegen produzierte ein Großteil der Tregs im Tumorgewebe die Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 (72% und 49%; grau unterlegt). Der Unterschied zum Kontrollgewebe war bei beiden Zytokinen signifikant. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Zunächst wurden alle CD4 exprimierenden T-Zellen isoliert. Aus dieser Population wurden anschließend die CD25 exprimierenden Zellen isoliert. Die Reinheit der aufgereinigten Treg-Population wurde für jeden Ansatz mittels FACS-Analyse überprüft und betrug je nach Ansatz zwischen 67% und 92%. Zusätzlich wurde die CD4+CD25- Population als Kontrolle in den Messungen eingesetzt. Nach der Aufreinigung der Zellpopulationen wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, fixiert und auf Expression von CD25 und TGF-ß oder IL-10 immunzytologisch gefärbt (Abbildung 4.36).

Der Anteil der CD4+CD25- Zellen, die im Tumor- und im Kontrollgewebe Zytokine produzierten, war nahezu identisch. Er lag zwischen 18% und 27%. Von den Tregs im Kontrollgewebe produzierten etwa 8%-10% mehr Zellen im Vergleich zu den CD4+CD25- Zellen anti-inflammatorische Zytokine (33%-36). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Hingegen produzierte ein Großteil der Tregs im Tumorgewebe die Zytokine TGF-ß und IL-10 (72% und 49%; grau unterlegt).

Der Unterschied zum Kontrollgewebe war für beide Zytokine signifikant. Zusammenfassend zeigten die Tregs im Tumorgewebe eine selektive Expressionssteigerung anti-inflammatorischer Zytokine, die gemeinsam mit den Expressionsraten der Nachbarzellen (Tabelle 4.2) zu einem typischen Tumor-Zytokinmikromilieu führt.

#### 4.11 Der Aktivierungsstatus von zytotoxischen CD8+ T-Zellen in Tumorund Kontrollgewebe

Die Aktivierung der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gewebe hängt von ihrem spezifischen Antigen, der Kostimulation durch Membranproteine und dem umgebenden Zytokinmilieu ab. Eine Aktivierung der Zellen resultiert in der gesteigerten Expression des Membranproteins CD69. Sollte die Anhäufung der Tregs im Tumorgewebe und die gesteigerte Expression von TGF-ß und IL-10 Auswirkungen auf die Effektorfunktionen der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben, könnte sich dies auf den Aktivierungsstatus (CD69– Expression) der Zellen im Gewebe auswirken.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden immunhistologische Färbungen an 9 Tumor- und Kontrollgeweben durchgeführt. Hierbei wurden CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen fluoreszenz-gefärbt. Zur Detektion einer potenziellen Aktivierung wurde zusätzlich mit anti-CD69 Antikörper gefärbt. Die Kolokalisierung von CD8 und CD69 auf der Membran identifiziert die jüngere Aktivierung der Zelle (Abbildung 4.37.A).

Die Analysen basierten auf den zuvor gezeigten prozentualen Anteilen der CD4+CD25+ Population an der CD4+ Population im Tumor- und Kontrollgewebe (Abbildung 4.33). Von den gleichen Donoren wurden erneut Kryoschnitte angefertigt und gefärbt (3 pro Donor). Diese wurden auf die Koexpression von CD8 und CD69 ausgewertet.



**Abbildung 4.37**: Der Aktivierungsstatus von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T–Zellen in Tumor– und Kontrollgewebe (n=9). **A** zeigt eine typische Koexpression von CD8 und CD69 nach jüngst erfolgter Aktivierung (640x). **B** zeigt den Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen an der CD4<sup>+</sup> Population. In der Abbildung sind die Donoren, welche einen hohen Aktivierungstatus von CD8<sup>+</sup> T–Zellen hatten (>30% von der CD8<sup>+</sup> Population zeigten CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Phänotyp) mit einem Kreis markiert. Hell unterlegt sind die Donoren mit hohem Treg–Anteil; dunkel unterlegt sind die Donoren mit niedrigem Treg–Anteil. **C** zeigt das Verhältnis der Donoren mit hohem Aktivierungsstatus (gelber Kreissektor) bei niedriger (dunkel unterlegt) und hoher (hell unterlegt) Treg Infiltration.

So konnte eine Korrelation des CD8+ T-Zell Aktivierungsstatuses mit der Zahl der infiltrierten Tregs aufgestellt werden.

Zusammengefasst zeigen die Resultate, dass die Zahl der infiltrierenden CD8<sup>+</sup> T–Zellen sich zwischen Tumor– und Kontrollgewebe nicht unterschied. Die Donoren wurden anhand des Anteils der infiltrierten Tregs (>35% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> von CD4<sup>+</sup> und <35% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> von CD4<sup>+</sup>) in zwei Gruppen getrennt. Ein hoher Aktivierungsstatus der CD8<sup>+</sup> T–Zellen wurde angenommen, wenn über 30% der CD8<sup>+</sup> T–Zellen im Gewebe eine CD69 Expression zeigten. Die Auswertung der Färbungen verdeutlichte einen hohen Aktivierungsstatus der CD8<sup>+</sup> T–Zellen in Donoren mit geringer Treg Infiltration und umgekehrt, einen niedrigen Aktivierungsstatus in Donoren mit hoher Treg Infiltration (Abbildung 4.37.C).

Die Ergebnisse sprachen für eine erhöhte selektive Infiltration der Tregs in das Tumorgewebe und bewiesen zudem eine inverse Korrelation zwischen der Treg-Anzahl und dem Aktivierungsstatus der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese impliziert eine erniedrigte Funktionalität zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Treg-infiltriertem Tumorgewebe.

#### 4.12 Das CAM-Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Populationen in Tumor- und Kontrolldonoren

Das CAM-Expresssionsmuster der Tregs könnte dafür verantwortlich sein, dass es durch erhöhte Interaktion mit dem Tumorendothel zu einer Anreicherung der Tregs im Tumorgewebe kommt. Diese Interaktionsverstärkung könnte teilweise durch die Expressionssteigerung der CAMs auf Tumorendothel vermittelt werden.

#### 4.12.1 Das Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Populationen im Kontrolldonor

Zunächst wurden die CAM-Expressionsniveaus im peripheren Blut und im Pankreasgewebe von nicht-Tumordonoren bestimmt.

Diese Gewebe entstammen aus den peripheren Bereichen des Primärtumors und sind mikroskopisch frei von Tumorzellen. Die Stärke und der Vergleich der Expressionsstärken zwischen peripherem Blut und dem Gewebe ist in Abbildung 4.38 dargestellt.

Die Analyse zeigte hohe Expressionsraten von PSGL, CD62L, LFA-1 und CD6 in der CD4+CD25+- und der CD4+CD25-Population im peripheren Blut (>85% der Subpopulationen exprimieren diese CAMs). Mittlere Expressionshäufigkeiten zeigten ß-1 Integrin (50%-82% Koexpression) und CD24 (48%-51% Koexpression), während ß-7 Integrin, CD56 und CD166 von nur sehr wenigen Zellen im Blut der nicht-Tumordonoren exprimiert wurden (< 30% der Subpopulationen). Hierbei waren beide gemessenen Integrine auf CD4+CD25+- Zellen signifikant stärker exprimiert als auf CD4+CD25--Zellen. Ansonsten zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen.

Die Analyse der Expressionsraten im Gewebe der Kontrolldonoren zeigte differentielle Expressionsstärken zwischen den Subpopulationen. Im Blut zeigten sich die Expressionsstärken von 3 der 9 CAMs als signifikant verändert, während es im Gewebe 7 von 9 waren. Für die CD4+CD25-- Population wurde eine erhöhte Expression beider Integrine im Gewebe im Vergleich zum Blut deutlich. Die Expressionen der Selektine und ihrer Liganden waren auf der CD4+CD25--Population im Gewebe stark erniedrigt. Ebenso zeigten die Proteine der Ig-Superfamilie, bis auf CD166, schwächere Expression auf der gewebsresidenten CD4+CD25-Population. CD166 wurde, wie die Integrine, im Gewebe wesentlich stärker exprimiert als im Blut.



**Abbildung 4.38**: Das CAM-Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Population im peripheren Blut und im Gewebe von Kontrolldonoren (n=3-6) in der FACS-Analyse. Die Blutproben wurden über einen Gradienten aufgereinigt, die mononukleären Zellen isoliert und die Zellen gefärbt. Die Gewebe wurden mittels mechanischer Dissoziation zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet (etwa 4-6h nach der Resektion) und danach gefärbt. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Im Vergleich zur CD4+CD25+-Population im Blut zeigte die CD4+CD25+-Population im Gewebe für alle gemessenen CAMs höhere Expressionsstärken (bis auf CD24 werden alle CAMs von >90% der Zellen exprimiert).

Zusammenfassend fiel die sehr hohe Expression der CAMs auf der CD4+CD25+-Population im Kontrollgewebe auf (7 von 9 waren signifikant erhöht). Die einzige Ausnahme war hierbei CD24. Im peripheren Blut zeigten nur die Integrine und CD62L signifikant höhere Expression auf CD4+CD25+-Zellen im Vergleich zu CD4+CD25-Zellen (3 von 9).

Diese Expressionsmuster mussten, um einen Vergleich zu ermöglichen, in Tumor- und Kontrolldonoren gemessen werden. Der Vergleich sollte eine eventuelle Anpassung der Subpopulationen an das Tumormilieu anhand ihres Expressionsmusters verdeutlichen.

#### 4.12.2 Das Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Populationen im Tumordonor

Das Expressionsmuster der Subpopulationen im Tumordonor ist in Abbildung 4.39 dargestellt. Die Expressionsraten im Blut waren vor allem für ß–1 Integrin, PSGL, CD62L, LFA–1 und CD6 besonders hoch (> 80% der Subpopulationen exprimierten diese CAMs). Wie im Blut der Kontrolldonoren zeigte sich auch im Tumordonorblut eine mittlere Koexpression von CD24 und niedrige Koexpression von ß–7 Integrin, CD56 und CD166. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expressionsraten der CD4+CD25+– und der CD4+CD25––Populationen.

Der Vergleich dieser Expressionsmuster Expressionsniveau zum im Tumorgewebe zeigte differentielle Unterschiede zwischen den Subpopulationen. Dabei zeigten die CD4+CD25+-Zellen im Tumorgewebe signifikant höhere Expressionen von CD166, CD24 und CD62L als die CD4+CD25--Zellen im Tumorgewebe. Die CD62L Expression war jedoch niedriger als im Blut, während die Expression von ß-7 Integrin, CD56 und CD166 im Gewebe höher war. Dies gilt vor allem für die CD4+CD25+-Zellen.



**Abbildung 4.39:** Das CAM-Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Population im peripheren Blut und im Gewebe von Tumordonoren (n=3-6) in der FACS-Analyse. Die Blutproben wurden über einen Gradienten aufgereinigt, die mononukleären Zellen isoliert und die Zellen gefärbt. Die Gewebe wurden mittels mechanischer Dissoziation zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet (etwa 4-6h nach der Resektion) und danach gefärbt. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Beide Expressionsmuster, in Tumor- und Kontrolldonoren, zeigten eindeutige Änderungen der Expressionsstärken von CD4+CD25+-Zellen und CD4+CD25--Zellen nach der Infiltration in das Gewebe. Dabei unterschieden sich die Expressionsstärken zwischen Tumor- und Kontrollgewebe am stärksten. Abbildung 4.40 zeigt den direkten Vergleich der Expressionsmuster von CD4+CD25+-Zellen und CD4+CD25--Zellen in Tumor- und Kontrollgewebe.

#### 4.12.3 Das Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Populationen im Tumor- und Kontrolldonorgewebe

Da die Expessionsmuster der beiden Subpopulationen sich im peripheren Blut kaum unterschieden, war der Vergleich der Expressionsmuster im Gewebe der Donoren von besonderer Bedeutung. Die Identifizierung von CAMs, welche für die Anreicherung der Tregs im Tumorgewebe verantworlich sein können, sollte über den Vergleich der Expressionsmuster gewährleistet werden (Abbildung 4.40). Der Vergleich der Subpopulationen zwischen Tumor- und Kontrollgewebe zeigte, das ß-1 Integrin, PSGL, sowie LFA-1 Tumormikromilieu unbeeinflusst von dem durch stetig hohe Expressionsniveaus auffielen. Im Kontrollgewebe waren alle Expressionsraten der CD4+CD25+-Zellen höher, als die der CD4+CD25--Zellen. Dabei unterschieden sich 6 von 9 Expressionsstärken signifikant voneinander (B-7 Integrin, CD24, CD62L, CD6, CD56 und CD166). Im Tumorgewebe lagen 8 von 9 Expressionsstärken der CD4+CD25+-Zellen höher, als die der CD4+CD25--Zellen. Davon unterschieden sich 3 von 9 signifikant (CD24, CD62L und CD166).



**Abbildung 4.40**: Das CAM-Expressionsmuster der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Population im Gewebe von Tumor- und Kontrolldonoren (n=3-6) in der FACS-Analyse. Die Gewebe wurden mittels mechanischer Dissoziation zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet (etwa 4-6h nach der Resektion) und danach gefärbt. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Die CD4+CD25+-Zellen im Kontrollgewebe zeigten höhere Expressionsstärken als die CD4+CD25+-Zellen im Tumorgewebe. Im Tumorgewebe exprimierten jedoch 75% der CD4+CD25+–Zellen FoxP<sub>3</sub>, während im Kontrollgewebe nur 52% FoxP<sub>3</sub> exprimierten. Somit war der direkte Vergleich der Expressionsstärken zwischen Tumorund Kontrollgewebe nicht möglich. Zusammenfassend exprimierte das Tumorendothel im Vergleich zum Kontrollendothel signifikant höhere Mengen an ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1, sowie CD166 (Abbildung 4.9). Dabei wurden die jeweiligen Bindungspartner LFA-1, ß-1 und ß-7 Integrin, sowie CD166 von den Tregs exprimiert. Die Expression von CD166 war auf den Tregs im Tumorgewebe signifikant erhöht (Abbildung 4.40).

#### 4.13 Die Adhäsionskapazität der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Zellen an Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel *in vitro*

Um die Adhäsionskapazität der CD4+CD25+- und der CD4+CD25--Zellen zu testen, wurde eine dreidimensionale Zellkultivierungsmethode etabliert. Die Kultivierung der Endothelzellen in einem dreidimensionalen Testsystem hat den Vorteil, die physiologischen Bedingungen im Blutgefäß besser zu imitieren. Für die Generation einer dreidimensionalen Endothelzell-Kultur wurden je 30000 Endothelzellen in hochviskosem ECB-Medium in nichtadhäsiven Zellkulturplatten kultiviert. Da die Zellen keinen adhäsiven Untergrund vorfinden, adhärieren sie nach und nach aneinander. Nach etwa 48h haben die Einzelzellen ein Spheroid gebildet, der mit einer Größe von etwa 0,5mm mit dem bloßen Auge sichtbar ist. Diese Spheroide können in ECB-Medium über mehrere Tage kultiviert werden.

Für die Versuchsansätze wurden Tumor- und Kontrollgewebe eines Donors mechanisch dissoziiert. Die so erhaltenen Einzelzellsuspensionen wurden durch Zellfilter gegeben und die Endothelzellen wurden darauffolgend mittels CD31–Isolierungsantikörper immunomagnetisch aufgereinigt. Während der in vitro Expansionskultivierung der Endothelzellen wurden von den selben diesen Donoren Blutproben entnommen. Aus wurden nach der Standardprozedur mononukleäre Zellen aufgereinigt. Durch eine Isolation aller CD4+ T-Zellen wurden die T-Helfer-Zellen aufgereinigt. Aus dieser Zellpopulation wiederum wurden die CD4+CD25+ T-Zellen aufgereinigt, so dass nach allen Isolationsschritten zwei Zellpopulationen gewonnen werden konnten: die CD4+CD25- Population und die CD4+CD25+ Population. Diese

autologen T-Zellpopulationen wurden mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert (CD4+CD25- in blau und CD4+CD25+ in grün).

Nach der Expansionskultur der Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollgewebe eines Donors (2d-4d) wurden zwei unterschiedliche Spheroide (Tumorendothel- und Kontrollendothel-Spheroid) aus jeweils 30000 Einzelzellen generiert (Abbildung 4.41).



**Abbildung 4.41**: Generierung der Endothelzellspheroide am Beispiel eines Tumorendothel-Spheroids. **A** zeigt die gegenseitige Anlagerung einzelner Endothelzellen *in vitro*, bis aus 30000 Einzelzellen nach 48h ein stabiles Endothelspheroid entstanden war (40x). Durch Kryoschnitte konnte kontrolliert werden, ob die Endothelzellen einen dichten Spheroidmantel gebildet hatten. Dabei musste das Spheroid eine dichte Oberfläche ausbilden (**B**; 480x), um eine reproduzierbare Adhäsionsfähigkeit zu ermöglichen. In **C** sind die Zell-Zellkontakte einzelner Endothelzellen an der Spheroidoberfläche zu sehen (640x).

Diese bildeten einen Mantel aus einer Endothelzellschicht, deren Einzelzellen durch Zell-Zellkontakte stabil miteinander in Verbindung standen. Darauffolgend wurde ein Tumorendothel-Spheroid und ein Kontrollendothel-Spheroid in Kokultur gebracht. Gleichzeitig wurden gleiche Zahlen (je 20000 Zellen) der fluorochrom-markierten CD4+CD25- Population und der CD4+CD25+ Population in Kokultur gebracht. Nach 4h wurden die Spheroidoberflächen gewaschen, um nicht-adhärierende Zellen zu verlieren. Danach konnte mikroskopisch festgestellt werden, wie viele der jeweilig markierten Zellen unter gleichen Bedingungen an das Tumorendothelund/oder an das Kontrollendothel-Spheroid gebunden hatten. Die Auswertung dieser Versuche ist in Abbildung 4.42 dargestellt.



Abbildung 4.42: Die Spheroid/T-Zell-Kokultur zur Bestimmung der Ahäsionskapazität von CD4+CD25+- und CD4+CD25--T-Zellen. Jeweils ein Spheroid aus Tumor- und Kontrollendothelzellen wurde in Kokultur gebracht. Anschließend wurden für 4h gleiche Mengen (20000 Zellen) an fluorochrom-gekoppelten T-Zell Subpopulationen (CD4+CD25+- in grün und CD4+CD25--T-Zellen in blau) in die Kultur zugegeben. A zeigt die beiden Spheroide mit den jeweilig adhärenten Zellen der beiden Subpopulationen (100x).  $\rightarrow$  CD4+CD25+-Zellen;  $\rightarrow$  CD4+CD25-Zellen. Um die adhärenten Zellen auszuzählen, wurden die Spheroide nach 4h gewaschen und mikroskopisch ausgewertet. B zeigt die Vergrößerung des Bildausschnitts in A (480x). In C sind die Ergebnisse von sechs unabhängigen Ansätzen dargestellt. Jeder Messpunkt gibt den Anteil der T-Zellsubpopulation an, die autologes Tumor- und/oder Kontrollendothel gebunden hatte. Dabei hatten die CD4+CD25+ T-Zellen selektiv stärker an die autologen Tumorendothelspheroide als an das Kontrollendothel gebunden, was eine höhere Interaktionsfähigkeit mit dem Tumorendothel implizierte. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Die Versuche aus Abbildung 4.42 zeigten, dass von den Populationen der CD4+CD25- T-Zellen etwa 0,5%-2,1% nach 4h an das Tumor- und Kontrollendothel gebunden hatten. Dabei banden die CD25- T-Zellen zu gleichen Anteilen Tumor- und Kontrollendothel. Im Vergleich dazu zeigten die CD4+CD25+ T-Zellen 0,7%-1,4% Bindungsanteile an Kontrollendothel und unterschieden sich somit nicht von den CD25- T-Zellen. Die Bindung an Tumorendothel war jedoch ungleich größer und lag bei den 6 gemessenen Donoren zwischen 3,6%-7,6%. Die Mittelwerte der CD4+CD25+ Zellzahl, die an Tumor- und Kontrollendothel band, unterschied sich um mindestens das 4-fache.

Diese Resultate belegen eine selektiv erhöhte Adhäsion der CD4+CD25+ T-Zellen an das autologe Tumorendothel *in vitro*.

# 4.14 Die Transmigrationskapazität der T-Zellen durch Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel *in vitro*

Um festzustellen ob die erhöhte Adhäsionskapazität der Tregs an Tumorendothel in einer erhöhten Transmigration durch Tumorendothel resultierte. wurden Transmigrationstests etabliert. Hierzu wurden Endothelzellen Tumor- und Kontrollpankreasgeweben nach aus der beschriebenen Methode immunomagnetisch aufgereinigt und 7–14d expandiert. Autologe T-Zellen wurden aus Blutproben der selben Donoren aufgereinigt und kultiviert. Anschließend wurden die Endothelzellen auf Transmigrationsmembranen mit einer Porengröße von 3µm bis zur Konfluenz (2-3d) kultiviert. Nachdem die Konfluenz des Endothelzell-Monolayers überprüft wurde, konnten die jeweilig zu testenden T-Zellpopulationen in die Transmigrationskammern gegeben werden. Als physiologisch wirksames chemoattraktives Molekül wurde SDF-1 (100ng/ml) in die untere Kammer hinzugefügt (Abbildung 4.43). Die Anzahl der transmigrierten Zellen wurde die nach 24h computerunterstützt quantifiziert. Um basale Transmigrationskapazität verschiedener T-Zell Subpopulationen miteinander vergleichen zu können, wurden in verschiedenen Ansätzen CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4+, sowie CD4+CD25- und CD4+CD25+ Subpopulationen getestet. Um die physiologischen Bedingungen des Tumormikromilieus zu imitieren, wurden die Tumorendothelzellen vor den Tests mit autologem Tumor-Lysat (50µg/ml) kultiviert. Als Kontrollen hierzu dienten Kontrollendothelzellen, die mit autologem PBMZ-Lysat kultiviert wurden.



**Abbildung 4.43**: Der Transmigrationstest am Beispiel von der CD4+CD25+- und CD4+CD25--T-Zell Migration. Die Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollgeweben wurden isoliert und auf den Transmigrationsmembranen (3µm Porengröße) ausgesät (30000) und bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Imitation der physiologischen Bedingungen im Tumorgewebe wurden Tumorendothelzellen mit autologem Tumor-Lysat kultiviert. Als Kontrolle dienten Kontrollendothelzellen, welche mit PBMZ-Lysat kultiviert wurden. Zwischenzeitlich wurden verschiedene autologe T-Zell Populationen aus den Blutproben der selben Donoren isoliert und im Test eingesetzt. Als chemoattraktives Molekül wurde das Medium in der unteren Kammer mit SDF-1 (100ng/ml) versetzt. Nach 24h wurde die Anzahl der transmigrierten T-Zellen mit computerunterstützter Auszählung bestimmt. Die Durchführung dieser Tests sollte die Fragestellung klären, ob die Transmigrationskapazität der CD4+CD25+ T-Zellen durch autologe Tumorendothelzellen im Vergleich zum autologen Kontrollendothel erhöht wird.

#### 4.14.1 Die Transmigrationskapazität der CD3+ T-Zellen durch Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel *in vitro*

Die Untersuchungen zur Transmigrationskapazität verschiedener T-Zell Subpopulationen sollten zunächst an CD3<sup>+</sup> T–Zellen durchgeführt werden, eine basale Transmigrationskapazität festlegen zu können. um Die Abbildung 4.44 zeigt die Zusammenfassung der verschiedenen Ansätze bei 3 bis 5 Donoren. Als Kontrolle wurde in den Ansätzen jeweils auf Zugabe der T-Zellen verzichtet um festzustellen, wie hoch die Transmigrationkapazität der Endothelzellen ist. Die Transmigration der Endothelzellen war jedoch unter den gewählten Bedingungen sehr schwach (100-150 Zellen), so dass sie als vernachlässigbar zu werten war. Nun sollte getestet werden, ob T-Zellen, die in vitro unspezifisch mit CD3/CD28 Antikörpern stimuliert wurden, stärker transmigrieren, als unstimulierte T-Zellen aus dem peripheren Blut der Donoren. Dabei zeigten unstimulierte T-Zellen eine

etwas stärkere Transmigration durch unstimuliertes Tumorendothel (1286+-117 Zellen) als durch unstimuliertes Kontrollendothel (983+-153). Die Differenz der Ergebnisse war jedoch nicht signifikant. Wurden im gleichen Bezugssystem stimulierte T-Zellen eingesetzt, so stieg im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen die Transmigrationsrate um 60%-70%. Dabei transmigrierten stimulierte T-Zellen signifikant stärker durch das Tumor-Lysat behandelte Tumorendothel (2050+-290) als durch das PBMZ-Lysat behandelte Kontrollendothel (1571+-94). Wurden zusätzlich zu den T-Zellen noch die Endothelzellen mit TNF-alpha (100U/ml) stimuliert, so stieg die Transmigration auf 4199+-268 Zellen durch das ansonsten unbehandelte Kontrollendothel und auf 5180+-260 durch das Tumorendothel.



**Abbildung 4.44**: Die *in vitro* Transmigration von jeweils 30000 CD3<sup>+</sup> T–Zellen durch Tumorund Kontrollendothel. Die T–Zellen wurden für die Transmigration entweder unstimuliert eingesetzt, oder wurden über einen Zeitraum von 48h unspezifisch mit CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. In verschiedenen Ansätzen wurde die Transmigration durch Tumorund Kontrollendothel, welches unstimuliert, oder mit TNF–alpha, PBMZ–Lysat, oder Tumor-Lysat stimuliert war, getestet. Dabei zeigten alle Ansätze eine höhere Transmigration der T– Zellen durch Tumorendothel. n=3–5. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Die Transmigration der unstimulierten T-Zellen durch stimuliertes Endothel war höher als durch unstimuliertes Endothel, wurde aber noch durch die gleichzeitige Stimulation der T-Zellen gesteigert. In allen drei Fällen war die Transmigration durch das Tumorendothel signifikant höher als durch Kontrollendothel. Die Stimulation des Endothels mit TNF-alpha sorgt also für eine Erhöhung der Transmigrationszahlen. Nun sollte in vitro getestet werden, wie sich die Transmigrationskapazität der T–Zellen bei der Transmigration durch PBMZ-Lysat stimuliertes Kontrollendothel im Vergleich zu Tumor-Lysat stimuliertem Tumorendothel verhält. Hierbei zeigten sich große Unterschiede bei der Transmigration durch die jeweiligen Endothelentitäten. Im Vergleich zur Transmigration durch PBMZ-Lysat stimuliertes Kontrollendothel (2037+-179) migrierten nahezu doppelt so viele unstimulierte T-Zellen durch Tumor-Lysat stimuliertes Tumorendothel (3891+-164). Wurden die T-Zellen erneut zusätzlich unspezifisch stimuliert, stieg die Transmigration von 2425+-217 Zellen durch Kontrollendothel auf 5661+-163 Zellen durch Tumorendothel. Zusammenfasssend lässt sich sagen, dass die unspezifische Stimulation der T-Zellen zur besseren Transmigration führte, welche durch die zusätzliche Stimulation des Endothels mit TNF-alpha oder Tumor-Lysat noch gesteigert

werden konnte. Dabei zeigten stimulierte T-Zellen, die an Tumor-Lysat stimuliertem Tumorendothel getestet wurden, die höchsten Transmigrationsraten.

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass:

- 1. Tregs sich selektiv im Tumorgewebe anreichern,
- 2. das Tumorendothel *ex vivo* eine höhere CAM-Expression aufweist als das Kontrollendothel,
- 3. die Tregs die passenden Bindungspartner zu diesen Molekülen exprimieren,
- 4. die Tregs *in vitro* eine höhere Adhäsionskapazität selektiv an Tumorendothel aufweisen und
- 5. die CD3<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* eine höhere Transmigrationskapazität durch Tumorendothel aufweisen.

Dementsprechend sollte in den Folgeexperimenten untersucht werden, welche Subpopulationen der CD3<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt durch das Tumorendothel migrieren, oder ob die verstärkte Migration sich für alle Subpopulationen gleich auswirkt.

#### 4.14.2 Die Transmigrationskapazität der CD4+ und CD8+ T-Zellen durch Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel *in vitro*

Aus den Blutproben wurden die T-Zell Subpopulationen mittels Negativ-Isolation aufgereinigt. Gleichzeitig wurden die Endothelzellen, wie zuvor beschrieben, aus den Geweben der Donoren aufgereinigt und kultiviert.

Die Transmigration durch das mit PBMZ-Lysat stimulierte Kontrollendothel zeigte für die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede, auch wenn etwas mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen migrierten. Im Kontrast dazu stand die Transmigration durch das Tumorendothel. Hier migrierten 3609+-152 CD4<sup>+</sup> T-Zellen, während nur 2009+-92 CD8<sup>+</sup> T-Zellen migrierten.



**Abbildung 4.45:** Die Transmigrationskapazität der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T–Zellen durch Tumordonor– und Kontrolldonor–Endothel. Aus den Blutproben der Donoren wurden CD3<sup>+</sup> T–Zellen nach Standardmethode aufgereinigt. Aus ihnen wurden durch Negativ–Isolation CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T–Zellen isoliert. Aus Tumor– und Kontrollgewebe der gleichen Donoren wurden die Endothelzellen isoliert, die als Monolayer auf den Transmigrationsmembranen kultiviert wurden. Zur Imitation des Tumormikromilieus wurden die Tumorendothelzellen vor der Transmigration mit autologem Tumor–Lysat stimuliert. Als Kontrolle diente Kontrollendothel, welches mit PBMZ–Lysat stimuliert wurde. Von jeder T–Zell Subpopulation wurden 30000 Zellen für den Test eingesetzt. Durch das Kontrollendothel transmigrierten etwas mehr CD8<sup>+</sup> T–Zellen, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war. Wird die Gesamtheit der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T–Zellen zugrunde gelegt, so bestand die Population der transmigrierten Zellen zu 55,6% aus CD8<sup>+</sup> T–Zellen. Im Gegensatz dazu migrierten durch das Tumorendothel wesentlich mehr CD4<sup>+</sup> T–Zellen. Der Anteil an der transmigrierten Population betrug 64,2%. n=3–5. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Diese Vergleiche zeigten, dass durch das Tumorendothel signifikant mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen migrierten als durch das Kontrollendothel (von 1379+-113 auf 2009+-92 CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Allerdings erlaubte das Tumorendothel hauptsächlich die Transmigration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Anzahl der durch das Tumorendothel transmigrierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen war im Vergleich zu der Anzahl CD8<sup>+</sup> transmigrierten Zellen signifikant erhöht. Ebenso signifikant erhöht war die Anzahl der transmigrierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen beim Vergleich zwischen Tumor- und Kontrollendothel. Die Anzahl der transmigrierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch das Tumorendothel war nahezu doppelt so hoch wie die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass das Tumorendothel *in vitro* die Transmigration von autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen begünstigte. Die erhöhte Transmigration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch das Tumorendothel war durch die erhöhte Transmigrationsfähigkeit der CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu erklären.

4.14.3 Die Transmigrationskapazität der CD4+CD25+ und CD4+CD25-T-Zellen durch Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel *in vitro* 

Nun sollte untersucht werden, ob die Transmigrationserhöhung in der CD4<sup>+</sup> Population durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen verursacht wurde. Dazu wurden Transmigrationstests, wie in Abbildung 4.43 beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.46 dargestellt.

Die Analysen zeigten, dass die Transmigrationskapazität der CD4+CD25-Populationen unabhängig von der Herkunft des Endothels bei 3300 bis 3500+-304 Zellen lag. Die CD4+CD25+ Zellen zeigten eine vergleichbare Kontrolldonor–Endothel Transmigrationskapazität durch (3154 + -108).Transmigrationskapazität Allerdings war ihre durch Tumorendothel wesentlich höher (4976+-94). Die Transmigrationsanalysen zeigten, dass der Anteil, der durch Tumorendothel transmigrierten Zellen, zu 59,9% aus der CD4+CD25+ Population Vergleich besteht. Der mit der Transmigrationskapazität durch Kontrollendothel zeigte eine um 57,8% gesteigerte Transmigration der CD4+CD25+ Zellen.

Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass das Tumorendothel eine selektive Transmigration der CD4+CD25+ Zellen *in vitro* vermittelt. Dieser Transmigrationsvorteil könnte zur Anreicherung der Zellen unterhalb der Endothelschicht, im Tumorpankreasgewebe, führen.



**Abbildung 4.46**: Die Transmigrationskapazität der CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen durch Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel. Aus den Blutproben der Donoren wurden CD3+ T-Zellen nach Standardmethode aufgereinigt. Aus ihnen wurden durch Negativ-Isolation CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen isoliert. Aus Tumor- und Kontrollgewebe der gleichen Donoren wurden die Endothelzellen isoliert, die als Monolayer auf den Transmigrationsmembranen kultiviert wurden. Zur Imitation des Tumormikromilieus wurden die Tumorendothelzellen vor der Transmigration mit autologem Tumor-Lysat stimuliert (50 $\mu$ g/ml). Als Kontrolle diente Kontrollendothel, welches mit PBMZ-Lysat (50 $\mu$ g/ml) stimuliert wurde. Von jeder T-Zell Subpopulation wurden 30000 Zellen für den Test eingesetzt. Die CD4+CD25+ T-Zellen transmigrierten signifikant stärker durch das Tumorendothel als durch das Kontrollendothel und zeigten ebenfalls signifikant höhere Transmigration als die CD4+CD25- T-Zellen. Der erste und vierte Balken gibt den Anteil der transmigrierten Subpopulationen an der Gesamtheit der transmigrierten Zellen wieder. n=3- 5. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Um hierbei sicherzustellen, dass es sich bei den transmigrierten Zellen um Tregs und nicht um aktivierte CD4+ T-Zellen handelt, wurden Zellen vor und nach der Transmigration entnommen und immunzytologisch auf ihre FoxP<sub>3</sub>-Expression gefärbt (Abbildung 4.47). Anschliessend wurde der Anteil der FoxP<sub>3</sub>+CD4+CD25+ Zellen an der CD4+CD25+ Population bestimmt. Dabei zeigte sich, dass auch nach der Transmigration der Anteil der Tregs an der CD4+CD25+ Population konstant bei etwa 70%-75% lag. Dies zeigte, dass die transmigrierten Zellen zu einem Großteil FoxP<sub>3</sub>+ exprimierten und somit als Tregs identifiziert werden konnten.



**Abbildung 4.47**: Der Anteil der FoxP<sub>3</sub>+CD4+CD25+ Zellen an der CD4+CD25+ Population vor und nach der Transmigration *in vitro*. Aus dem Transmigrationsansatz (Abbildung 4.43) wurden vor und nach der Transmigration aufgereinigte CD4+CD25+ Zellen entnommen. Die Zellen wurden anschließend auf Objektträger zentrifugiert, fixiert und immunzytologisch auf ihre FoxP<sub>3</sub>+-Expression untersucht (**A**; 640x). Darauffolgend wurde der Anteil der FoxP<sub>3</sub>+CD4+CD25+ Zellen an der CD4+CD25+ Population durch Auszählung bestimmt (**B**).

#### 4.15 Die Relevanz der CAMs bei der Treg-Transmigration durch Tumordonor- und Kontrolldonor-Endothel *in vitro*

Nun sollte getestet werden, welche CAM-Interaktionen zwischen Endothelzellen und Tregs zur selektiv erhöhten Transmigrationsfähigkeit der Tregs durch Tumorendothel führt.

Dazu wurden erweiterte Transmigrationstests durchgeführt, die, wie zuvor beschrieben, aufgebaut waren (Abbildung 4.43). In diesen Transmigrationstests sollte die Relevanz einzelner CAMs für die transendotheliale Migration der Tregs überprüft werden. Deshalb wurden in den Transmigrationsansätzen blockierende Antikörper gegen MAdCAM-1, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, CD166, B-1 Integrin, B-7 Integrin, CD62-E und CD62-P zugegeben. Mit ihnen wurde der Endothelmonolayer 4h blockiert und dann mit PBS gewaschen. Die Antikörper sollten die Interaktion der Bindungspartner auf Endothelzell- und Treg-Zellmembran sterisch verhindern. Als Negativ-Kontrolle wurden Isotyp-Antikörper eingesetzt, die Positiv-Kontrollen bestanden aus Antikörper-Mischungen, die additive Inhibitionseffekte zeigen sollten.

4.15.1 Die Relevanz der Kontrollendothel-exprimierten CAMs bei der Treg-Transmigration *in vitro* 

Die Antikörper-Blockaden an Kontrollendothel zeigten einen stärkeren Effekt auf Tregs als auf die CD4+CD25- T-Zellen. Mit Ausnahme von CD62-P und ICAM-2 zeigten alle anderen blockierenden Antikörper eine stärkere Inhibition der Treg-Transmigration durch Kontrollendothel. Die Inhibition war durch Antikörper gegen MAdCAM-1 (27% Inhibition) und VCAM-1 (21% Inhibition) am stärksten (Abbildung 4.48). Die Blockade mit ICAM-2 Antikörpern zeigte einen signifikant höheren Effekt auf Kontrollendothel, erreichte jedoch nicht mehr als 7% Inhibition und lag damit nur knapp über der Nachweisgrenze von 4,5% (Isotyp-Antikörper).



Abbildung 4.48: Die Relevanz der endothelialen CAMs, bei der *in vitro* Transmigration von durch (CD4+CD25+) und CD4+CD25-T-Zellen Kontrollendothel. Treas Die Transmigrationstests wurden nach Konfluenz der Endothelmonolayer auf den Membranen durch Zugabe der blockierenden Antikörper ergänzt (4h). Anschließend wurden die Monolayer gewaschen und nach Zugabe der T-Zellen die Transmigrationsphase (24h) gestartet. Als Negativ-Kontrolle wurden Isotyp-Antikörper eingesetzt, die Positiv-Kontrollen bestanden aus Antikörper-Mischungen, die additive Inhibitionseffekte zeigen sollten. Angegeben ist die prozentuale Inhibition der Transmigration. Dabei diente die Transmigration durch unbehandeltes Kontrollendothel als 0-Wert. n=3-4. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

Die höchste Inhibition wurde durch Blockade von MAdCAM-1 erreicht. Sie lag jedoch nicht höher als 27%. Im Vergleich zu den Positivkontrollen war die allgemeine Inhibitionsfähigkeit der Antikörper auf Kontrollendothel schwach (bis auf MAdCAM-1 und VCAM-1 immer unter 20%).

Sollte die gesteigerte Transmigration der Tregs durch tumorendotheliale CAM-Expression vermittelt sein, so müssten die blockierenden Antikörper auf Tumorendothel eine stärkere Inhibition der Treg-Transmigration hervorrufen. Um diese Hypothese zu testen, wurde derselbe Ansatz mit Tumorendothel-Monolayern durchgeführt.

#### 4.15.2 Die Relevanz der Tumorendothel-exprimierten CAMs bei der Treg-Transmigration *in vitro*

Anhand von *ex vivo* Untersuchungen konnte zuvor gezeigt werden, dass einzelne CAMs auf Tumorendothel im Vergleich zu Endothelzellen aus Kontrollgeweben hochreguliert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion mit diesen CAMs, selektiv zu einer verstärkten Infiltration von Tregs oder von CD4+CD25- T-Zellen führt.

Die Blockade der tumorendothelialen CAMs resultierte in einer starken Transmigrationsinhibition der Tregs. 8 von 9 CAM-Blockaden wirkten sich stärker auf die Tregs, als auf die CD4+CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus, davon waren 4 Blockaden signifikant stärker (CD62-E, MAdCAM-1, VCAM-1 und CD166). Die blockierenden Antikörper gegen diese CAMs verursachten auch gleichzeitig die stärksten Transmigrations-Inhibitionen der Tregs (28%-50%). CD4+CD25<sup>-</sup> T-Zellen zeigten mit Ausnahme des VCAM-1 Antikörpers (25,5%) schwache Inhibierungen mit unter 20%. Die starke Transmigrationsblockade durch Antikörper gegen CD62-E, MAdCAM-1, VCAM-1 und CD166, spricht für die besondere Bedeutung dieser Moleküle bei der Transmigration von Tregs. Da diese Moleküle nach der Blockade mit Antikörpern aber nur schwache Effekte auf die CD4+CD25<sup>-</sup> T-Zell Migration zeigten, ist anzunehmen, dass sie selektiv für die Treg-Transmigration durch Tumorendothel essentiell sind.



Blockierende Antikörper

Abbildung 4.49: Die Relevanz der endothelialen CAMs bei der *in vitro* Transmigration von Treas (CD4+CD25+) und CD4+CD25-T-Zellen durch Tumorendothel. Die Transmigrationstests wurden nach Konfluenz der Endothelmonolayer auf den Membranen durch Zugabe der blockierenden Antikörper ergänzt (4h). Anschließend wurden die Monolayer gewaschen und nach Zugabe der T-Zellen wurde die Transmigrationsphase (24h) gestartet. Als Negativ-Kontrolle wurden Isotyp-Antikörper eingesetzt, die Positiv-Kontrollen bestanden aus Antikörper-Mischungen, die additive Inhibitionseffekte zeigen sollten. Angegeben ist die prozentuale Inhibition der Transmigration. Dabei diente die Transmigration durch unbehandeltes Tumorendothel als 0-Wert. n=3-4. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

4.15.3 Der Vergleich CAM-vermittelter transendothelialer Migration von Tregs und CD4+CD25- T-Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel

CD62-E, MAdCAM-1, VCAM-1 und CD166 zeigten nach Blockade signifikant erniedrigte tumorendotheliale Transmigrationskapazität der Tregs gegenüber den CD4+CD25- T-Zellen. Der Vergleich mit der kontrollendothelialen Transmigrationskapazität der Tregs zeigte ebenfalls signifikant schwächere Transmigration durch Tumorendothel. Die bisherigen Ergebnisse sprechen für eine Bedeutung dieser Moleküle für die tumorselektive Infiltration der Tregs. Dabei wäre die Interaktion dieser Moleküle mit ihren jeweiligen Bindungspartnern auf T-Zellen notwendig. Neben anderen potenziellen Bindungspartnern der endothelialen CAMs CD62-E, MAdCAM-1, VCAM-1 und CD166 sind auf T-Zellseite CD62L, für CD62-E und MAdCAM-1, ß-7 Integrin und CD62L für MAdCAM-1, sowie ß-7 Integrin für VCAM-1 und CD166 für CD166 Bindung verantwortlich.



**Abbildung 4.50**: Die Relevanz der endothelialen CAMs, bei der Transmigration von Tregs (CD4+CD25+) und CD4+CD25- T-Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel im Vergleich. Die Transmigrationstests wurden nach Konfluenz der Endothelmonolayer auf den Membranen durch Zugabe der blockierenden Antikörper ergänzt (4h). Anschließend wurden die Monolayer gewaschen und nach Zugabe der T-Zellen wurde die Transmigrationsphase (24h) gestartet. Angegeben ist die prozentuale Inhibition der Transmigration. Dabei dient die Transmigration durch unbehandeltes Tumor- oder Kontrollendothel als 0-Wert. n=3-4. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

#### 4.15.4 Die Relevanz der Treg-exprimierten CAMs bei der Transmigration durch Tumor- und Kontrollendothel *in vitro*

Um festzustellen, ob die Bindungspartner der endothelialen CAMs auf T-Zellseite ebenfalls starke Inhibitionseffekte auf die Transmigrationskapazität zeigen, wurden nun in weiteren Ansätzen Tregs und CD4+CD25- T-Zellen mit blockierenden Antikörpern gegen die jeweiligen Bindungspartner CD166, CD62L und ß-7 Integrin behandelt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser Transmigrationsblockaden *in vitro* sind in Abbildung 4.51 dargestellt. Interessanterweise zeigten die Antikörperblockaden auf Tregs und CD4+CD25- T-Zellen nur schwache Effekte bei der Transmigration durch Kontrollendothel. Die Inhibition lag hierbei jeweils unter 20%. Mit über 15%- 20% Inhibition liess sich die Treg-, wie auch die CD4+CD25- T-Zell Migration am besten durch anti-CD166 Antikörper blockieren. Die Subpopulationen unterschieden sich hierbei nicht signifikant voneinander, was auch für die Blockade mit anti-B-7 Integrin Antikörper galt. Die schwächste Inhibitionsfähigkeit zeigte der anti-CD62L Antikörper (3%-12,3%). Allerdings unterschieden sich bei der CD62L Blockade die Transmigrationskapazitäten signifikant zwischen Tregs und CD4+CD25- T-Zellen.

Der Vergleich mit den Blockaden der tumorendothelialen Transmigration, zeigt eine verstärkte Inhibition in allen drei Fällen. Alle drei Blockaden zeigten signifikant stärkere inhibitorische Effekte auf Tregs als auf CD4+CD25- T-Zellen. Dabei lag die prozentuale Inhibition zwischen 26% (CD62L) und 41% (CD166), während sie für CD4+CD25- T-Zellen zwischen 9% (CD62L) und 30% (ß-7 Integrin) lag.



**Abbildung 4.51**: Die Relevanz T–Zell exprimierter CAMs, bei der Transmigration von Tregs (CD4+CD25+) und CD4+CD25- T–Zellen durch Tumor– und Kontrollendothel im Vergleich. Die Transmigrationstests wurden durch Zugabe blockierender Antikörper zu den T–Zell Subpopulationen ergänzt (4h). Anschließend wurden die Subpopulationen gewaschen und nach Zugabe der T–Zellen in die Testanordnung, wurde die Transmigrationsphase (24h) gestartet. Angegeben ist die prozentuale Inhibition der Transmigration. Dabei dient die Transmigration von Isotyp–behandelten Subpopulationen durch entweder Tumor– oder Kontrollendothel als 0–Wert. n=4–6. Signifikanzniveau: \*p<0,1; \*\*p<0,05.

Die Blockaden der tumorendothelialen Transmigration unterschied sich ebenfalls signifikant von den Transmigrationen durch Kontrollendothel.

#### 4.16 Das NOD-SCID *in vivo* Kammer-Mausmodell

Da aus den Transmigrationstests *in vitro* deutlich hervorging, dass das Tumorendothel die selektive Transmigration der Tregs fördert, sollte getestet werden, ob autologe Tregs in vivo ebenfalls eine stärkere Infiltration in ein von Tumorendothel abgegrenztes peripheres Kompartiment zeigten. Das periphere Kompartiment sollte der räumlichen Imitation eines Tumorgewebes dienen. Dazu wurde ein Transmigrations-Kammersystem genutzt, welches Arbeitsgruppe entwickelt wurde. Dieses in von unserer vivo Transmigrationssystem besteht aus einer Kammer, die bis auf eine Transmigrationsmembran an der Unterseite von allen anderen Seiten aus unzugänglich für Zellen ist (Abbildung 4.52).



Abbildung 4.52: Das NOD-SCID *in vivo* Kammer-Mausmodell. A In die Flanke einer NOD-SCID Maus (5-6 Wochen alt), wurden zwei Kammern i.p. implantiert. Die Kammern sind bis auf eine Transmigrationsmembran (3µm Porengröße) von der Umwelt abgeschlossen. *In vitro* wurden Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollgewebe aufgereinigt und bis zur Konfluenz auf den Membranen in der Kammer kultiviert (**B**), so das Zellen nur durch Interaktion mit dem jeweiligen Endothel infiltrieren können. Anschließend wurde die Oberseite der Kammer mit Hilfe eines Gummi-Deckels abgeschlossen. Die Kammern (Tumorendothel- beschichtet und Kontrollendothel- beschichtet) konnten anschließend i.p. implantiert werden. Nach 7 Tagen waren sie ausreichend vaskularisiert (**A**). Nun wurden in die Schwanzvene der Tiere i.v. T-Zell Subpopulationen injiziert, welche nach 2-4d anteilig in den jeweiligen Kammern wiedergefunden werden konnten. Dazu wurden die Tiere 9-11d nach der Implantation geopfert. Als Kontrollen wurden die Kammern entweder nicht mit Endothelzellen beschichtet oder es wurden keine T-Zellen injiziert.

Die Transmigrationsmembran besitzt eine Porengröße von 3µm. Auf dieser Membran konnten jeweils Tumor- oder Kontrollendothelzellen bis zur Konfluenz *in vitro* kultiviert werden. Zur Imitation des Tumormilieus, wurden auch hierbei autologe Tumor-Lysate und zur Kontrolle autologe PBMZ-Lysate zum Medium gemischt (50µg/ml). Nachdem die Konfluenz und damit die Barrierefunktion der Endothelzellen mikroskopisch bestätigt werden konnte, wurde die Oberseite der Kammer mit einem Gummi-Deckel verschlossen. Anschließend wurde jeweils eine mit Tumorendothel und eine mit Kontrollendothel beschichtete Kammer i.p. in eine Flanke einer NOD-SCID Maus implantiert. Nach sieben Tagen waren die Kammern ausreichend vaskularisiert und an das murine Gefäßsystem angeschlossen. Nun wurden aufgereinigte Zellpopulationen i.v. in die Schwanzvene der Maus injiziert. Diese Zellen konnten nach 2-4d in den jeweiligen Kammern wiedergefunden und guantifiziert werden. Dabei konnte ein direkter Vergleich zwischen mit Tumor- und Kontrollendothel beschichteten Kammern stattfinden, da beide Kammern etwa gleichstark vaskularisiert werden.

## 4.16.1 Die Transmigration von CD3+ T-Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel *in vivo*

Zunächst sollte, wie bei den in vitro Versuchen, untersucht werden, ob CD3+ unterschiedlich stark durch Tumorund Kontrollendothel T–Zellen transmigrieren. Dazu wurde von einem einzelnen Donoren nicht nur Endothelzellen aus dem Tumor- und Kontrollgewebe, sondern aus Blutproben des gleichen Donors auch die T-Zellen aufgereinigt. Die Endothelzellen aus Tumor- und Kontrollgewebe wurden bis zur Konfluenz auf den Kammermembranen kultiviert. Später wurden diese dann wie beschrieben implantiert. 7 Tage nach der Implantation wurden die inzwischen aufgereinigten CD3+ T-Zellen aus dem peripheren Blut der Donoren i.v. injiziert. Nach 2d wurden die infiltrierten CD3<sup>+</sup> T–Zellen jeder Kammer ausgezählt und die Zahlen verglichen (Abbildung 4.53). Die erfolgte durch Zellentnahme Auszählung aus den Kammern und immunzytologischer Färbung nach Zentrifugation auf einen Objektträger. Jeder Ansatz wurde mit mindestens 4 Einzeltieren durchgeführt.

Die Abbildung 4.53 verdeutlicht, dass die Infiltration in Kammern die nicht mit Endothel beschichtet waren, bei etwa 7000-8000 CD3+ T-Zellen lag. Dies entspricht etwa 0,75% der injizierten Zellzahl. Dabei war die Zahl infiltrierender muriner nicht-CD3<sup>+</sup> T-Zellen vernachlässigbar gering (etwa 100-200 Zellen). Die Ansätze zeigen, wie schon *in vitro*, eine hohe Transmigration der CD3<sup>+</sup> T-Zellen durch unbehandeltes Tumorendothel (2500 CD3<sup>+</sup> T-Zellen). Dabei war die Transmigration durch unbehandeltes Kontrollendothel wesentlich geringer (1550 CD3<sup>+</sup> T-Zellen). Wurden die Endothelzellen vor der Kammer-Implantation *in vitro* mit Tumor- und PBMZ-Lysat vorbehandelt, so stieg die Zahl der infiltrierenden Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel leicht an (Tumorendothel: von 2500 auf 3400 Zellen; Kontrollendothel: von 1550 auf 1910 Zellen) und die Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollendothel wurden noch größer.



**Abbildung 4.53**: Die Transmigrationskapazität von CD3<sup>+</sup> T–Zellen durch Tumor– und Kontrollendothel *in vivo*. Tumor– und Kontrollendothel beschichtete Kammern wurden ohne oder mit Lysaten aus autologem Tumor– oder Kontrollgewebe kultiviert und i.p. in die Flanke der NOD–SCID Mäuse implantiert. Danach wurden sie 7d vaskularisiert. Dann wurden autologe CD3<sup>+</sup> T–Zellen (10<sup>6</sup>) i.v. injiziert. Nach 2d wurden die Tiere geopfert und die Kammer infiltrierenden T–Zellen in den jeweiligen Ansätzen ausgezählt. Die Auszählung erfolgte durch Zellentnahme aus den Kammern und immunzytologischer Färbung, nach Zentrifugation auf einen Objektträger. Dabei wurden die gezeigten Ansätze mit mindestens 4 Einzeltieren durchgeführt. Dargestellt sind hier die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikanzniveau:\*\*p<0,05.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der *in vitro* Transmigrationstests bestätigt werden. Auch in den *in vivo* Ansätzen zeigten die CD3<sup>+</sup> T-Zellen selektiv höhere Transmigrationskapazität durch autologes Tumorendothel. In weiteren Ansätzen sollte nun getestet werden, ob die differentielle Transmigration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die *in vitro* beobachtet werden konnte, auch *in vivo* reproduzierbar ist.

#### 4.16.2 Die Transmigration von CD4+ und CD8+ T-Zellen durch Tumorund Kontrollendothel *in vivo*

Die Abbildung 4.45 zeigt, das CD4+ T-Zellen selektiv verstärkt durch Tumorendothel *in vivo* migrieren



**Abbildung 4.54**: Die Transmigrationskapazität von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T–Zellen durch Tumorund Kontrollendothel *in vivo*. Tumor– und Kontrollendothel beschichtete Kammern wurden ohne oder mit Lysaten aus autologem Tumor– oder Kontrollgewebe kultiviert und i.p. in die Flanke der NOD–SCID Mäuse implantiert. Danach wurden sie 7d vaskularisiert. Dann wurden autologe CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T–Zellen (jeweils 10<sup>6</sup>) i.v. injiziert. Nach 2d wurden die Tiere geopfert und die Kammer infiltrierenden T–Zellen in den jeweiligen Ansätzen ausgezählt. Die Auszählung erfolgte durch Zellentnahme aus den Kammern und immunzytologischer Färbung, nach Zentrifugation auf einen Objektträger. Dabei wurden die gezeigten Ansätze mit mindestens 4 Einzeltieren durchgeführt. Dargestellt sind hier die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikanzniveau:\*p<0,1; \*\*p<0,05.

Hierbei transmigrierten signifikant mehr CD4+ Zellen durch Tumorendothel als durch Kontrollendothel und auch signifikant mehr CD4+ als CD8+ T-Zellen. Dabei wurden jeweils 10<sup>6</sup> CD4+ und CD8+ T-Zellen injiziert. Hier infiltrierten ca. 1500 CD4+ und nur ca. 1100 CD8+ T-Zellen die Tumorendothel-Kammer. Dieser Unterschied war, im Gegensatz zur niedrigen Infiltration beider Subpopulationen in die Kontrollendothel-Kammer (zwischen 750 und 900 Zellen), signifikant. Die Differenz zwischen Tumor- und Kontroll-Kammer Infiltration wurden noch deutlicher, wenn die Endothelien mit Tumor- oder PBMZ-Lysat *in vitro* vorbehandelt wurden, um das Tumormikromilieu zu imitieren. Dabei unterschied sich die Infiltration der CD4+ T-Zellen durch das Tumorendothel signifikant von der CD8+ T-Zell Infiltration durch Tumorendothel, aber auch von den Infiltrationen durch das Kontrollendothel. Zusammenfassend bestätigte sich die *in vitro* festgestellte differentielle Transmigrationskapazität der CD4+ und CD8+ T-Zellen *in vivo*.

#### 4.16.3 Die Transmigration von CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel *in vivo*

Das Testen der Transmigrationskapazität der CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen sollte Hinweise darauf geben, ob der Transmigrationsvorteil der CD4+ T-Zellen *in vivo* wie schon *in vitro* hauptsächlich durch Tregs verursacht wird.



**Abbildung 4.55**: Die Transmigrationskapazität CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel *in vivo*. Tumor- und Kontrollendothel beschichtete Kammern wurden ohne oder mit Lysaten aus autologem Tumor- oder Kontrollgewebe kultiviert und i.p. in die Flanke der NOD-SCID Mäuse implantiert. Danach wurden sie 7d vaskularisiert. Dann wurden autologe CD4+CD25+ und CD4+CD25- T-Zellen (jeweils 2x10<sup>5</sup>) i.v. injiziert. Nach 2d wurden die Tiere geopfert und die Kammer infiltrierenden T-Zellen in den jeweiligen Ansätzen ausgezählt. Die Auszählung erfolgte durch Zellentnahme aus den Kammern und immunzytologischer Färbung, nach Zentrifugation auf einen Objektträger. Dabei wurden die gezeigten Ansätze mit mindestens 4 Einzeltieren durchgeführt. Dargestellt sind hier die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikanzniveau:\*p<0,1; \*\*p<0,05. Die *in vivo* Transmigrationsversuche veranschaulichen einen selektiven Transmigrationsvorteil der CD4+CD25+ T-Zellen durch das Tumorendothel. Um diese Zellpopulation als Tregs zu identifizieren, wurden die infiltrierten CD4+CD25+ T-Zellen zusätzlich vor und nach *in vivo* Transmigration auf Expression von FoxP<sub>3</sub> gefärbt. Der Anteil der FoxP<sub>3</sub> exprimierenden Population an den CD4+CD25+ T-Zellen, wurde darauffolgend mittels mikroskopischer Auszählung bestimmt (Abbildung 4.56).



**Abbildung 4.56**: Der Anteil der FoxP<sub>3</sub>+CD4+CD25+ Zellen an der CD4+CD25+ Population vor und nach der Transmigration *in vivo*. Die Zellen aus den jeweiligen Subpopulationen wurden vor Injektion und nach Kammer–Infiltration auf ihre FoxP<sub>3</sub> Expression gefärbt. Dazu wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, fixiert und immunzytologisch auf ihre FoxP<sub>3</sub>+-Expression gefärbt. Darauffolgend wurde der Anteil der FoxP<sub>3</sub>+CD4+CD25+ Zellen an der CD4+CD25+ Population durch Auszählung bestimmt.

# 4.17 Die Relevanz der Treg-exprimierten CAMs bei der Transmigration durch Tumor- und Kontrollendothel *in vivo*

In den *in vitro* Versuchen konnten die Treg-selektiven Transmigrationen durch Tumorendothel zu einem großen Teil geblockt werden indem die Tregs vor der Transmigration mit blockierenden Antikörpern gegen die Proteine CD166, CD62L und ß-7 Integrin behandelt wurden. Dieser Ansatz wurde ebenfalls *in vivo* verfolgt. Die Abbildung 4.57 zeigt die Ergebnisse der Blockierungsversuche *in vivo*. Sowohl CD166 wie auch CD62L und besonders ß-7 Integrin scheinen von Bedeutung für die Transmigration von CD4+CD25+ T-Zellen durch Tumorendothel *in vivo* zu sein. Durch die Blockaden wurden die CD4+CD25+ T-Zellen stärker beeinflusst als die CD4+CD25- T-Zellen. Die Bedeutung der Blockade nahm bei der Transmigration durch das

Tumorendothel (Inhibierungsstärke von 33–52%) aber im Vergleich zum Kontrollendothel (Inhibierungsstärke von 15–21%) noch zu.



**Abbildung 4.57**: Die Relevanz Treg exprimierter CAMs, bei der *in vivo* Transmigration von Tregs (CD4+CD25+) und CD4+CD25- T-Zellen durch Tumor- und Kontrollendothel im Vergleich. Die geläufige Transmigrationsansatz wurde durch Zugabe blockierender Antikörper zu den T-Zell Subpopulationen 4h vor Injektion ergänzt. Anschließend wurden die Subpopulationen gewaschen und nach Injektion der Zellen, wurden die Tiere 4d später geopfert. Angegeben ist die prozentuale Inhibition der Transmigration. Dabei dient die Transmigration von Isotyp-behandelten Subpopulationen durch entweder Tumor- oder Kontrollendothel als 0-Wert. n=3. Signifikanzniveau: \*\*p<0,05.

### 5 Diskussion

# 5.1 Das Mikromilieu im Pankreastumorgewebe unterstützt eine ausgeprägte Angiogenese-Induktion

Durch die histologischen Untersuchungen an Tumor- und Kontrollgeweben konnte der Grad der Vaskularisierung festgestellt werden. In den von uns getesteten Tumorgeweben konnte im Vergleich zu den Kontrollgeweben eine um das zweifach erhöhte Vaskularisierung mittels CD31 Färbung festgestellt werden (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.3). Die untersuchten Tumorgewebe exprimierten durchschnittlich 33,1%+-4,7% mehr VEGFR-1 als die Kontrollgewebe.

Eine notwendige Voraussetzung für die Vaskularisierung von Geweben ist die Angiogenese. Die Angiogenese bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen durch Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen (Folkman *et al.*, 1984). Physiologisch wird Angiogenese nur im Embryo und Fetus, sowie beim Adulten bei zyklichen Prozessen im Eierstock und in der Plazenta oder bei der Wundheilung gefunden. Alle anderen Formen der Angiogenese sind mit pathologischen Vorgängen verbunden (Findlay *et al.*, 1986).



**Abbildung 5.1:** Vereinfachte Darstellung des kaskadenartigen Ablaufs der Angiogenese. Das Tumormikromilieu induziert das Auswachsen der tumorbenachbarten Gefäße (geändert nach Bergers und Benjamin, 2003).

Im Mittelpunkt der Angiogenese stehen die Endothelzellen, welche während der Angiogenese kaskadenartig die Phasen der Migration, Proliferation und Differenzierung durchlaufen (Folkman *et al.*, 1984) (Abbildung 5.1).

An der Angiogenese sind allerdings auch peri-endotheliale Komponenten beteiligt, wie beispielsweise die Basalmembran, die erst, um die Migration der Zellen zu ermöglichen, abgebaut und später als Umhüllung der neu entstandenen Gefäße wieder aufgebaut werden muss (Grant und Kleinman, 1997). So ist anzunehmen, dass diese Mechanismen von Bedeutung für die stärkere Vaskularisierung des Pankreaskazinomgewebes sind. Modulierte Wachstumsfaktor-Expressionen im Tumorgewebe verstärken das Angiogenese-Potential.

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren der Endothelzellen sind der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und die Hypoxie. Das VEGF führt *in vitro* zur Migration und Proliferation der Endothelzellen und *in vivo* zum gesamten Ablauf der Angiogenese (Hattori *et al.*, 2001; Pettersson *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 1995). Es wird daher vor allem in Geweben in denen neue Blutgefäße benötigt werden produziert. Dementsprechend wird VEGF in hohem Maß von Tumorzellen produziert (Beck und D´Amore, 1997). Seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 wurden bisher fast ausschliesslich auf Endothelzellen gefunden (Shalaby *et al.*, 1995). Die Expressionssteigerung im Tumorgewebe hat wahrscheinlich eine höhere Sensitivität der Endothelzellen im Tumorgewebe gegenüber löslichem VEGF zur Folge. Dies würde die Angiogenese, die Migration und die Proliferation der Zellen positiv beeinflussen.

Die Verteilung der Rezeptoren und Liganden auf Tumorzellen und Endothelzellen verdeutlicht eine große funktionelle Abhängigkeit der Endothelzellen von tumorsekretierten Faktoren. Wurden Tumorzellen durch Filter von ihrem vaskulären Bett getrennt, konnten sie trotzdem die Bildung wies darauf Kapillaren anregen. Dies hin, das bei der neuer Tumorangiogenese lösliche Stoffe beteiligt waren (Greenblatt und Shubik, 1968). Ein löslicher Faktor, der die Neubildung von Kapillaren verursacht, wurde 1971 von Folkman und Mitarbeitern entdeckt und als "Tumor Angiogenese Faktor" bezeichnet. Diese Mechanismen erklären die stark erhöhte Vaskularisierung im Pankreastumorgewebe.

Die Tumorzellen verursachen durch ihr schnelles Wachstum im Pankreasgewebe zusätzlich eine lokale Hypoxie, die zur verminderten Sauerstoffversorgung der umliegenden Zellen führt. Die hypoxischen Konditionen führen zu veränderten Genaktivierungen in den betroffenen Zellen. So wird die VEGF-Genexpression, wie auch die einiger anderer Proteine durch diese Genaktivierungen stimuliert. Die Stimulation der Hypoxie-induzierten Proteine beruht auf der Aktivierung der Familie der Hypoxie-induzierenden Faktoren (*hypoxia inducible factors*, HIF) (Semenza *et al.*, 1999). Die Aktivierung und Inhibierung der Angiogenese hängt von einem Gleichgewicht pro- und anti-angiogener Faktoren ab. Im Pankreasgewebe sind HIF, VEGF, wie auch der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF) als pro-angiogen identifiziert. Während die Inhibition wahrscheinlich durch Angiostatin, Canstatin und Endostatin vermittelt wird (Bergers und Benjamin, 2003). In den getesteten Tumorgeweben könnte das Gleichgewicht dieser Gegenspieler auf Seite der pro-angiogenen Faktoren verschoben sein. Letztlich werden durch diese Mechanismen Tumor-Angiogenese und Blutfluss gesteigert (Zhu und Bunn, 2001) und die Tumore bekommen zusätzliche Möglichkeiten zur Metastsasierung (Folkman *et al.*, 1971).

Beispielsweise erfolgt die Verteilung von zirkulierenden T-Zellen oder Tumorzellen selektiv an bestimmte Organe und Gewebe. Dies setzt eine spezifische Erkennung der Endothelien der Zielorgane voraus. Es konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen im Hinblick auf morphologische Eigenschaften und anhand der Expression von CAMs eine sehr heterogene Zellspezies bilden (Plendl *et al.*, 1992).

Eine Änderung der morphologischen oder funktionellen Eigenschaften der Endothelzellen beeinflusst die Interaktionsfähigkeit mit blut-zirkulierenden T-Zellen.

#### 5.2 Die tumorabhängige Induktion endothelialer CAM-Expressionsmuster

Es gibt mehrere Beweise, das CAMs in verschiedenen Abschnitten der Angiogenese-Kaskade eine entscheidene Rolle spielen.

Wie gezeigt werden konnte, wurden sowohl ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, CD166, wie auch ß-1- und ß-7 Integrin auf Tumorendothelien *ex vivo* signifikant stärker exprimiert als auf Endothelien des jeweilig korrespondierenden Kontrollgewebes des selben Donors.

Die endotheliale Expression der B-1-, B-2- und B-7 Integrine erhöht nach Bindung der Liganden in der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) und auf Nachbarzellen sowohl die Adhärenz wie auch die Motilität und die Migrationskapazität der Endothelzellen während der Angiogenese (Saiki
et al., 1990; Nicosia und Bonanno, 1991). Ein Bindungspartner für ß-1- und ß–7 Integrin ist VCAM–1, aber auch Kollagen–I, Kollagen–IV und Laminin sind Bindungspartner von ß-1 Integrin (Albeda *et al.*, 1991; Defilippi, 1991). Durch die gesteigerte Expression der Integrine auf Tumorendothelzellen wird wahrscheinlich die Interaktion mit der ECM und den benachbarten Endothelzellen, die ebenfalls VCAM-1 exprimieren, verstärkt (Massia und Hubbell, 1992). Viele der Integrine wurden mit dem Vorgang der Angiogenese in Verbindung gebracht, hauptsächlich aber ß-1 und ß-3 Integrine (Luscinskas und Lawler, 1994; Brooks et al., 1994; Friedlander et al., 1995). Vor allem Brooks hat 1994 gezeigt, dass es zwei Zytokinabhängige Angiogenesewege gibt, die von der endothelialen Expression diverser Integrine abhängig sind. Aber nicht nur die Integrine, sondern auch die Ig-Superfamilien Proteine scheinen eine Rolle für die Angiogenese und die Transmigration von zirkulierenden Zellen zu spielen. Es wird deutlich, dass ein regulatorisches Netzwerk zwischen ECM Bestandteilen, den CAMs und den angiogenen Mediatoren besteht (Abbildung 5.2).



Abbildung 5.2: Der Prozess der Angiogenese besteht aus mehreren Phasen. Angiogene Faktoren werden im Tumormikromilieu produziert und ausgeschüttet. Sie binden an spezifische Rezeptoren auf Endothelzellen und induzieren modulierte Signaltransduktion, Aktivierung, Degradation der Basalmembran und Proliferation in Endothelzellen. Es kommt darauffolgend zur Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) und zur gerichteten Migration der Endothelzellen. Dies führt zum Auswachsen tubulärer Fortsätze und dem Rearrangement der EZM. Nach der Stabilisierung der Zell-Zellkontakte kommt es zur Etablierung des neuen Blutstroms (geändert nach Vorlage der Angiogenesis Foundation, 2006). Diese Ig-Superfamilien Proteine sind für eine differentielle Expression auf Tumorendothelien bekannt (Albeda *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1995; Kuzu *et al.*, 1993).

Die Ausschüttung angiogener Faktoren und Wachstumsfaktoren im Tumorgewebe vermittelt eine Expressionssteigerung der CAMs auf Tumorendothel und sorgt für gesteigerte Adhäsionsund Migrationskapazität der Endothelzellen gegenüber der Basallamina (Albeda und Buck, 1990; Szekanecz und Szegedi, 1992; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Die CAMs binden mit ihrer intrazytoplasmatischen Domäne an Bestandteile des Zytoskeletts. Dies erlaubt starke Adhäsion der Zellen. Ohne die Verbindung zum Zytoskelett bestünde die Gefahr, dass das Protein von extrazellulären hydrolytischen Enzymen hydrolysiert werden könnte. Somit würde das Protein aus der fragilen Zellmembran "herausgeschnitten".

Die Ausschüttung angiogener Faktoren im Tumorgewebe erklärt die Expressionssteigerung des Tumorendothels *ex vivo*, aber auch die Expressionssteigerung der kultivierten Endothelzellen nach Zugabe von Tumor-Lysat *in vitro* (Abbildung 4.12). Die verstärkte Interaktion der CAMs resultiert in mannigfaltiger Aktivierung der Endothelzellen. Es kommt zum Kalziuminflux (Lorenzon *et al.*, 1998), zur Restrukturierung des Zytoskeletts (Yoshida *et al.*, 1996) und zu morphologischen Änderungen, die die Leukozyten-Transmigration positiv beeinflussen (Shaw *et al.*, 2001; van Wetering *et al.*, 2003).

Ebenso können einzelne Wachstumsfaktoren wie TGF-ß, von dem wir nachweisen konnten, dass es im Pankreastumor vor allem von Treg signifikant stärker exprimiert wird, eine Expressionssteigerung aller untersuchten CAMs anregen (Enenstein *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1991; Szekanecz *et al.*, 1995). Die gesteigerten CAM-Expressionen auf den Endothelien hat auch eine gesteigerte Segregation von löslichen CAMs zur Folge (Koch *et al.*, 1994; Kawaguchi *et al.*, 1992; Blue *et al.*, 1993). Koch *et al.*, bewiesen 1995 das lösliche CAMs auch die Rolle pro-angiogener Faktoren übernehmen können (VCAM-1 und CD62-E). Die Blockade dieser CAMs resultiert in verminderter Angiogenese *in vivo* (Koch *et al.*, 1995).

Im Anschluss an die CAM-Expressionsbestimmung auf den Endothelien, wurden die morphologisch-lokomotorischen Eigenschaften der Endothelzellen *in vitro* untersucht. So sollte festgestellt werden, ob die angiogenen Faktoren im Pankreastumor-Lysat Effekte auf die Endothelzellen haben. Eventuell gesteigerte Motilität oder geänderte Morphologie der Tumorendothelzellen könnte zu einer besseren Interaktion mit zirkulierenden T-Zell Subpopulationen führen.

# 5.3 Die morphologisch-lokomotorischen Eigenschaften der Endothelzellen werden durch lösliche Faktoren im Tumormilieu beeinflusst

Wie bewiesen werden konnte, zeigte das Tumorgewebe eine stärkere Vaskularisierung und die Tumorendothelien exprimierten im Vergleich zu den Kontrollendothelien verstärkt ß-1-, ß-7 Integrin, VCAM-1 sowie ICAM-1, CD166. ICAM-2 und Es konnte nachgewiesen werden. das Tumorendothelzellen wesentlich mehr transzytoplasmatische Aktinausläufer bilden, während sich die Endothelzellen aus Kontrollgewebe durch einen peripheren Aktinring auszeichnen und keinerlei Anzeichen von Aktivierung zeigten. In Kultivierungsbedingungen unterschieden sich die Tumorendothelzellen durch eine polygonale Morphologie. Die Zellgestalt abgerundet, was auf eine Zytoskelett-Reorganisation erschien und Aktivierung hinweist. Die Zellen waren motiler, sie bewegten sich allerdings ungerichtet. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollendothelzellen eine Morphologie, geringere typische bipolare Motilität, aber gerichtete Bewegungsabläufe. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass diese Anpassungen teilweise durch lösliche Moleküle im Tumor-Lysat augelöst ohne wurden. Auch die Zugabe von Tumor-Lysat konnten in Kultivierungsbedingungen pathologische Determinationen der Zellen festgestellt werden, da sie qualitativ gleiche Effekte zeigten. Die Effekte konnten aber durch Lysatzugabe verstärkt werden. Die Tumorendothelien zeigten eine hohe Angiogeneserate, welche deutlich über der Rate von Kontrollendothelien lag. Die Angiogeneserate konnte durch Zugabe von Tumor-Lysat (zur Imitation des Tumormilieus) gesteigert werden.

Die Bildung von endothelialen Zell-Zellkontakten sowie von Zell-Matrix-Kontakten erfordert ein komplexes Zusammenspiel von Proteinen der Plasmamembran, Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), Bestandteilen des Zytoskeletts und assoziierten Signalmolekülen (Abbildung 5.2) (Vestweber *et al.*, 2000). Endotheliale Zellkontakte kontrollieren die Permeabilität der Blutgefäßwandung. Dies erlaubt dem Endothel eine aktive Barriere für Makromoleküle, Solute und immunologische Zellen zwischen Gefäßlumen und Interstitialraum aufzubauen. Die Bedeutung dieser Barriere wird in Situation klar, bei denen sie gestört ist (z. B. Wundheilung). Die Änderungen der adhäsiven und kommunikativen Eigenschaften von Zellen, kann zu unkontrolliertem Wachstum führen (Li und Herlyn, 2000). Eine allgemein akzeptierte Arbeitshypothese (Vestweber *et al.*, 2000) besagt, dass die inter-endothelialen Zellkontakte aktiv geöffnet und geschlossen werden können, um typische Aufgaben des Endothels zu ermöglichen (Homöostase, Angiogenese, Gefäßtonus, Blutfluß u.a.).

Da die Endothelzellen von allen nicht-muskulären Zellen den höchsten Anteil an Aktin-Myosin-Proteinen besitzen, ist zu vermuten, dass dieses System als Teil des Zytoskeletts an der kontrollierten Motilität der Endothelzellen beteiligt ist, die durch Faktoren aus der Umgebung ausgelöst wird. Das Aktinzytoskelett ist eine dynamische Struktur, die einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt. Aufgrund ständiger Anpassung des endothelialen Zytoskeletts an die Umgebungssituation, ist das Endothel fähig seine Funktionen zu erfüllen. Die Interaktion der CAMs mit den jeweiligen Liganden verursacht die Änderung morphologischer Eigenschaften (Li und Herlyn, Greenwood et al., 2003; Lyck et al., 2003). 2000; Diese wird höchstwahrscheinlich durch Rearrangement des Zytoskeletts erreicht.

Die Koordination der extrazellulären CAM-Adhäsion mit der intrazellulären Aktin-Zytoskelett Organisation benötigt eine Signalweiterleitung durch die Membran. CD62-E, VCAM-1 sowie ICAM-1 wurden von Tumorendothel verstärkt exprimiert. Sie besitzen kurze intrazelluläre Domänen, die eine "Kommunikation" von außen nach innen unterstützen. Mutations- und Deletionsstudien an CD62-E und ICAM-1 konnten nachweisen, das diese intrazelluläre Domäne wichtig für verschiedene kurze endotheliale Signalwege ist (Yoshida et al., 1996; Greenwood et al., 2003; Lyck et al., 2003). Die zytoplasmatische Domäne des VCAM-1 vermittelt die Interaktion mit Effektormolekülen des Zytoskeletts. Die homophilissche Bindung des CD166, welches auf Tumorendothel ebenfalls verstärkt exprimiert wird, führt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts (van Kempen et al., 2001) und ist notwendig für die Ausbildung der adhäsiven Fähigkeiten der Zelle (Nelissen et al., 2000). B-1- und B-7 Integrin wurde ebenfalls verstärkt von Tumorendothelien exprimiert. Da die Integrine mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix interagieren, besitzen sie die Fähigkeit, Änderungen im extrazellulären Umfeld wahrzunehmen. Beispielsweise werden T-Zellen, wenn sie den Blutstrom verlassen und in inflammatorisches Gewebe einwandern, einer Vielzahl von EZM-Proteinen ausgesetzt, was zu deren Zytoskelett-Anpassung führt (Dustin et al., 2001). Integrin-vermittelte Bindung an die EZM-Proteine resultiert in Aktivierung und Rekrutierung der fokalen Adhäsions Kinasen (*focal adhesion kinase*, FAK) (Cukierman *et al.*, 2001; Bearz *et al.*, 1999), ItK (Woods *et al.*, 2001) und Pyk2 (Gismondi *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1997; Ganju *et al.*, 1997; Sancho *et al.*, 2000; Qian *et al.*, 1997), welche die Assoziation zu den Zytoskelett-Proteinen Paxillin und Tallin fördern (Ostergaard *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1998).

Zusammenfassend führt die Bindung der hochregulierten CAMs auf Tumorendothel zu drei verschiedenen Signalen, die essentiel für die Reorganisation des Zytoskeletts sind: 1. Die intrazellulären Kalziumkonentrationen (Ca2+) steigen, 2. es kommt zur Aktivierung des Signaltransduktionsweges 3. Rho/Rac und zur Aktivierung von Phosphoinositol. Die Steigerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration und die Aktivierung der Rho/Rac Signaltransduktion in Endothelzellen führt zur Zytoskelett-Reorganisation und einer fenestrierten Morphologie mit "Lückenbildung" zwischen den Endothelzellen (gap formation) (Kaplanski et al., 1994; Lorenzon et al., 1998; van Wetering et al., 2002, 2003; van Buul et al., 2002; Cook-Mills et al., 2004; Shaw et al., 2001; Wang et al., 2000, 2002).

Die Aktivierung des Rho/Rac Signaltransduktionsweges führt in Endothelzellen zur Bildung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, ein weiterer Mediator der Aktin-Reorganisation (Tilghman *et al.*, 2002; Kiely *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 1996). Jedes der Rho/Rac- oder Phosphoinosid-Signale kann die Ezrin/Radixin/Moesin-Familie (ERM) der zytoskelettalen Adapterproteine aktivieren einen Plasma-Membran-Komplex zu formieren, der die endothelialen CAMs mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung bringt (Yoshida *et al.*, 1996).

beobachteten Effekte Die lassen sich hauptsächlich durch und Expressionssteigerung der CAMs der Wachstumsfaktoren im Tumorgewebe erklären. Somit zeigt das Tumorendothel eine Vielzahl von Anpassungen an das Tumormilieu, die außer einer stärkeren Vaskularisierung und CAM-Expression auch einen selektiven Infiltrationsvorteil für bestimmte T-Zell Subpopulationen als Folge haben könnten.

#### 5.4 Die Anreicherung von T-Zellen im Pankreastumorgewebe

Unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Konditionen verlassen T-Zell Subpopulationen den Blutstrom indem sie die endotheliale Einzelschicht, die alle Gefäße auskleidet, durchqueren und in darunterliegende Gewebe migrieren. Dieser Prozess der Extravasation erfordert die Expression verschiedener CAMs auf T-Zell- und Endothelseite, sowie eine extensive intrazelluläre Signalübertragung. Diese kontrolliert einerseits Adhäsion und Chemotaxis, andererseits aber auch eine transiente Modulation der endothelialen Integrität (Engelhardt und Wolburg *et al.*, 2004).

Die Migration aus dem Blut in ein Zielgewebe ist von großer Bedeutung für die physiologische Funktion der T-Zellen. Die Migration findet in nichtpathologischen Situation erstaunlich häufig statt. T-Zellen verbleiben unter physiologischen Bedingungen nicht länger als 30 min. im Blut (Pabst, 1988; Westermann *et al.*, 1988). Setzt man ein Blutvolumen von 5 Litern voraus, welches etwa  $2\times10^9$  T-Zellen/I enthält (Westermann und Pabst, 1992), so verlassen alle 30 min.  $10^{10}$  T-Zellen das Blut, infiltrieren verschiedene Gewebe und gelangen dann wieder zurück in den Blutstrom (Westermann und Pabst, 1990). Bevor die T-Zellen (etwa 10µm groß) aber an das jeweilige Endothel adhärieren, beträgt ihre Geschwindigkeit in den Gefäßen etwa  $500\mu$ m/s (Salmi und Jalkanen, 1997) (Größe und Geschwindigkeit der Zellen sind mit einem Auto von 5m Länge und einer Geschwindigkeit von >800km/h vergleichbar!).

Eine wichtige Funktion der CAMs ist es, diese Geschwindigkeit innerhalb von Sekunden zu drosseln (Ager, 1994). Hierbei spielen die Selektine eine Rolle (Drillenburg und Pals, 2000; Campbell und Butcher, 2000). Während der Adhärenz und der Transmigration besteht die Aufgabe der CAMs darin, mittels verschiedenster Signaltransduktionswege eine ausreichend hohe Spezifität sicherzustellen (Tononi et al., 1999; Mantovani, 1999). Hierbei spielen die Integrine und die Ig-Superfamilien Proteine, wie auch chemotaktische Zytokine, die auf der apikalen Seite der Endothelzellen präsentiert werden, eine Rolle (Campbell und Butcher, 2000). Obwohl die Prinzipien dieser Interaktionen für alle T-Zell Migrationen durch das Endothel gelten, variieren die CAMs die die Transmigration vermitteln abhängig von den T-Zell Subpopulationen und der Endothelart (Drillenburg und Pals, 2000; Campbell und Butcher, 2000). Deshalb wurde postuliert, dass es durch sequentielle Interaktionen der CAMs mit dem jeweiligen Endothel zu gewebsspezifischen Transmigrationen kommt (Springer, 1994). Eine Konsequenz dieser Interaktion ist die flache Morphologie der T-Zellen, die verstärkt an die Endothelzellen binden um letztlich eventuell zwischen zwei benachbarten Endothelzellen zu transmigrieren (van Buul und Hordijk, 2004). Im Gewebe selbst wird die Geschwindigkeit der T-Zellen auf etwa 0,2µm/s erniedrigt, was bei konstanter Größe und Geschwindigkeit einem Auto mit einer Geschwindigkeit von 0,35km/h entspricht (Friedl *et al.*, 1994; Gunzer *et al.*, 2000).

Alle genannten Prozesse können aktiv durch die Tumorzellen beeinflusst werden. Denn wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, konnten die Tumorzellen Morphologie- und Expressionsänderungen in Endothelzellen verursachen. Diese Anpassungen könnten die selektive Anreicherung von CD4+CD25+FoxP<sub>3</sub>+ Zellen im Tumorgewebe verursachen, die im Folgenden genauer diskutiert wird.

Der Vergleich der CD3<sup>+</sup> T-Zellzahlen in Tumor- und Kontrollpankreasgewebe zeigte über 40% mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe. Die infiltrierten T-Zellen finden sich im Tumorgewebe in Gruppen mit bis zu 30 Einzelzellen, während im Kontrollgewebe mehr oder weniger Einzelzellen gleichmäßig verteilt im Gewebe lagen (Abbildung 4.19).

Da die Korezeptoren CD4 und CD8 eine aktive Rolle bei der Adhäsion und der transendothelialen Migration spielen, indem sie mit den jeweiligen MHC– Komplexen interagieren (Doyle und Strominger, 1987; Jensen und Mescher, 2001), war aber anzunehmen, dass die CD4+– und CD8+–Subpopulationen aufgrund unterschiedlicher Funktionen auch modulierte Transmigrationskapazitäten zeigen würden.

Es konnte eine selektive Anreicherung der CD4+ T-Zellen im Tumorgewebe bewiesen werden. Das Tumorgewebe zeigte korrespondierend eine selektive Anreicherung von CD4+CD25+ Zellen im Vergleich zum Kontrollgewebe (7,9% der CD4<sup>+</sup> T–Zellen im Kontrollgewebe und 39,3% im Tumorgewebe). Ebenso konnte mit Hilfe der FoxP3 Färbung festgestellt werden, dass im Tumorgewebe wesentlich mehr CD4+CD25+FoxP<sub>3</sub>+ Tregs aufzufinden sind. Das im Tumorgewebe aber auch ein höherer Anteil von FoxP<sub>3</sub>+ Zellen an der CD4+CD25+ Population existiert (53,5% im Kontrollgewebe und 74,6% im Tumorgewebe) könnte dafür sprechen, dass die Zellen nach Infiltration in das Tumorgewebe regulatorischen Mechanismen unterliegen, die auch die Expression des Transskriptionsfaktors FoxP<sub>3</sub> beeinflusst. Obwohl der Effekt der Transmigration auf die CAM-Expression und die Funktion der Zellen noch unklar ist, ist es konzeptionell denkbar, dass es zu selektiven Anpassungen der migrierenden T-Zellen, in Abhängigkeit von der Art des durchquerten Endothels (Tumor- oder Kontrollendothel) kommt (Koller et al., 1999; Bruhl et al., 2001). Somit wird möglicherweise auch die Funktionalität der regulatorischen Zellen im Tumorgewebe moduliert (von Boehmer, 2005; Fontenot und Rudensky, 2005; Shevach, 2002).

Eine Anreicherung von T-Zellen im Pankreastumorgewebe wurde auch von Von Bernstorff *et al.*, 2002 beschrieben. Dabei handelt es sich um fibröse Gewebsbereiche, in denen die T-Zellen in die "Falle" geraten da die T-Zellen nach Kontakt mit Tumorzellen keine Reaktivität aufweisen. Die fehlende Reaktivität konnte anhand des Verlusts der CD3- $\zeta$ -Ketten nachgewiesen werden (Bernstorff *et al.*, 2001). Im Umfeld der Tumorzellen kommt es zu starken Aggregationen und desmoplastischen Reaktion (Fukunaga *et al.*, 2004). Die konstitutive Migration von T-Zellen um unterschiedliche Gewebe zu erreichen, wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Pro-migratorische Änderungen in der CAM-Expression sorgen für eine initiale Differenzierung.

Diese zellulären Mechanismen befähigen und regulieren die Kompartimentalisierung der antigen-spezifischen oder gewebsspezifischen T-Zell Migration (Mackay *et al.*, 1993; Kunkel und Butcher *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004).

Die Präsenz von tumorspezifischen Tregs in Tumorgeweben könnte eine essentielle Rolle bei der Suppression der Antitumor-Immunität spielen. Berendt und Mitarbeiter konnten 1980 zeigen, das es durch adoptiven Transfer tumorreaktiver T-Zellen nur dann zur Abstoßung großer muriner Tumore kommt, wenn der Tumor in T-Zell defizienten Mäusen, nicht aber in immun-kompetenten Mäusen gewachsen war (Berendt und North, 1980). Kombinierte Gabe von tumorreaktiven T-Zellen und Cyclophosphamid führte zur kompletten Tumorabstoßung in immunkompetenten Mäusen (North, 1982). Zusammenfassend sorgte die Eliminierung von Tregs durch verschiedene Strategien zur Tumorabstoßung (Sakaguchi *et al.*, 2001; Sutmuller *et al.*, 2001; Awwad und North, 1988).

Wie Tregs funktionieren, wie sie migrieren und in vielen Tumorgeweben akkumulieren, wurde bisher kaum untersucht (Curiel *et al.*, 2004; Huehn *et al.*, 2004). Immer noch gibt es Unklarheiten darüber, ob ein bestimmtes Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren vom jeweiligen Gewebemilieu abhängig ist, oder ob es ein Langzeitgedächtnis für verschiedene Subpopulationen und Kompartimente gibt (Santamaria *et al.*, 1995; Kantele *et al.*, 1999). Auch eine Kombination beider Hypothesen wäre denkbar.

Das CAM-Expressionsmuster der Tregs könnte dafür verantwortlich sein, dass es durch erhöhte Interaktion mit dem Tumorendothel zu einer Anreicherung der Tregs im Tumorgewebe kommt (Wildbaum *et al.*, 2000). Durch die Expressionssteigerung der CAMs auf den Tumorendothelien könnte eine Interaktionsverstärkung initiiert werden.

Es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, dass Tregs über mehrere Mechanismen, wie beispielsweise die Anpassung des CAM-Expressionsniveaus, die Regulation der Chemokinrezeptoren und der Zytokinrezeptoren zur chemotaktischen transendothelialen Migration befähigt werden (Thelen, 2001; Rollins, 1998). Das humane Chemokinsystem mehr als 50 Chemokine umfasst zur Zeit und mehr als 18 Chemokinrezeptoren. Chemokine die auf Endothelzellen exprimiert werden, regulieren die Aktivität der T-Zell exprimierten Integrine sowie den Arrest der T-Zellen am Endothel (Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999; Butcher, 1999). Die Interaktion von Chemokinrezeptoren auf T-Zellen mit ihren Liganden führt zu veränderter direktionaler Zell-Lokomotion durch Zytoskelett-Modulation, zu veränderter Migration und zu veränderten adhäsiven Interaktion mit der EZM (Luther und Cyster, 2001; Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999). So werden die adhäsiven, migratorischen und funktionellen Eigenschaften der T-Zellen im Gewebe zum Teil schon vor dem Kontakt mit dem Endothel determiniert.

# 5.4.1 Die CAM-Expressionsmuster der T-Zell Subpopulationen während der selektiven Treg Infiltration in das Tumorgewebe

Es konnte festgestellt werden, dass die CD4<sup>+</sup> T–Zellen im Tumordonor Blut signifikant weniger ß–7 Integrin, CD24, LFA–1 und CD56 exprimieren als die CD4<sup>+</sup> T–Zellen im Kontrolldonorblut. Dies könnte dafür sprechen, dass im Kontrollblut Integrin–exprimierende Zellen besonders effektiv mit dem Endothel wechselwirken können, dann adhärieren und im Blut nur wenige Integrin–exprimierende Zellen wiederzufinden sind. Im Tumorblut hingegen steigt die Integrin–Expression auf den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen bis auf das Expressionsniveu der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen an. Dies könnte wiederum für eine schwächere Integrinwechselwirkung mit dem Endothel sprechen. Andere Mechanismen, wie beispielsweise die Zytokin– oder Chemokinausschüttung des Tumorgewebes, könnten chemotaktische Wirkung auf die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T– Zellen haben (Campbell und Butcher, 2000; Moser und Loetscher, 2001; Rosenkilde und Schwartz, 2004; Sallusto *et al.*, 2000).

Daher kann angenommen werden, dass die Integrin-exprimierenden T-Zellen im Blut mit dem Endothel in Kontakt stehen, oder durch konstante Infiltration in Gewebe einwandern. Somit wären sie nicht in der Blutprobe aufzufinden (Westermann und Pabst, 1992). Bis auf CD24, welches kostimulatorische Kapazität besitzt und nach Bindung in T-Zellen zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt und so eine Signaltransduktion ermöglicht (Fischer *et al.*, 1990; Salamone *et al.*, 2001), lassen sich die Expressionserniedrigungen von ß-7 Integrin, CD24, LFA-1 und CD56 nur auf CD4+ T-Zellen und nicht auf CD8+ T-Zellen im peripheren Blut nachweisen.

Während CD62–P und ICAM–2 konstitutiv auf den Endothelzellen exprimiert werden (Bindungspartner für CD24 und PSGL, bzw. für LFA–1), sind CD62–E, ICAM–1 und VCAM–1 transkriptionell von Zytokinen, Chemokinen und anderen Mediatoren reguliert. Die induzierte Expression der CAMs auf Tumorendothelzellen kann innerhalb von Stunden an ein geändertes Mikromilieu angepasst werden. Diese Anpassungen könnten eine mehr oder weniger Subpolulations–selektive Transmigration ermöglichen. Vor allem da sich die CAM–Expressionsmuster der CD4+ und CD8+ T–Zellen ebenfalls anpassen können. Zusammenfassend bieten diese Ergebnisse zwei Interpretationsmöglichkeiten:

- Die CD4+ T-Zellen exprimieren eine Kombination von CAMs, die ihnen während und nach Bindung an das Tumorendothel in der Addition der Einzeleffekte einen pro-migratorischen Phänotyp verleihen und sie von der CD8+ Subpopulation unterscheidet. Die CD4+ T-Zell Migration würde selektiv verstärkt werden.
- 2. Durch den erhöhten Aktivierungsstatus des Tumorendothels und das geänderte Mikromilieu des Tumors (Hypoxie und Zytokinsegretion) werden lokal Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine ausgeschüttet, die vor allem auf die CD4+ T-Zellen affinitäts- und aviditätssteigernd wirken könnten. Die Folge wäre eine hohe Sensibilität der CD4+ T-Zellen gegenüber dem Mikromilieu. Diese könnte eine kurzfristige Erhöhung der CAM-Expression ermöglichen, die nach erfolgter Transmigration im Gewebe moduliert wird. Es würden selektiv mehr CD4+ T-Zellen migrieren.

Der Zeitrahmen in dem sich eine aktivierte T-Zelle im Gewebe aufhält bevor sie wieder in die Zirkulation des Bluts oder der Lymphe eintritt beträgt wenige Minuten bis mehrere Tage (Westermann *et al.*, 1993, 1994; Ford, 1974). In dieser Phase werden CAMs nicht nur benötigt um den Arrest der Zellen im Gewebe zu vermitteln, sondern sie sind an der Antigenpräsentation, der Kostimulation, sowie der Proliferation beteiligt. Während der Transmigration durch das Gewebe werden CAMs hoch- oder runterreguliert (Luettig *et al.*, 2001), dabei werden CAMs von anderen Zellen absorbiert und internalisiert (Hwang *et al.*, 2000). Deshalb bestimmt zunächst die endotheliale Barriere welche Zellpopulationen das Gewebe infiltrieren können. Darauffolgend bestimmen die lokalen Gegebenheiten des Gewebes und die Interaktion der migrierenden T-Zelle mit dem Mikromilieu, ob und welche funktionellen Eigenschaften der einzelnen T-Zell Subpopulationen zum Tragen kommen (Abbas und Janeway, 2000; Abbas *et al.*, 1996; Van Parijs *et al.*, 1998).

Im Blut von Tumor- und Kontrollgewebsdonoren wurden 1-8% der CD4+ T-Zellen als CD25+ identifiziert. Dabei konnten im Tumordonor Blut durchschnittlich 1-2% mehr CD4+CD25+ Zellen festgestellt werden.

Die CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor- und Kontrollgewebe zeigten eine höhere Expression von B-7 Integrin und deutlich niedrigere Expression von CD62L, PSGL und LFA-1 als im Blut. Dabei war die LFA-1 Expression auf T-Zellen im Tumorgewebe höher als im Kontrollgewebe.

Da die LFA-1 Expression auf CD4+CD25+ Zellen im autologen Blut von Tumor- und Kontrollgewebsdonoren sehr hoch war, könnte die Interaktion mit ICAM-1 und ICAM-2 eine grundlegende Voraussetzung für die Infiltration in Gewebe sein (Faveeuw *et al.*, 2000; Worthylake und Burridge, 2001; Berlin-Rufenach et al., 1999). Die Interaktion des LFA-1 mit endothelial exprimiertem ICAM-1 und ICAM-2 könnte hierbei die stärkere Infiltration in Tumorgewebe vermitteln (Van Epps et al., 1989; Oppenheimer-Marks et al., 1991; Greenwood *et al.*, 1995; Shamri *et al.*, 2002). Dabei war die Expression von LFA-1 nach erfolgter Transmigration im Kontrollgewebe gesenkt (von 98% exprimierender T-Zellen im Blut auf 20% im Kontrollgewebe), während im Tumorgewebe die LFA-1 Expression auf einer großen T-Zell Population erhalten blieb (ca. 60%). LFA-1 führt eine Signaltransduktion über die Myosin-Kinase (myosin light chain kinase, MLCK) und über die Rho Kinase p160ROCK aus, welche Zellkontraktion und das Ablösen von der Matrix vermitteln (Smith et al., 2003). Zusätzlich führt LFA-1 Bindung zur Aktinpolymerisation an der aus Bewegungsrichtung festgestellten Vorderseite der Zelle (Porter et al., 2002), eventuell durch Phosphorilisierung von Vav1 (Riteau *et al.*, 2003). Außerdem inhibiert die LFA-1 Signaltransduktion die ß-1 Integrin vermittelte Signaltransduktion (Porter und Hogg, 1997). Die hohe Expression des B-1 Integrins im Gewebe hätte also schwächere funktionelle Bedeutung. Das ß-1 Integrin, wie auch das LFA-1 sind von Bedeutung für die T-Zell Aktivierung. ß-1 Integrin und LFA-1 können an verschiedene Regionen des Fibronektinss in der EZM binden (Guan et al., 1990), aber auch die Bindung an tumorreguliertes VCAM-1 ist möglich (Elices et al., 1990). Beide Liganden synergieren mit TZR-Signalen, wobei das LFA-1 bei der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration regulierend wirkt, während ß-1 Integrin sehr viel effektiver bei der Stimulation polarisierter Aktivierung ist, welche zu T-Zell vermittelter Apoptose in Zielzellen, beispielsweise Tumorzellen, führt (Ybarrondo et al., 1994). LFA-1 vermittelt eine Signaltransduktion über den Jun Aktivierungs-Domänen Transkriptionsfaktor (jun activation domain binding protein, (JAB-1)). JAB-1 ist assoziiert mit der Bildung des "Signalosoms", eine Proteinanreicherung die eine Bedeutung für Zellzyklusablauf und Zytoskelett-Regulation hat (Lyapina et al., 2001; Kurz et al., 2002). Aus diesen Gründen ist LFA-1 durch seine Signaltransduktion über verschiedene Kaskaden für die Migrationsabläufe und Chemotaxis der T-Zellen essentiell.

Ebenfalls könnte aber auch die Interaktion von ß-7 Integrin mit endothelial exprimiertem MAdCAM-1 oder VCAM-1 eine Rolle bei der verstärkten T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe spielen (Postigo *et al.*, 1993; Warnock *et* al., 1998; Bargatze et al., 1995). Die VCAM-1 Expression ist auf Tumorendothel im Vergleich zum Kontrollendothel signifikant erhöht. Im Blut von Kontroll- und Tumorgewebsdonoren exprimieren nur etwa 5-10% der CD3<sup>+</sup> T–Zellen ß–7 Integrin. Im Gewebe exprimieren aber 30–70% der CD3<sup>+</sup> T-Zellen das Integrin. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen exprimieren im Tumordonorblut und Tumordonorgewebe weniger ß-7 Integrin als im Kontrolldonor. Es wäre also möglich, das ß–7 Integrin exprimierende Zellen verstärkt in das Pankreasgewebe einwandern und sie dadurch in geringeren Zahlen im Blut zu finden wären. Im Kontrollgewebe ist die Expression des ß-7 Integrins auf T-Zellen sehr hoch (ca. 70% exprimierende Zellen), während sie im Tumorgewebe wesentlich niedriger war (ca. 32% exprimierende Zellen). CD4+ T-Zellen, welche ihr Antigen in intestinalen lymphoiden Geweben erkennen, erhöhen ihre ß-7 Integrin Expression (Campbell und Butcher, 2002). Außerdem erhöht die ß-7 Integrin Expression über E-Cadherin-Bindung die spezifische Interaktion von intra-epithelialen T-Zellen zu Zellen epithelialen Ursprungs (Cepek et al., 1993; Andrew et al., 1996; Higgins et al., 1998; Corps et al., 2001). Zusätzlich zeigt ß–7 Integrin Bindung stimulierende Auswirkung auf die Effektorfunktionen von T-Zellen (Sarnacki et al., 1992). Die festgestellte Expressionserniedrigung auf CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe, könnte also verminderte Interaktion mit Tumorzellen verursachen. Das ß-7 Integrin wird verstärkt von

Tregs exprimiert (Lehmann *et al.*, 2002) und seine Expression korreliert mit der Expression von CTLA-4 und der Suppression von T-Zell Proliferation *in vitro* (Lehmann *et al.*, 2002). Einige Ergebnisse aus Mausversuchen implizieren eine Rolle des ß-7 Integrins in der Lokalisation und Regulation der Tregs (Schön *et al.*, 2000). Diese Daten sprechen für eine T-Zell Subpopulations-spezifische Anreicherung im Tumor aufgrund ihrer LFA-1 und ß-7 Integrin Expression. Die Expressionsstärke wiederum könnte von funktioneller Bedeutung für einzelne Subpopulationen sein.

Eine differentielle Expression in Blut und Gewebe zeigte aber auch CD62L. Im Tumordonorgewebe wurde es von CD4+CD25+ Zellen deutlich schwächer exprimiert als im autologen Blut, aber stärker als auf CD4+CD25- Zellen im Tumordonorgewebe.

Da es im Blut für die Migration in die Lymphknoten verantwortlich ist (Gallatin *et al.*, 1983), könnte es sein, dass exprimierende Zellen hauptsächlich in Lymphknoten und nicht im Blut aufzufinden sind. GlyCAM-1 ein Ligand des CD62L wird unter anderem auch ins Blut segretiert. Da im physiologischen "Normalzustand" vor allem naive T-Zellen CD62L exprimieren, werden diese auch preferrentiell an Endothel binden und in das Gewebe infiltrieren (Hwang *et al.*, 1996).

Die Expression von CD62L war im Tumordonorgewebe auf den CD4+CD25+ Zellen höher als auf den CD4+CD25- Zellen. Die "kleinen Konsensus Wiederholungungs-Domänen" (*small consensus repeats*, SCR) des CD62L könnten eine funktionelle Rolle für die Bindungsaffinität und die Signaltransduktion der T-Zellen im Gewebe haben (Watson *et al.*, 1991; Jutila *et al.*, 1992). Bargatze *et al.* konnte 1994 beweisen, dass das CD62L essentielle Bedeutung für die Interaktion von T-Zellen mit Endothelzellen hat. Die Interaktion ist jedoch von der Ligandenexpression auf dem Endothel abhängig (Hallmann *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991; Spertini *et al.*, 1991).

Es gibt zwei verschiedene Formen des CD62L, die durch alternatives Spleißen entstehen (Camerini al.. 1989). Eine enthält et Form eine Transmembranregion, während die zweite über Form einen Phosphotidylinositol-Anker mit der Membran in Verbindung steht. Es existieren mehrere Beweise, dass das CD62L nach Aktvierung von Lymphozyten in löslicher Form segregiert wird (Kishimoto *et al.*, 1989; Jutila et al., 1989). Im Plasma non-maligner humaner Individuen lassen sich Konzentrationen von löslichem CD62L bis zu 1,6µg/ml finden. Diese Konzentration war ausreichend um die Leukozytenadhäsion an Zytokinstimuliertes Endothel zu blockieren (Schleiffenbaum et al., 1992). Also kann lösliches CD62L so wie lösliches VCAM-1 u.a. aktiv zur Modulation der T-Zell Adhäsion an aktiviertes Endothel beitragen (Gearing *et al.*, 1993). Da die CD62L Expression auf den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorblut höher ist als im Kontrollblut, könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass in das Kontrollblut mehr CD62L segregiert wird. Dies könnte sich durch niedrigere Membranexpression im Kontrollblut gegenüber dem Tumorblut bemerkbar machen. Über einen längeren Zeitraum hinweg könnte die höhere Expression des CD62L auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch durch Interaktion mit der erhöhten Anzahl an MAdCAM-1- oder CD62-E-Molekülen auf Tumorendothelzellen einen Migrationsvorteil verschaffen (Galkina *et al.*, 2003).

Die CD4+CD25+ T-Zellen exprimieren im Tumorgewebe nicht nur weniger CD62L, sondern auch weniger B-7 Integrin und weniger CD166 als im Kontrollgewebe. Die Expressionsreduktion dieser Proteine könnte durch schon erfolgte Bindung während der Transmigration stattgefunden haben (van Kooyk und Figdor, 2000; Stewart und Hogg, 1996; van Kempen et al., 2001). Wie zuvor für die Interaktionen mit CD62L beschrieben, spielt die ß-7 Integrin Interaktion mit endothelialem MAdCAM-1 oder VCAM-1 eine Rolle bei der verstärkten T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe (Postigo et al., 1993; Warnock et al., 1998; Bargatze et al., 1995). Die Expression des ß-7 Integrin Bindungspartners VCAM-1 ist auf Tumorendothel im Vergleich zum Kontrollendothel signifikant erhöht. Da die ß-7 Integrin Expression durch E-Cadherin-Bindung die spezifische Interaktion von intra-epithelialen T-Zellen zu Tumorzellen erhöht, könnte die erniedrigte Expression zur fehlenden Tumorzellbekämpfung beitragen (Cepek et al., 1993; Andrew et al., 1996; Higgins et al., 1998; Corps et al., 2001). Zusätzlich zeigt die ß-7 Integrin Bindung stimulierende Auswirkung auf die Effektorfunktionen von T-Zellen (Sarnacki et al., 1992). Die Expressionserniedrigung im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe könnte also eine fehlende Stimulation bei der Aktivierung der T-Zell Effektorfunktionen verursachen. Nicht zuletzt zeichnen sich die T-Zellen im Tumorgewebe durch signifikant erniedrigte P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (PSGL)-Expression im Vergleich zur Blutexpression aus. PSGL bindet CD62-P, CD62L und CD62-E (Steegmaier et al., 1997; Borges et al., 1997; Spertini et al., 1996; Sako et al., 1993; Moore et al., 1994). Seine Expression hat somit weitreichende Kapazitäten bei der T-Zellmigration und der endothelialen Interaktion im Speziellen (Hirata et al., 2000).

CD166 vermittelt sowohl eine homophile (CD166-CD166), wie auch eine heterophile Bindung (CD166-CD6). Es ist mit dem Aktinzytoskelett verankert und wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Für gewöhnlich ist es auf Zellen beschränkt, die Bedeutung in Entwicklung, Proliferation, Migration, Immunantwort oder Tumorprogression haben. Es gibt mehrere Beweise dafür, dass die CD166 Expression eine zelluläre homöostatische Regulation reflektiert, die entweder Proliferationsarrest oder Zellmigration (bei hohen Expressionsraten) induziert (Swart, 2002). In Tumorgeweben wurde der homophilischen Bindung von CD166 ebenfalls eine Rolle in Tumorwachstum und Tumorzellmigration zugeschrieben (Degen et al., 1998; van Kempen et al., 2001). Überexpressionsstudien auf Tumorzellen beweisen, dass das CD166 die Migration der Zellen fördert und das Primärwachstum des Tumors in Gewebsinvasion umwandelt (van Kempen, 2001; van Kempen *et al.*, 2001). Dabei spielt *in vivo* scheinbar auch die Spaltung des CD166 eine Rolle. Die Spaltung wird durch Proteinasen vermittelt (van Kempen, 2001). Sehr viele Proteinasen sind in Tumorgeweben überexprimiert (McCawley und Matrisian, 2001; Sternlicht und Werb; 2001). Daher kann angenommen werden, das die CD166 involvierte proteolytische Kaskade und die CD166 Expression eine Schalterfunktion im Gewebe erfüllen, die vom Mikromilieu reguliert wird. Dabei induziert CD166 Bindung eine Entwicklungsphase in den Zellen, welche die Proliferation und die Migration gezielt beeinflusst (Swart, 2002). Da auf den tumorinfiltrierenden CD4+ T-Zellen weniger CD166 exprimiert wird als im Kontrollgewebe, kann angenommen werden, das auch die migratorischen Eigenschaften der Tregs eingeschränkt sind. Bei der Transmigration von CD4+ T-Zellen durch das Endothel, werden diese zu verstärkter Proliferation induziert und zeichnen sich durch Langlebigkeit aus (Borthwick et al., 2003). Dies würde eine selektive Anreicherung der Tregs im Tumorgewebe unterstützen.

Im Kontrollgewebe zeigten CD4+CD25+ Zellen höhere Expressionsraten von ß-7 Integrin, CD62L, CD6, CD56 und CD166. Die hohe Dichte der CAMs auf den T-Zellen im Kontrollgewebe sorgt wahrscheinlich für verstärkte Motilität und Migration durch Interaktion mit Proteinen der EZM (Tysnes et al., 1996; Dulude al., 1999; Davenport et al., 2000). Dabei werden et Signaltransduktionswege aktiviert, die das Zytoskelett modulieren. Die lokomotorischen Eigenschaften Steigerung der nach CAM-Expressionserhöhung können durch die Endothelzell-Zeitrafferaufnahmen belegt werden (siehe 5.3).

Die Erniedrigungen der Expressionen von ß–7 Integrin, CD62L, CD6, CD56 und CD166 auf CD4+CD25+ im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe verursachen dementsprechend eine abgeschwächte Motilität und Migrationskapazität. Außerdem könnte auch die Überlebensdauerder der CD4+CD25+ Zellen positiv beeinflusst werden (Tchilian et al., 1997). Dies könnte in einem längeren Aufenthalt und intensiver Funktionalität der CD4+CD25+ Zellen im Tumorgewebe resultieren. Die abgeschwächte CAM-Expression im Tumorgewebe hat allerdings nicht nur Auswirkung auf lokomotorische Sie lokale Eigenschaften. modifiziert auch die Zytokinproduktion (Takamoto et al., 1998), beeinflusst die T–Zell Proliferation (Engelhardt et al., 1998) und die Apoptose-Induktion (Tchilian *et al.*, 1997).

#### 5.4.2 Die Zytokine im Tumormikromilieu bestimmen den funktionellen Kontext infiltrierender Zellen

Ausschlaggebend für die Funktionalität der Tregs ist ihre Zytokinexpression und Segregation, wie auch das Milieu in dem sie vorliegen (Scheffold *et al.*, 2005; Huehn et al., 2004; Belkaid und Rouse, 2005). Die Komposition der EZM beträchtlich zwischen verschiedenen Geweben variiert und pathologischen Situationen (Streuli, 1999; Jones und Salgaller, 2000; Huang und Ingber, 1999). Da breitgefächerte Interaktion mit der EZM bei der Infiltration von T-Zellen in das Gewebe stattfinden (Aplin *et al.*, 1998; Plow *et* al., 2000; Henry und Campbell, 1998; Woods und Couchman, 2000) und die EZM-Komposition vom Zytokinmilieu in den Geweben abhängig ist, ist die Identifikation der lokalen Zytokinexpression wichtig für das Verständnis des funktionellen Kontext der T-Zellen.

Tregs spielen ihre funktionellen Eigenschaften erst nach Aktivierung aus (Scheffold *et al.*, 2005). Dabei sind TGF-ß und IL-10 die beiden wichtigsten inhibitorischen Zytokine die von Tregs exprimiert und segregiert werden.

In den von uns getesteten Tumorgeweben konnten im Vergleich zu den Kontrollgeweben erhöhte TGF-ß Konzentrationen festgestellt werden (50pg pro 50µg Kontrollgewebe und 179pg pro 50µg Tumorgewebe). Um die funktionelle Relevanz der infiltrierenden Tregs im Gewebe nachzuweisen, wurde mit immunhistologischen Untersuchungen festgestellt, welche Zellen die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$  und welche die antiinflammatorischen Zytokine TGF-ß und IL-10 exprimieren. Es wurden Fibroblasten, Endothelzellen, Epithel- bzw. Tumorzellen, Dentritische Zellen und T-Zellen getestet.

Die Ergebnisse zeigten differentielle Zytokinexpressionen im Tumorgewebe. In der Gesamtheit wurden im Tumorgewebe wesentlich mehr antiinflammatorische Zytokine exprimiert, während die Expressionsraten der pro-inflammatorischen Zytokine unverändert blieben. Die antiinflammatorischen Zytokine wurden hauptsächlich von Endothelzellen und T-Zellen aber auch von Tumorzellen produziert (Tabelle 4.2). Nachdem nun identifiziert war, dass die T-Zellen einen erheblichen Anteil der antiinflammatorischen Zytokine produzieren, musste festgestellt werden, ob es sich hierbei um Tregs handelt.

In Folgeversuchen konnte gezeigt werden, dass Tregs und nicht CD4+CD25-Zellen im Tumorgewebe signifikant mehr IL-10 und TGF-ß exprimieren als im Kontrollgewebe. Damit konnte eine Treg selektive Ausschüttung von Zytokinen im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Beide Zytokine sind Schlüsselmoleküle bei dem Mechanismus der Suppression (Shevach, 2002; Sundstedt *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005).

Damit wurde bewiesen, dass die selektive Anreicherung von Tregs im Tumorgewebe mit der Expressionssteigerung von TGF-ß und IL-10 einhergeht. Beide Zytokine werden wahrscheinlich auch verstärkt segregiert, da sie in immunhistologischen Untersuchungen auch im interzellulären Raum lokalisiert werden konnten.

Es ist daher davon auszugehen, dass die massive selektive Treg Infiltration auch eine funktionelle Aufgabe im Gewebe erfüllt.

5.4.3 Der Treg Anteil im Gewebe korreliert invers zum CD8+ T-Zell Aktivierungsstatus (CD69 Expression)

Das CD69 Protein ist ein typischer Aktivierungsmarker für T-Zellen. Es wird in einem Zeitfenster von wenigen Stunden nach der Aktivierung von T-Zellen auf deren Membran exprimiert. Die Expression von CD69 auf CD8+ T-Zellen kann einen Hinweis auf spätere zytotoxische Funktionalität der Zellen geben. Durch immunhistologische Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine hohe Anzahl von Tregs im Tumorgewebe mit einem niedrigem Anteil von CD8+CD69+ T-Zellen an der gesamten CD8+ Population im identischen Gewebe korreliert. Die umgekehrte Relation zeigt sich in Geweben, die eine geringere Anzahl an infiltrierten Tregs aufweisen (Kontrollgewebe). Dabei bleibt die Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen jeweils nahezu gleich.

Die CD69-Expressionssenkung auf den tumorinfiltrierenden CD8+ T-Zellen verdeutlicht einen differenziellen Aktivierungsstatus im Tumorgewebe. Dieser Aktivierungsstatus kann durch verschiedene Mechanismen beeinflusst werden:

- 1. Die hohe Anzahl von Tregs im Tumorgewebe könnte durch direkten Zell-Zellkontakt über CTLA-4 ein inhibitorisches Signal an CD8<sup>+</sup> vermitteln. Dies würde dazu führen, dass kostimulatorische Signale nicht transduziert werden. Durch fehlende Transduktion der kostimulatorischen Signale kann die Zelle keine Aktivierung erfahren (Sakaguchi, 2001; Shevach, 2002; Wood und Sakaguchi, 2003). Dabei bliebe jedoch die Zahl der gesamt-infiltrierenden Zellen gleich, nur die Anzahl der Tregs würde sich erhöhen.
- 2. Die hohe Anzahl der Tregs im Tumorgewebe könnte durch verstärkte Ausschüttung von inhibitorischen Zytokinen wie TGF-ß und IL-10 zu einer Inhibierung der CD8+ T-Zellen im Gewebe führen (Fahlen *et al.*, 2005; Annacker *et al.*, 2001; Levings *et al.*, 2002; Jonuleit *et al.*, 2000; Sundstedt *et al.*, 2003). Da die TGF-ß Rezeptoren im Pankreasgewebe in proliferativen Phasen hochreguliert werden (Friess *et al.*, 1998), hätte die Segregation von Treg-produziertem TGF-ß größere Potenz zur Suppression. So werden nachweisbar die IFN-γ Produktion und die Proliferation von CD8+ T-Zellen suppremiert (Endharti *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2001; Pontoux *et al.*, 2002).

Eine gezielte Erniedrigung der Treg Anzahl im Gewebe könnte somit ein therapeutisches Mittel sein, um den Aktivierungsstatus der tumorspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T–Zellen zu verbessern. Für die Infiltration der Tregs in das Tumorgewebe sorgt ein bestimmtes CAM– Expressionsmuster. Ein besseres Verständnis der Treg selektiven CAM– Expression könnte also eine Möglichkeit bieten, tumorselektive Treg Akkumulation durch CAM–Blockade zu inhibieren und die zytotoxischen Funktionen der tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T–Zellen zu verbessern (Liyanage *et al.*, 2002; Huehn *et al.*, 2004; Curiel *et al.*, 2004).

#### 5.5 Die selektive Steigerung der Treg-Adhäsionskapazität an Tumorendothel *in vitro*

Die angesprochenen Mechanismen der CAM-, Zytokin- und Chemokinregulation resultieren in geänderten Adhäsionseigenschaften von T-Zellen (Loetscher *et al.*, 2000). Dabei wird die Adhäsion durch Aktivierung verschiedener CAMs und deren Bindung an die jeweiligen Liganden vermittelt (Roth *et al.*, 1995).

Das Spheroidmodel, dass für die in vitro Adhäsionstests genutzt wurde, hat den Vorteil, die physiologischen Bedingungen besser imitieren zu können. Dabei ist die dreidimensionale Kultivierung der Endothelzellen von essentieller Bedeutung. In diesem System adhärieren die Zellen nicht an einen artifiziellen- sondern einem adhäsiven Untergrund aus ihres Gleichen. Prozesse die der Zell-Zell-Interaktion dienen erfolgen somit angenähert an die physiologische Situation, in der die Endothelzellen auf der Basallamina wachsen. Die Mantelfläche der Spheroide wird aus einer Einzelschicht aneinandergereihter Endothelzellen formiert (Abbildung 4.41). Zusätzlich erlaubt die Spheroidkultivierung der Endothelzellen den direkten Vergleich von Tumor- und Kontrollendothelzellen im gleichen Ansatz, mit dem gleichen Medium, den gleichen Wachstumsfaktoren, also unter gleichen Bedingungen. Die Adhäsionsmodulationen der T-Zellen beruhen also auf der jeweiligen T–Zell Subpopulation (CD4+CD25+ Interaktion der oder CD4+CD25-) mit der jeweiligen Endothelspezies (Tumoroder Kontrollendothel).

Die Adhäsionsversuche wurden mit T-Zell Subpopulationen aus jeweils dem gleichen Spender durchgeführt. Die Subpopulationen konnten durch unterschiedliche Fluorochrommarkierung getrennt voneinander ausgezählt werden. Die Kontrollendothelien wurden vor den Versuchen mit autologem PBMZ-Lysat und die Tumorendothelien mit autologem Tumor-Lysat kultiviert.

Die Berechnung des Anteils der Spheroid-adhärierenden CD4+CD25+ und CD4+CD25- Zellen zeigte eine selektive Adhärenzverstärkung (ca. 5-fach) von CD4+CD25+ Zellen an Tumorendothelzellen. Diese Steigerung war selektiv für CD25+ Zellen und zeigte sich nur bei Adhäsion an Tumorendothelzellen. Da sich die Tumorendothelzellen im Vergleich zu den Kontrollendothelzellen durch verstärkte Expression von ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 und CD166 auszeichneten, ist anzunehmen, dass die jeweiligen Liganden LFA-1, ß-7 Integrin, CD166 und CD6 auf Tregs eine Rolle bei der

Vermittlung dieser Adhäsionssteigerung spielen. Es ist bekannt, dass T-Zell Subpopulationen nach Aktivierung ihre Adhäsionskapazität durch LFA-1/ICAM-1 Wechselwirkung steigern (Crucian *et al.*, 2006; Marvin *et al.*, 1998; Shimizu et al., 1991; van Kooyk et al., 1989). Ebenso führt die Interaktion durch ß–7 Integrin zu einer Adhäsions– und Migrationssteigerung von Tregs (Lehmann et al., 2002; Stassen et al., 2004) und ist außerdem wichtig für die gezielte Migration der Tregs in inflammatorisches Gewebe (Suffia et al., 2005). Außerdem charakterisiert die Hochregulation von ß-7 Integrin eine getrennte Treg-Subpopulation die sich durch gesteigerte Expression inhibitorischer Zytokine (IL-10 und TGF-ß) auszeichnet (Stassen *et al.*, 2004). CD166 wird vor allem auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Joo et al., 2000). Die homophilische Bindung von CD166 oder die Bindung an CD6, wird mit der T-Zell-Leukozyten Interaktion in Verbindung gebracht (Bowen et al., 1995). Die Bindung an CD6 erhöht beispielsweise die adhäsiven Fähigkeiten von Thymozyten und Endothelzellen (Skonier et al., 1996; Buttiglieri et al., 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die optimale T-Zell-Aktivierung die Bindung von CD6 an CD166 voraussetzt (Hassan *et al.*, 2004). Zusammenfassend regulieren die angesprochenen Proteine die Aktivierung und die adhäsiv-migratorischen Kapazitäten der T-Zellen und könnten somit bei Interaktion mit dem Tumorendothel zu einem pro-migratorischen Phänotyp führen.

Die Adhärenz der Tregs (CD4+CD25+) an das Tumorendothel bestimmt nur die erste Phase der Transmigration. Die Adhärenz ist notwendig, aber nicht hinreichend für die nachfolgende Transmigration.

#### 5.6 Die selektive Steigerung der Treg-Transmigrationskapazität durch Tumorendothel *in vitro*

Nicht alle am Endothel adhärierenden Zellen werden ausreichend aktiviert um eine transendotheliale Migration durchzuführen. Um das Migrationsverhalten der T-Zellen zu untersuchen, wurden Transmigrationstests durchgeführt. Zunächst benötigen die migrierenden Zellen in einem *in vitro* Ansatz einen chemotaktischen Gradienten, der es den Zellen ermöglicht, durch Aktivierung die endotheliale Barriere zu überwinden. Dabei bietet sich SDF-1 (*stromal derived factor-1*) als physiologisch vorkommendes chemotaktisches Molekül an. Um in den Transmigrationsversuchen physiologische Bedingungen einzuhalten, wurden Kontrollendothelien mit autologem PBMZ-Lysat kultiviert und Tumorendothelien mit autologem Tumor-Lysat. Die *in vitro* Transmigrationsversuche zeigten zunächst, dass die basale Transmigration von Endothelzellen (Kontrolle) vernachlässigbar gering war. Somit konnten spätere Effekte alleinig auf die T-Zell Migration zurückgeführt werden.

In allen Ansätzen migrierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen die unspezifisch mit CD3 und CD28 Antikörpern aktiviert wurden verstärkt durch das jeweilige Endothel. Die Migrationsraten durch Tumorendothel waren ebenfalls stets höher als durch Kontrollendothel. Dabei waren die Migrationszahlen weiter erhöht, wenn das Endothel zusätzlich stimuliert wurde (TNF-α oder Gewebe-Lysate).

Die größten quantitativen Unterschiede an migrierenden CD3<sup>+</sup> T–Zellen zwischen Tumor– und Kontrollendothel–Migration zeigten sich, wenn die Endothelien mit den jeweiligen Lysaten behandelt wurden und die T–Zellen zusätzlich stimuliert wurden. Wahrscheinlich induzieren Moleküle im Tumor– Lysat, genauso wie TNF– $\alpha$ , die Aktivierung der CAM–Expression, der Chemokinexpression und/oder der Zytokinexpression der Tumorendothelzellen (Galkina *et al.*, 2003). Die aktivierten T–Zellen werden durch ihre gesteigerte Expressionsdichte besser mit den Endothelien interagieren können, was zur gesteigerten Transmigration führen kann und auch eine gesteigerte Adhärenz erklären würde.

Bei der Bestimmung der *ex vivo* Expressionsmuster von CD4+ und CD8+ Zellen im peripheren Blut war festzustellen, dass neben den in beiden Subpopulationen hoch exprimierten CAMs PSGL, ß-1 Integrin, LFA-1 und CD6 auch eine erhöhte Expression von CD62L und ß-7 Integrin sowie CD24 vorlag. Diese Proteine könnten bei den *in vitro* Transmigrationen essentielle Bedeutung bei der Subpopulations-spezifischen Migration haben.

Die Transmigration der Subpopulationen verdeutlichte, wie für die CD3<sup>+</sup> T– Zellen ebenfalls festgestellt, eine erhöhte Transmigrationsrate durch Tumorendothel (2–fach höher). Dabei migrierten die CD4<sup>+</sup> T–Zellen deutlich stärker durch das Tumorendothel als durch das Kontrollendothel. Hierbei ist anzunehmen, dass das tumoradaptierte Expressionsmuster der Tumorendothelzellen selektiv die Migration der CD4<sup>+</sup> T–Zellen begünstigt, indem es die passenden Bindungspartner für die T–Zell Liganden exprimiert. Da die CD8<sup>+</sup> Zellmigration nicht stark beeinflusst wird, ist in der Hauptsache von einem selektiven Effekt zu sprechen.

Nahezu die gleichen Effekte lassen sich bei einem Transmigrationsvergleich von CD4+CD25+ Zellen mit CD4+CD25- Zellen erkennen. Es kommt zu einer erhöhten Transmigration durch Tumorendothel. Die Gesamtzahlen der migrierten Zellen liegen bei den aufgereinigten CD4+CD25+ und CD4+CD25Zellen höher, als bei den CD4+ und CD8+ Populationen. Das heißt, sie Populationen scheinen gegenüber den CD8+ einen deutlichen Migrationsvorteil zu haben. Die stärkste Migrationsrate zeigen CD4+CD25+ Zellen, die durch das Tumorendothel migrieren. Wie schon zuvor erwähnt, könnten die CAM-Expressionsunterschiede der Subpopulationen bei Kontakt mit dem Endothel oder nach Aktivierung durch endothelial-segregierte Faktoren hierfür verantwortlich sein (Rosenkilde und Schwartz, 2004). Da die CD4+CD25+ Population vor und nach transendothelialer Migration zu etwa 70% FoxP<sub>3</sub> exprimiert, ist anzunehmen, dass es sich bei den transmigrierten Zellen zum Großteil um Tregs handelt. Die gesteigerte

Transmigration der Tregs durch Tumorendothel wird u.a. durch CAMs, die auf T-Zellen und Endothelzellen exprimiert werden, vermittelt.

#### 5.7 Die funktionelle Relevanz der CAMs bei der Treg-Transmigration *in vitro*

funktionelle Um die Relevanz der CAMs wurden zu testen. Transmigrationstests durchgeführt, bei denen einzelne CAMs durch blockierende Antikörper in ihrer Bindungskapazität ihrem und darauffolgenden Signalweg inhibiert wurden. Dazu wurden einerseits die Endothelzellen und andererseits die T-Zellen blockiert. Die T-Zellen mussten dazu 4h vor der Transmigration mit dem jeweiligen Antikörper blockiert werden. Die Endothelien auf der Transmigrationsmembran wurden auf die gleiche Art behandelt. Zusätzlich wurden die Kontrollendothelzellen jedoch mit PBMZ-Lysat und die Tumorendothelzellen mit Tumor-Lysat kultiviert, bevor die Antikörper zugegeben wurden. Diese Behandlung sollte das Mikromilieu des Tumors imitieren. Nach 4h Inkubation wurden die Zellen gewaschen um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Danach konnte die Transmigrationsphase (24h) beginnen und die T-Zellen wurden in die Transmigrationskammern zugegeben.

Nachdem die Kontrollen den korrekten funktionellen Ablauf des Tests bestätigten, konnte festgestellt werden, dass bei der Transmigration durch blockiertes Kontrollendothel 7 von 9 Antikörpern zu einer stärkeren Transmigrationsblockade von Tregs im Vergleich zu CD4+CD25- Zellen führte. Die höchste Inhibition fand durch anti-MAdCAM-1 Ab statt. Im Vergleich zu den CD4+CD25- Zellen inhibierten anti-CD62-E Ab, anti-ICAM-2 Ab und anti-MAdCAM-1 Ab die Tregs signifikant stärker. Bei der Transmigration durch blockiertes Tumorendothel führten 8 von 9 Antikörpern zu einer höheren Blockade der Tregs, dabei waren die Unterschiede für die Blockade mit anti-CD62-E Ab, anti-MAdCAM-1 Ab, anti-VCAM-1 Ab und anti-CD166 Ab signifikant.

Die Blockade-Experimente zeigten, dass die Treg-Transmigration deutlich stärker von den genannten CAMs abhängig ist. Dabei sind die Effekte auf Tumor- und Kontrollendothel zu sehen, allerdings sind die Blockaden viel effektiver auf Tumorendothel (maximale Inhibition: 50% durch anti-MAdCAM-1 Ab). Die stärkere Transmigration der Tregs durch Tumorendothel scheint vor allem durch CD62-E, MAdCAM-1, VCAM-1 und CD166 vermittelt zu sein. Ihre Blockade führt zu signifikant höheren Inhibitionen von Tregs. Dabei ist die minimale Inhibition (anti-CD166 Ab: 28%) höher als die höchste CD4+CD25- Zell Blockade (anti-VCAM-1 Ab: 26%).

Die jeweiligen Bindungspartner dieser CAMs, also CD62L (für CD62-E und MAdCAM-1), ß-7 Integrin (für MAdCAM-1 und VCAM-1) und CD166 (für homophile Bindung an CD166), wurden auf den CD4+CD25- Zellen und auf den Tregs blockiert. Interessanterweise wurde die Transmigration durch Kontroll- und Tumorendothel von allen eingesetzten Antikörpern spezifisch geblockt. Die Transmigration durch das Kontrollendothel zeigte signifikant höhere Inhibition bei der anti-CD62L Ab blockierten Treg Migration. Allerdings führte diese Blockade nur zu einer Inhibition der Transmigration von 13%. Im Vergleich dazu führten alle drei Antikörper zu signifikant Treg-Transmigrationsinhibition durch Tumorendothel. höherer Die Inhibitionsstärken lagen zwischen 25% und 45% und damit deutlich höher als beim Kontrollendothel-Ansatz.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Transmigration der Tregs teilweise durch die genannten CAMs vermittelt wird. Sie kann teilweise selektiv blockiert werden. Dabei scheint die höhere Transmigrationskapazität der Tregs durch Tumorendothel durch die endotheliale Expression von CD62-E, MAdCAM-1, VCAM-1 und CD166 vermittelt zu sein. Die Blockade der jeweiligen Liganden auf den T-Zellen, führt ebenfalls zu einer massiven Blockade der Transmigration.

Mit der Blockade dieser CAMs, in Kombination oder einzeln, könnte eine selektive Treg-Infiltrationsínhibition bei der Infiltration in Tumorgewebe erreicht werden.

#### 5.8 Die funktionelle Relevanz der CAMs bei der Treg-Transmigration *in vivo*

Da aus den Transmigrationstests *in vitro* deutlich hervorging, dass das Tumorendothel die selektive Transmigration der Tregs fördert, sollte getestet werden, ob autologe Tregs *in vivo* ebenfalls eine stärkere Infiltration in ein von Tumorendothel abgegrenztes peripheres Kompartiment zeigen.

Das periphere Kompartiment sollte der räumlichen Imitation eines Tumorgewebes dienen. Dazu wurde ein Transmigrations-Kammersystem genutzt, welches die Transmigration durch eine endothelbeschichtete Membran zulässt, so dass jede Kammer-infiltrierende Zelle mit dem Endothel in Kontakt gestanden haben muss.

Das NOD/SCID Mausmodell ermöglicht es, die injizierten Zellen in der Kammer wiederzufinden und zu quantifizieren.

In den *in vivo* Ansätzen konnte gezeigt werden, das die CD3<sup>+</sup> T-Zellen stärker durch Tumorendothel migrieren, als durch Kontrollendothel. Die Anzahl der migrierenden Zellen war noch höher wenn die Endothelien mit PBMZ- oder Tumor-Lysat vorbehandelt wurden. Dieser Effekt verdeutlicht, dass das Tumorendothel eine höhere Dichte an CAMs exprimiert, die zu einer gesteigerten T-Zell Infiltration führen könnte. Es konnte *in vitro* bewiesen werden, dass die endotheliale Expression der CAMs durch die Gabe von PBMZ- oder Tumor-Lysat erhöht wird. Ein Effekt, der wahrscheinlich auf aktivierenden Molekülen in den Lysaten, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, und Chemokine, beruht (Galkina *et al.*, 2003). Die Aktivierung der Endothelzellen mit dem jeweiligen Lysat (Kontrollendothel: autologes PBMZ-Lysat; Tumorendothel: autologes Tumor-Lysat) führte, vor allem beim Tumorendothel, zu einer gesteigerten Transmigrationsrate, die signifikant von den transmigrierten Zellzahlen durch Kontrollendothel abweicht.

Zusätzlich bestätigten die *in vivo* Versuche die *in vitro* erhobenen Daten zur selektiven Transmigration der Tregs durch Tumorendothel. *In vivo* zeigte sich nicht nur eine selektiv höhere Migrationsrate von CD4<sup>+</sup> T–Zellen durch Tumorendothel, sondern auch eine stärkere Migration von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T–Zellen, die zu 75% FoxP<sub>3</sub> exprimierten und damit phänotypisch als Tregs identifiziert wurden. Dabei migrierten mehr T–Zellen durch Lysat–behandelte Endothelien als durch unbehandeltes Endothel.

In Folgeversuchen sollte nun geklärt werden, ob die *in vitro* identifizierten Treg exprimierten CAMs CD62L, ß-7 Integrin und CD166, auch *in vivo* eine funktionelle Rolle bei der Treg-Transmigration spielen. Die blockierenden Antikörper zeigten wie schon *in vitro*, größere Effekte auf die Treg-Migration als auf die Migration von CD4+CD25- Zellen. Die Blockaden mit anti-CD62L und anti-ß-7 Integrin Antikörpern, führte sogar zu einer signifikant schwächeren Transmigration von Tregs durch Kontrollendothel. Dabei war die Blockade allerdings schwach und betrug maximal 16%.

Alle drei Antikörper zeigten starke selektive Inhibition der Treg-Transmigration durch Tumorendothel (zwischen 32% und 52%). Hier ist wie bei den *in vitro* Versuchen davon auszugehen, dass die Expressionsmuster der Tregs sie selektiv begünstigen durch Tumorendothel zu migrieren. Dieser Effekt könnte durch tumorspezifische Aktivierung der Endothelien ausgelöst werden, die daraufhin ihr Expressionsmuster dem Tumorgewebe anpassen müssen. Ebenso könnten die Endothelzellen dazu induziert werden, lösliche Aktivatoren (Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren) zu exprimieren und zirkulierenden zu segregieren, die in Tregs zu gesteigerter Transmigrationskapazität führen.

#### 5.9 Schlußfolgerung

Das Pankreaskarzinom ist ein sehr aggressiver Tumor, der durch das Fehlen erfolgreicher Bekämpfungsmethoden eine dringende Notwendigkeit neuer Therapieansätze aufzeigt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Tumormikromilieu im Pankreaskarzinom verschiedenen Modulationen unterliegt, die scheinbar die Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen durch tumorinfiltrierende zytotoxische T-Zellen erschwert. Neben einer gesteigerten Vaskularisierung im Tumorgewebe, die der besseren Versorgung der hoch-proliferativen Tumorzellen dient, kommt es zu Anpassungen der endothelialen CAM-Expressionsmuster, die die Infiltration immun-inhibitorischer Tregs fördert. Die Treg selektive Tumorinfiltration hängt dabei *in vitro* und *in vivo* besonders von Interaktionen von CD62L, ß-7 Integrin und CD166 mit ihren Bindungspartnern MAdCAM-1, VCAM-1, CD62-E und CD166 auf den Tumorendothelien ab.

Die gezielte Blockade dieser Proteinfunktionen konnte die Treg-selektive Transmigration durch Tumorendothel inhibieren.

Dieser Ansatz könnte zukünftig im Tumorgewebe zu einer Treg-selektiven Infiltrationsblockade führen, während die notwendigen inhibitorischen Effekte in nicht-pathologischen Geweben erhalten bleiben würden. Dies könnte zur Steigerung der zytotoxischen Funktionalität im Tumor führen, ohne eine Auto-Immunität auszulösen.

### Abkürzungsverzeichnis

3	millimolarer Extinktionskoeffizient
ΔE	Extinktionsänderung
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
AB	humane AB Blutgruppe
Ab	Antikörper ( <i>antibody</i> )
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper abhängige-zelluläre Zytotoxizität
ADP	Adenosindiphosphat
АМР	Adenosinmonophosphat
APC	antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
АТР	Adenosintriphosphat
BC	B Lymphozyt, B–Zelle ( <i>B cell</i> )
Bcl	B-cell leukemia/lymphoma
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
САМ	Zelladhäsionsmolekül ( <i>cell adhesion molecule</i> )
CCR7	chemokine (C–C motif) receptor 7
CD	Differenzierungsgruppe ( <i>cluster of differentiation</i> )
CDR	complementarity-determining region

CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
СМ	Central-Memory
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
срт	counts per minute
CTL	zytotoxische T Lymphozyten ( <i>cytotoxic T lymphocytes</i> )
Су	Cyanin
Cy3	Cyanin-3-gekoppelt
Cy5	Cyanin-5-gekoppelt
D	Schichtdicke
d	Tage ( <i>days</i> )
d. h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DZ (DC)	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EZ (EC)	Endothelzelle ( <i>endothelial cell</i> )
ECBM	Endothelzell Basal Medium ( <i>endothelial cell basal medium</i> )
ECGS	Endothelzell Wachstumssupplement ( <i>endothelial cell growth supplement</i> )
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELISpot	Enzym-gekoppelter Immunosorptions-Punkt ( <i>enzyme-</i> <i>linked immunosorbent spot</i> )
EM	Effector–Memory

End	Immunglobulin G; Endobulin
Ep-CAM	epitheliales Zelladhäsions Molekül ( <i>epithelial cell adhesion molecule</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
Fab	Fragment of antibody binding
FACS™	Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation ( <i>fluorescence-</i> <i>activated cell sorter</i> )
Fc	Fragment crystallisable
FcR	Fc-Rezeptor
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Eisen(III)–oxid
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Eisen(II, III)–oxid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	forward scatter
G	Guanin
g	Gramm
GlyCAM	glycosylation-dependent cell adhesion molecule
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor ( <i>granulocyte and monocyte colony stimulating factor</i> )
н	Homogenisationsfaktor
h	Stunden ( <i>hours</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDMEC	humane mikrovaskuläre Haut-Endothelzellen ( <i>human</i> <i>dermal microvascular endothelial cells</i> )
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin Ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen ( <i>human leukocyte antigen</i> )
ICAM	intercellular adhesion molecule-1
IFN-γ	Interferon–γ
lg	Immunglobulin

IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaar
KCI	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO₃	Kaliumhydrogenkarbonat
КМ	Knochenmark
КММС	Knochenmark mononukleäre Zellen
КМТС	Knochenmark T Zellen
L	Liter
LAK	Lymphokin-aktivierte Killer-Zelle
Lck	lymphocyte protein tyrosine kinase
LFA	lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	long terminal repeats
М	Mol
mA	Milliampere
MACS	Magnetic activated cell sorter
mAK	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
МНС	Haupthistokompatibilitäts Komplex (major
	histocompatibility complex)
min.	Minuten
ml	Milliliter
MLK	Multilamilläre Körperchen
mm	Millimeter
mM	Millimol

MPC	magnetic particle concentrator
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleinacid</i> )
MUC-1	Mucin-1
MW	Mittelwert
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ΝϜκΒ	Kernfaktor-кВ ( <i>nuclear-factor-кВ</i> )
NF-AT	nuclear factor of activation in T cell
ng	Nanogramm
NH4Cl	Ammoniumchlorid
NK	natürliche Killer Zellen
nm	Nanometer
NOD	Non-obese diabetes
nTZ	naive T-Zelle
°C	Grad Celsius
OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenylenediamine-Dihydrochlorid
Р	Patient
РВ	peripheres Blut
РВМС	periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
РВТС	periphere Blut T–Zellen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor ( <i>platelet derived growth factor</i> )

PE	R–Phycoerythrin
pg	Pikogramm
рН	potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Kettenreaktion ( <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> )
S.	Seite
s.	siehe
s.c.	subkutan ( <i>sub cutane</i> )
SCID	Severe combined immunodeficiency
sec	Sekunden
SLC	secondary lymphoid tissue chemokine
SLO	sekundär lymphatische Organe
SSC	side scatter
STABW	Standardabweichung
ТАА	Tumor-assoziiertes Antigen ( <i>tumor associated antigen</i> )
Tab.	Tabelle
$TGF-\alpha/\beta$	Transformations-Wachstumsfaktor- $\alpha/\beta$ ( <i>transforming growth factor-<math>\alpha/\beta</math></i> )
TH-Zellen	T-Helfer Zellen
TLR	toll-like receptor
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TZ	T-Lymphozyten, T-Zellen ( <i>T cells</i> )
TZR	T–Zell Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
U	Einheiten ( <i>unit</i> )

UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	volume
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular</i> <i>endothelial growth factor</i> )
<i>VS.</i>	versus
w	weight
z.B.	zum Beispiel

### Literaturverzeichnis

Abbas, A.K. 1996. Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell*. 84:655-7.

- Abbas, A.K., and C.A. Janeway, Jr. 2000. Immunology: improving on nature in the twentyfirst century. *Cell.* 100:129-38.
- Ager, A. 1994. Lymphocyte recirculation and homing: roles of adhesion molecules and chemoattractants. *Trends Cell Biol.* 4:326-33.
- Albeda, F.W., J. van der Meer, and E. Vellenga. 1991. Vascular proliferation as an unusual cause of hemorrhagic diathesis in myelofibrosis. *Am J Clin Pathol*. 95:564-6.
- Albelda, S.M., and C.A. Buck. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J.* 4:2868-80.
- Andrew, D.P., L.S. Rott, P.J. Kilshaw, and E.C. Butcher. 1996. Distribution of alpha 4 beta 7 and alpha E beta 7 integrins on thymocytes, intestinal epithelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. *Eur J Immunol*. 26:897–905.
- Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T.C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 166:3008-18.
- Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T.C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*. 166:3008-18.
- Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, and S. Romagnani. 2002. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med*. 196:379-87.
- Aplin, A.E., A. Howe, S.K. Alahari, and R.L. Juliano. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 50:197-263.
- Arstila, T.P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*. 286:958-61.
- Asseman, C., S. Mauze, M.W. Leach, R.L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*. 190:995–1004.
- Awwad, M., and R.J. North. 1988. Immunologically mediated regression of a murine lymphoma after treatment with anti-L3T4 antibody. A consequence of removing L3T4+ suppressor T cells from a host generating predominantly Lyt-2+ T cellmediated immunity. J Exp Med. 168:2193-206.
- Bai, L., C.W. Huang, L. Gao, B. Jiang, and Q.Z. Nan. 2002. [Expression of tumor necrosis factor receptor on peripheral blood mononuclear cells from patients with primary hepatocellular carcinoma and effects of treatment on the expression]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 22:1099-100.
- Bargatze, R.F., M.A. Jutila, and E.C. Butcher. 1995. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity*. 3:99-108.

- Bargatze, R.F., S. Kurk, E.C. Butcher, and M.A. Jutila. 1994. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med.* 180:1785-92.
- Bargatze, R.F., S. Kurk, G. Watts, T.K. Kishimoto, C.A. Speer, and M.A. Jutila. 1994. In vivo and in vitro functional examination of a conserved epitope of L- and E-selectin crucial for leukocyte-endothelial cell interactions. *J Immunol.* 152:5814-25.
- Barth, R.J., Jr., M.A. Coppola, and W.R. Green. 1996. In vivo effects of locally secreted IL-10 on the murine antitumor immune response. *Ann Surg Oncol.* 3:381-6.
- Barthlott, T., G. Kassiotis, and B. Stockinger. 2003. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med*. 197:451-60.
- Bassenge, E., and G. Heusch. 1990. Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 116:77-165.
- Bearz, A., G. Tell, S. Formisano, S. Merluzzi, A. Colombatti, and C. Pucillo. 1999. Adhesion to fibronectin promotes the activation of the p125(FAK)/Zap-70complex in human T cells. *Immunology*. 98:564-8.
- Beck, L., Jr., and P.A. D'Amore. 1997. Vascular development: cellular and molecular regulation. *Faseb J.* 11:365-73.
- Belitsky, P., S.M. Miller, R. Gupta, S. Lee, and T. Ghose. 1990. Induction of MHC class II expression in recipient tissues caused by allograft rejection. *Transplantation*. 49:472-6.
- Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*. 420:502-7.
- Belkaid, Y., and B.T. Rouse. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 6:353-60.
- Bender, R., and S. Lange. 2001. Adjusting for multiple testing--when and how? *J Clin Epidemiol.* 54:343-9.
- Berendt, M.J., and R.J. North. 1980. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med*. 151:69-80.
- Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 3:401-10.
- Berlin-Rufenach, C., F. Otto, M. Mathies, J. Westermann, M.J. Owen, A. Hamann, and N. Hogg. 1999. Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1deficient mice. J Exp Med. 189:1467-78.
- Bernstorff, W.V., J.N. Glickman, R.D. Odze, F.A. Farraye, H.G. Joo, P.S. Goedegebuure, and T.J. Eberlein. 2002. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. *Cancer*. 94:2552-60.
- Biernacki, K., A. Prat, M. Blain, and J.P. Antel. 2001. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60:1127-36.
- Blue, M.L., P. Conrad, D.L. Webb, T. Sarr, and M. Macaro. 1993. Interacting monocytes and synoviocytes induce adhesion molecules by a cytokine-regulated process. *Lymphokine Cytokine Res.* 12:213-8.
- Boon, T., J.C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, and A. Van Pel. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 12:337-65.

- Borges, A.C., R. Wensel, C. Opitz, U. Bauer, G. Baumann, and F.X. Kleber. 1997. Relationship between haemodynamics and morphology in pulmonary hypertension. A quantitative intravascular ultrasound study. *Eur Heart J.* 18:1988–94.
- Borthwick, N.J., A.A. Akbar, C. Buckley, D. Pilling, M. Salmon, A.P. Jewell, and K.L. Yong. 2003. Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions. *Clin Exp Immunol*. 134:246-52.
- Bowen, M.A., D.D. Patel, X. Li, B. Modrell, A.R. Malacko, W.C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J.M. Pesando, U. Francke, and *et al.* 1995. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med.* 181:2213-20.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh. 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*. 264:569-71.
- Brown, N.S., and R. Bicknell. 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 3:323-7.
- Bruhl, H., K. Wagner, H. Kellner, M. Schattenkirchner, D. Schlondorff, and M. Mack. 2001. Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clin Exp Immunol*. 126:551-9.
- Butcher, E.C., M. Williams, K. Youngman, L. Rott, and M. Briskin. 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol*. 72:209-53.
- Buttiglieri, S., D. Pasqui, M. Migliori, H. Johnstone, S. Affrossman, L. Sereni, M.L. Wratten, R.
  Barbucci, C. Tetta, and G. Camussi. 2003. Endothelization and adherence of leucocytes to nanostructured surfaces. *Biomaterials*. 24:2731-8.
- Bystry, R.S., V. Aluvihare, K.A. Welch, M. Kallikourdis, and A.G. Betz. 2001. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol.* 2:1126-32.
- Camerini, D., S.P. James, I. Stamenkovic, and B. Seed. 1989. Leu-8/TQ1 is the human equivalent of the Mel-14 lymph node homing receptor. *Nature*. 342:78-82.
- Campbell, J.J., and E.C. Butcher. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*. 12:336-41.
- Carlos, T.M., and J.M. Harlan. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 84:2068-101.
- Cepek, K.L., C.M. Parker, J.L. Madara, and M.B. Brenner. 1993. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol*. 150:3459-70.
- Cheever, M.A., M.L. Disis, H. Bernhard, J.R. Gralow, S.L. Hand, E.S. Huseby, H.L. Qin, M. Takahashi, and W. Chen. 1995. Immunity to oncogenic proteins. *Immunol Rev.* 145:33-59.
- Chen, S., M.H. Kapturczak, C. Wasserfall, O.Y. Glushakova, M. Campbell-Thompson, J.S. Deshane, R. Joseph, P.E. Cruz, W.W. Hauswirth, K.M. Madsen, B.P. Croker, K.I. Berns, M.A. Atkinson, T.R. Flotte, C.C. Tisher, and A. Agarwal. 2005. Interleukin 10 attenuates neointimal proliferation and inflammation in aortic allografts by a heme oxygenase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:7251-6.
- Choi, J.H., J. Hur, C.H. Yoon, J.H. Kim, C.S. Lee, S.W. Youn, I.Y. Oh, C. Skurk, T. Murohara, Y.B. Park, K. Walsh, and H.S. Kim. 2004. Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3beta activity. *J Biol Chem.* 279:49430-8.
- Cines, D.B., E.S. Pollak, C.A. Buck, J. Loscalzo, G.A. Zimmerman, R.P. McEver, J.S. Pober, T.M. Wick, B.A. Konkle, B.S. Schwartz, E.S. Barnathan, K.R. McCrae, B.A. Hug, A.M. Schmidt, and D.M. Stern. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 91:3527–61.
- Cines, D.B., E.S. Pollak, C.A. Buck, J. Loscalzo, G.A. Zimmerman, R.P. McEver, J.S. Pober, T.M. Wick, B.A. Konkle, B.S. Schwartz, E.S. Barnathan, K.R. McCrae, B.A. Hug, A.M. Schmidt, and D.M. Stern. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 91:3527–61.
- Constant, S.L., and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*. 15:297–322.
- Coons, S.W., P.C. Johnson, and J.R. Shapiro. 1995. Cytogenetic and flow cytometry DNA analysis of regional heterogeneity in a low grade human glioma. *Cancer Res.* 55:1569-77.
- Corps, E., C. Carter, P. Karecla, T. Ahrens, P. Evans, and P. Kilshaw. 2001. Recognition of Ecadherin by integrin alpha(E)beta(7): requirement for cadherin dimerization and implications for cadherin and integrin function. *J Biol Chem*. 276:30862-70.
- Costello, R.T., J.A. Gastaut, and D. Olive. 1999. [Mechanisms of tumor escape from immunologic response]. *Rev Med Interne*. 20:579-88.
- Crucian, B., M. Nelman-Gonzalez, and C. Sams. 2006. Rapid flow cytometry method for quantitation of LFA-1-adhesive T cells. *Clin Vaccine Immunol.* 13:403-8.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 294:1708-12.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 10:942–9.
- Curtsinger, J.M., C.S. Schmidt, A. Mondino, D.C. Lins, R.M. Kedl, M.K. Jenkins, and M.F. Mescher. 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 162:3256-62.
- D'Ambrosio, D., F. Sinigaglia, and L. Adorini. 2003. Special attractions for suppressor T cells. *Trends Immunol.* 24:122-6.
- Davenport, M.P., M.C. Grimm, and A.R. Lloyd. 2000. A homing selection hypothesis for T-cell trafficking. *Immunol Today*. 21:315-7.
- Davies, M.G., and P.O. Hagen. 1993. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg.* 218:593-609.
- de Jong, P.E., J.E. Heeg, A.J. Apperloo, and D. de Zeeuw. 1991. Angiotensin-I converting enzyme inhibition: clinical effects in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*. 17:85-8.
- Defilippi, P., V. van Hinsbergh, A. Bertolotto, P. Rossino, L. Silengo, and G. Tarone. 1991. Differential distribution and modulation of expression of alpha 1/beta 1 integrin on human endothelial cells. *J Cell Biol.* 114:855-63.

- Degen, G.H., and W. Pfau. 1998. Food-derived carcinogens and breast cancer risk. *Nutrition*. 14:710-2.
- Denekamp, J., and B. Hobson. 1982. Endothelial-cell proliferation in experimental tumours. *Br J Cancer*. 46:711-20.
- Dengler, T.J., and J.S. Pober. 2000. Human vascular endothelial cells stimulate memory but not naive CD8+ T cells to differentiate into CTL retaining an early activation phenotype. *J Immunol*. 164:5146-55.
- Diaz, C., J. Morkowski, and A.J. Schroit. 1996. Generation of phenotypically aged phosphatidylserine-expressing erythrocytes by dilauroylphosphatidylcholine-induced vesiculation. *Blood*. 87:2956–61.
- Dorf, M.E., and B. Benacerraf. 1984. Suppressor cells and immunoregulation. *Annu Rev Immunol.* 2:127-57.
- Doyle, C., and J.L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*. 330:256-9.
- Drillenburg, P., and S.T. Pals. 2000. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*. 95:1900-10.
- Dulude, G., D.C. Roy, and C. Perreault. 1999. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med.* 189:1329-42.
- Dustin, M.L., and A.R. de Fougerolles. 2001. Reprogramming T cells: the role of extracellular matrix in coordination of T cell activation and migration. *Curr Opin Immunol.* 13:286-90.
- Eberhard, A., S. Kahlert, V. Goede, B. Hemmerlein, K.H. Plate, and H.G. Augustin. 2000. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 60:1388-93.
- Ehrlich, P. 1910. Über die Schlafkrankheit. *Offizieller Bericht : Internationaler Kongress zur Fürsorge für Geisteskranke* 4: 644–659.
- Elices, M.J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M.E. Hemler, and R.R. Lobb. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. 60:577-84.
- Endharti, A.T., I.M.s. Rifa, Z. Shi, Y. Fukuoka, Y. Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, and H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol.* 175:7093-7.
- Enenstein, J., N.S. Waleh, and R.H. Kramer. 1992. Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 203:499-503.
- Engelhardt, B. 1998. The role of alpha 4-integrin in T lymphocyte migration into the inflamed and noninflamed central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 231:51-64.
- Engelhardt, B., and H. Wolburg. 2004. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*. 34:2955-63.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S.D. Hurst, R.L. Coffman, R.A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Exp Med. 201:737-46.
- Fajardo, L.F. 1989. The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol.* 92:241-50.

- Faveeuw, C., M.E. Di Mauro, A.A. Price, and A. Ager. 2000. Roles of alpha(4) integrins/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 in the binding and transendothelial migration of T lymphocytes and T lymphoblasts across high endothelial venules. *Int Immunol*. 12:241-51.
- Feuerer, M., P. Beckhove, N. Garbi, Y. Mahnke, A. Limmer, M. Hommel, G.J. Hammerling, B. Kyewski, A. Hamann, V. Umansky, and V. Schirrmacher. 2003. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med.* 9:1151-7.
- Findlay, J.K. 1986. Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol*. 111:357-66.
- Fischer, G.F., O. Majdic, S. Gadd, and W. Knapp. 1990. Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules. *J Immunol.* 144:638-41.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 285:1182-6.
- Folkman, J. 1984. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest*. 51:601-4.
- Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 22:329-41.
- Ford, W.L., and P. Nieuwenhuis. 1974. The spleen and lymphocytes. *Schweiz Med Wochenschr*. 104:1348-51.
- Friedl, P., P.B. Noble, E.D. Shields, and K.S. Zanker. 1994. Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RAhigh and CD45ROhigh CD4+ and CD8+ lymphocytes in three-dimensional collagen lattices. *Immunology*. 82:617-24.
- Friedlander, M., P.C. Brooks, R.W. Shaffer, C.M. Kincaid, J.A. Varner, and D.A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*. 270:1500-2.
- Friess, H., Z. Lu, E. Riesle, W. Uhl, A.M. Brundler, L. Horvath, L.I. Gold, M. Korc, and M.W. Buchler. 1998. Enhanced expression of TGF-betas and their receptors in human acute pancreatitis. *Ann Surg*. 227:95-104.
- Fukunaga, A., M. Miyamoto, Y. Cho, S. Murakami, Y. Kawarada, T. Oshikiri, K. Kato, T. Kurokawa, M. Suzuoki, Y. Nakakubo, K. Hiraoka, T. Itoh, T. Morikawa, S. Okushiba, S. Kondo, and H. Katoh. 2004. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 28:e26-31.
- Gabrilovich, D., T. Ishida, T. Oyama, S. Ran, V. Kravtsov, S. Nadaf, and D.P. Carbone. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*. 92:4150-66.
- Galkina, E., K. Tanousis, G. Preece, M. Tolaini, D. Kioussis, O. Florey, D.O. Haskard, T.F. Tedder, and A. Ager. 2003. L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. J Exp Med. 198:1323-35.
- Gallatin, W.M., I.L. Weissman, and E.C. Butcher. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*. 304:30-4.
- Ganju, R.K., W.C. Hatch, H. Avraham, M.A. Ona, B. Druker, S. Avraham, and J.E. Groopman. 1997. RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes. *J Exp Med.* 185:1055-63.

- Gately, M.K., L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D.H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*. 16:495-521.
- Gearing, A.J., and W. Newman. 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 14:506–12.
- Gerdes, N., G.K. Sukhova, P. Libby, R.S. Reynolds, J.L. Young, and U. Schonbeck. 2002. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. J Exp Med. 195:245-57.
- Gismondi, A., L. Bisogno, F. Mainiero, G. Palmieri, M. Piccoli, L. Frati, and A. Santoni. 1997. Proline-rich tyrosine kinase-2 activation by beta 1 integrin fibronectin receptor cross-linking and association with paxillin in human natural killer cells. *J Immunol*. 159:4729-36.
- Gowans, J.L., and E.J. Knight. 1964. The Route of Re-Circulation of Lymphocytes in the Rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 159:257-82.
- Grace, P.A., H.A. Pitt, and W.P. Longmire. 1990. Pylorus preserving pancreatoduodenectomy: an overview. *Br J Surg.* 77:968-74.
- Grant, D.S., and H.K. Kleinman. 1997. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *Exs*. 79:317-33.
- Green, E.A., Y. Choi, and R.A. Flavell. 2002. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity*. 16:183-91.
- Green, E.A., L. Gorelik, C.M. McGregor, E.H. Tran, and R.A. Flavell. 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10878-83.
- Greenblatt, M., and P. Shubi. 1968. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst*. 41:111-24.
- Greenwood, J., C.L. Amos, C.E. Walters, P.O. Couraud, R. Lyck, B. Engelhardt, and P. Adamson. 2003. Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. *J Immunol.* 171:2099-108.
- Greenwood, J., Y. Wang, and V.L. Calder. 1995. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. off. *Immunology*. 86:408-15.
- Groenewegen, G., W.A. Buurman, C.J. van der Linden, G.M. Jeunhomme, and G. Kootstra. 1985. Cell-mediated cytotoxicity patterns of cloned cytotoxic T lymphocytes. Cytotoxicity directed against canine lymphoblasts, monocytes, and endothelial cells. *Transplantation*. 39:657-60.
- Grossman, W.J., J.W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J.P. Atkinson, and T.J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 21:589-601.
- Guan, J.L., and R.O. Hynes. 1990. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell.* 60:53-61.
- Gudjonsson, B. 1987. Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer*. 60:2284-303.

- Gunzer, M., A. Schafer, S. Borgmann, S. Grabbe, K.S. Zanker, E.B. Brocker, E. Kampgen, and P. Friedl. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*. 13:323-32.
- Hallmann, R., M.A. Jutila, C.W. Smith, D.C. Anderson, T.K. Kishimoto, and E.C. Butcher. 1991.
   The peripheral lymph node homing receptor, LECAM-1, is involved in CD18independent adhesion of human neutrophils to endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 174:236-43.
- Harlan, J.M. 1985. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood*. 65:513-25.
- Hassan, N.J., A.N. Barclay, and M.H. Brown. 2004. Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol*. 34:930-40.
- Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N.R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D.J. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R.G. Crystal, M.A. Moore, and S. Rafii. 2001. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 193:1005-14.
- Helmlinger, G., P.A. Netti, H.C. Lichtenbeld, R.J. Melder, and R.K. Jain. 1997. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol*. 15:778-83.
- Henry, M.D., and K.P. Campbell. 1998. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell.* 95:859-70.
- Herfarth, C. 1996. [Oncologic surgery--scope and status in surgery]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*. 113:49-55.
- Heusch, G. 1990. Alpha-adrenergic mechanisms in myocardial ischemia. *Circulation*. 81:1-13.
- Higgins, R.D., K.D. Hendricks-Munoz, V.V. Caines, R.P. Gerrets, and D.B. Rifkin. 1998. Hyperoxia stimulates endothelin-1 secretion from endothelial cells; modulation by captopril and nifedipine. *Curr Eye Res.* 17:487-93.
- Hirata, T., B.C. Furie, and B. Furie. 2002. P-, E-, and L-selectin mediate migration of activated CD8+ T lymphocytes into inflamed skin. *J Immunol*. 169:4307-13.
- Hirata, T., G. Merrill-Skoloff, M. Aab, J. Yang, B.C. Furie, and B. Furie. 2000. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med*. 192:1669-76.
- Hosken, N.A., K. Shibuya, A.W. Heath, K.M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptoralpha beta-transgenic model. *J Exp Med*. 182:1579-84.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 260:547-9.
- Huang, S., and D.E. Ingber. 1999. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol.* 1:E131-8.
- Huehn, J., K. Siegmund, J.C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G.F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G.K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C.A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 199:303-13.

- Hwang, I., J.F. Huang, H. Kishimoto, A. Brunmark, P.A. Peterson, M.R. Jackson, C.D. Surh, Z. Cai, and J. Sprent. 2000. T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. J Exp Med. 191:1137-48.
- Hwang, S.T., M.S. Singer, P.A. Giblin, T.A. Yednock, K.B. Bacon, S.I. Simon, and S.D. Rosen. 1996. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes. *J Exp Med.* 184:1343-8.
- Iellem, A., L. Colantonio, and D. D'Ambrosio. 2003. Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4+CD25+ suppressor T cells. *Eur J Immunol*. 33:1488-96.
- Iezzi, G., E. Scotet, D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol*. 29:4092-101.
- Ito, M., M. Watanabe, H. Kamiya, and M. Sakurai. 1995. Changes of adhesion molecule (LFA-1, ICAM-1) expression on memory T cells activated with cytomegalovirus antigen. *Cell Immunol.* 160:8-13.
- Jensen, P.L., and M.F. Mescher. 2001. Role of phosphoinositide 3-kinase in TCR-signaled regulation of CD8-mediated adhesion to class I MHC protein. *Eur J Immunol*. 31:3612-21.
- Johnson, D.R., and J.S. Pober. 1994. HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons. *Mol Cell Biol*. 14:1322-32.
- Johnson-Leger, C., M. Aurrand-Lions, and B.A. Imhof. 2000. The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci*. 113 (Pt 6):921-33.
- Jones, L.A., and M.L. Salgaller. 2000. Immunologic approaches to antigen discovery for cancer vaccines. *Expert Opin Investig Drugs*. 9:481–90.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A.H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 192:1213–22.
- Joo, Y.S., N.G. Singer, J.L. Endres, S. Sarkar, R.W. Kinne, R.M. Marks, and D.A. Fox. 2000. Evidence for the expression of a second CD6 ligand by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 43:329-35.
- Jutila, M.A. 1992. Leukocyte traffic to sites of inflammation. *Apmis*. 100:191-201.
- Jutila, M.A., E.L. Berg, T.K. Kishimoto, L.J. Picker, R.F. Bargatze, D.K. Bishop, C.G. Orosz, N.W.
   Wu, and E.C. Butcher. 1989. Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils, and monocytes. Role of homing receptors and other adhesion molecules. *Transplantation*. 48:727-31.
- Kantele, A., J. Zivny, M. Hakkinen, C.O. Elson, and J. Mestecky. 1999. Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans. *J Immunol*. 162:5173-7.
- Kaplanski, G., C. Farnarier, A.M. Benoliel, C. Foa, S. Kaplanski, and P. Bongrand. 1994. A novel role for E- and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. *J Cell Sci.* 107 (Pt 9):2449-57.
- Karmann, K., C.C. Hughes, W.C. Fanslow, and J.S. Pober. 1996. Endothelial cells augment the expression of CD40 ligand on newly activated human CD4+ T cells through a CD2/LFA-3 signaling pathway. *Eur J Immunol*. 26:610-7.

- Kawaguchi, S., K. Kikuchi, S. Ishii, Y. Takada, S. Kobayashi, and T. Uede. 1992. VLA-4 molecules on tumor cells initiate an adhesive interaction with VCAM-1 molecules on endothelial cell surface. *Jpn J Cancer Res.* 83:1304-16.
- Kawai, T., M. Seki, H. Watanabe, J.W. Eastcott, D.J. Smith, and M.A. Taubman. 2000. T(h)1 transmigration anergy: a new concept of endothelial cell-T cell regulatory interaction. *Int Immunol.* 12:937-48.
- Kishimoto, T.K., K. O'Conner, and T.A. Springer. 1989. Leukocyte adhesion deficiency. Aberrant splicing of a conserved integrin sequence causes a moderate deficiency phenotype. *J Biol Chem.* 264:3588-95.
- Kishimoto, T.K., and T.A. Springer. 1989. Human leukocyte adhesion deficiency: molecular basis for a defective immune response to infections of the skin. *Curr Probl Dermatol*. 18:106–15.
- Klein, L., K. Khazaie, and H. von Boehmer. 2003. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8886-91.
- Koch, A.E., J.C. Burrows, G.K. Haines, T.M. Carlos, J.M. Harlan, and S.J. Leibovich. 1991. Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest*. 64:313-20.
- Koch, A.E., M.R. Shah, L.A. Harlow, R.M. Lovis, and R.M. Pope. 1994. Soluble intercellular adhesion molecule-1 in arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 71:208-15.
- Koller, A., R. Mizuno, and G. Kaley. 1999. Flow reduces the amplitude and increases the frequency of lymphatic vasomotion: role of endothelial prostanoids. *Am J Physiol*. 277:R1683-9.
- Konerding, M.A., E. Fait, and A. Gaumann. 2001. 3D microvascular architecture of precancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer*. 84:1354–62.
- Kuchroo, V.K., M.P. Das, J.A. Brown, A.M. Ranger, S.S. Zamvil, R.A. Sobel, H.L. Weiner, N. Nabavi, and L.H. Glimcher. 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 80:707-18.
- Kunkel, E.J., and E.C. Butcher. 2002. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*. 16:1-4.
- Kurz, T., L. Pintard, J.H. Willis, D.R. Hamill, P. Gonczy, M. Peter, and B. Bowerman. 2002. Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science*. 295:1294-8.
- Kuzu, I., R. Bicknell, C.D. Fletcher, and K.C. Gatter. 1993. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab Invest*. 69:322-8.
- Lee, K.H., E. Wang, M.B. Nielsen, J. Wunderlich, S. Migueles, M. Connors, S.M. Steinberg, S.A. Rosenberg, and F.M. Marincola. 1999. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J Immunol*. 163:6292-300.
- Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S* A. 99:13031-6.

- Lepault, F., and M.C. Gagnerault. 2000. Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 164:240-7.
- Levings, M.K., R. Sangregorio, C. Sartirana, A.L. Moschin, M. Battaglia, P.C. Orban, and M.G. Roncarolo. 2002. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. J Exp Med. 196:1335-46.
- Li, G., and M. Herlyn. 2000. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today*. 6:163-9.
- Lienenluke, B., T. Germann, R.A. Kroczek, and M. Hecker. 2000. CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. *Eur J Immunol*. 30:2864-70.
- Liyanage, C.A., K. Rajaratnam, and R.S. Zanoon. 2004. Locating an insulinoma by surgical exploration. *Ceylon Med J.* 49:88-9.
- Liyanage, U.K., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure, and D.C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 169:2756-61.
- Loetscher, P., B. Moser, and M. Baggiolini. 2000. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol.* 74:127-80.
- Loppnow, H., and P. Libby. 1989. Adult human vascular endothelial cells express the IL6 gene differentially in response to LPS or IL1. *Cell Immunol*. 122:493-503.
- Lorenzon, P., E. Vecile, E. Nardon, E. Ferrero, J.M. Harlan, F. Tedesco, and A. Dobrina. 1998. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol*. 142:1381-91.
- Luettig, B., M. Kaiser, U. Bode, E.B. Bell, S.M. Sparshott, M. Bette, and J. Westermann. 2001. Naive and memory T cells migrate in comparable numbers through the normal rat lung: only effector T cells accumulate and proliferate in the lamina propria of the bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 25:69–77.
- Luettig, B., A. Sponholz, C. Heerwagen, U. Bode, and J. Westermann. 2001. Recent thymic emigrants (CD4+) continuously migrate through lymphoid organs: within the tissue they alter surface molecule expression. *Scand J Immunol*. 53:563-71.
- Luscher, T.F., and M. Barton. 1997. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*. 20:II-3-10.
- Luscinskas, F.W., and J. Lawler. 1994. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *Faseb J*. 8:929-38.
- Luther, S.A., and J.G. Cyster. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2:102-7.
- Lyapina, S., G. Cope, A. Shevchenko, G. Serino, T. Tsuge, C. Zhou, D.A. Wolf, N. Wei, A. Shevchenko, and R.J. Deshaies. 2001. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*. 292:1382-5.
- Lyck, R., Y. Reiss, N. Gerwin, J. Greenwood, P. Adamson, and B. Engelhardt. 2003. T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells. *Blood.* 102:3675-83.
- Ma, E.A., O. Lou, N.N. Berg, and H.L. Ostergaard. 1997. Cytotoxic T lymphocytes express a beta3 integrin which can induce the phosphorylation of focal adhesion kinase and the related PYK-2. *Eur J Immunol*. 27:329-35.

- Ma, W., and J.S. Pober. 1998. Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 161:2158-67.
- Macatonia, S.E., N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 154:5071-9.
- Mackay, C.R. 1993. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 5:423-7.
- Maeurer, M.J., W.J. Storkus, J.M. Kirkwood, and M.T. Lotze. 1996. New treatment options for patients with melanoma: review of melanoma-derived T-cell epitope-based peptide vaccines. *Melanoma Res.* 6:11-24.
- Mantovani, A. 1999. Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol*. 72:1-6.
- Marchesi, V.T., and J.L. Gowans. 1964. The Migration of Lymphocytes through the Endothelium of Venules in Lymph Nodes: an Electron Microscope Study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 159:283-90.
- Marelli-Berg, F.M., L. Frasca, N. Imami, G. Lombardi, and R.I. Lechler. 1999. Lack of T cell proliferation without induction of nonresponsiveness after antigen presentation by endothelial cells. *Transplantation*. 68:280-7.
- Marelli-Berg, F.M., L. Frasca, L. Weng, G. Lombardi, and R.I. Lechler. 1999. Antigen recognition influences transendothelial migration of CD4+ T cells. *J Immunol*. 162:696-703.
- Marelli-Berg, F.M., R.E. Hargreaves, P. Carmichael, A. Dorling, G. Lombardi, and R.I. Lechler. 1996. Major histocompatibility complex class II-expressing endothelial cells induce allospecific nonresponsiveness in naive T cells. *J Exp Med.* 183:1603-12.
- Marincola, F.M., E.M. Jaffee, D.J. Hicklin, and S. Ferrone. 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 74:181-273.
- Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, and D.R. Green. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182:1545-56.
- Marvin, M.R., J.C. Southall, S. Trokhan, C. DeRosa, and J. Chabot. 1998. Liver metastases are enhanced in homozygous deletionally mutant ICAM-1 or LFA-1 mice. *J Surg Res*. 80:143-8.
- Massia, S.P., and J.A. Hubbell. 1992. Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem.* 267:14019-26.
- McCawley, L.J., and L.M. Matrisian. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 13:534-40.
- McCawley, L.J., and L.M. Matrisian. 2001. Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. *Curr Biol.* 11:R25-7.
- Michie, C.A., A. McLean, C. Alcock, and P.C. Beverley. 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*. 360:264–5.
- Mire-Sluis, A.R., and R. Thorpe. 1998. Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines. *J Immunol Methods*. 211:199–210.

- Mocellin, S., M.C. Panelli, E. Wang, D. Nagorsen, and F.M. Marincola. 2003. The dual role of IL-10. *Trends Immunol.* 24:36-43.
- Moore, K.L., S.F. Eaton, D.E. Lyons, H.S. Lichenstein, R.D. Cummings, and R.P. McEver. 1994. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J Biol Chem*. 269:23318-27.
- Moser, B., and P. Loetscher. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2:123-8.
- Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7:145-73.
- Muller, I., P. Kropf, J.A. Louis, and G. Milon. 1994. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to Leishmania major. *Infect Immun*. 62:2575-81.
- Muller, M., H. Ibelgaufts, and I.M. Kerr. 1994. Interferon response pathways--a paradigm for cytokine signalling? *J Viral Hepat*. 1:87-103.
- Nagai, H., A. Kuroda, and Y. Morioka. 1986. Lymphatic and local spread of T1 and T2 pancreatic cancer. A study of autopsy material. *Ann Surg*. 204:65-71.
- Nagorsen, D., C. Scheibenbogen, F.M. Marincola, A. Letsch, and U. Keilholz. 2003. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res.* 9:4296-303.
- Nakamura, T., K. Chin, K. Shimizu, H. Kita, M. Mishima, T. Nakamura, and M. Ohi. 2001. Acute effect of nasal continuous positive airway pressure therapy on the systemic immunity of patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep.* 24:545-53.
- Nakao, A., A. Harada, T. Nonami, T. Kaneko, and H. Takagi. 1996. Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas*. 12:357-61.
- Nanda, A., and B. St Croix. 2004. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol.* 16:44-9.
- Natali, P.G., M.R. Nicotra, A. Bigotti, I. Venturo, L. Marcenaro, P. Giacomini, and C. Russo. 1989. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:6719-23.
- Nelissen, J.M., I.M. Peters, B.G. de Grooth, Y. van Kooyk, and C.G. Figdor. 2000. Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 11:2057-68.
- Nicosia, R.F., P. Belser, E. Bonanno, and J. Diven. 1991. Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism. *In Vitro Cell Dev Biol*. 27A:961-6.
- Nourshargh, S., and F.M. Marelli-Berg. 2005. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 26:157–65.
- Novak, T.J., D. Farber, D. Leitenberg, S.C. Hong, P. Johnson, and K. Bottomly. 1994. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity*. 1:109–19.
- Oppenheimer-Marks, N., L.S. Davis, D.T. Bogue, J. Ramberg, and P.E. Lipsky. 1991. Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol*. 147:2913-21.
- Ostergaard, H.L., O. Lou, C.W. Arendt, and N.N. Berg. 1998. Paxillin phosphorylation and association with Lck and Pyk2 in anti-CD3- or anti-CD45-stimulated T cells. *J Biol Chem.* 273:5692-6.

- Pabst, R., R.M. Binns, M. Peter, and S.T. Licence. 1988. The physiological role of the lung in lymphocyte migration. *Adv Exp Med Biol*. 237:553-8.
- Paul, D.B., S.B. Read, N.V. Kulprathipanja, G.G. Gomez, B.K. Kleinschmidt-DeMasters, P.M. Schiltz, and C.A. Kruse. 2003. Gamma interferon transduced 9L gliosarcoma. Cytokine gene therapy and its relevance to cellular therapy with alloreactive cytotoxic T lymphocytes. J Neurooncol. 64:89-99.
- Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:10398-403.
- Peiper, M., M. Nagoshi, D. Patel, J.A. Fletcher, P.S. Goegebuure, and T.J. Eberlein. 1997. Human pancreatic cancer cells (MPanc-96) recognized by autologous tumorinfiltrating lymphocytes after in vitro as well as in vivo tumor expansion. *Int J Cancer*. 71:993-9.
- Pettersson, A., J.A. Nagy, L.F. Brown, C. Sundberg, E. Morgan, S. Jungles, R. Carter, J.E. Krieger, E.J. Manseau, V.S. Harvey, I.A. Eckelhoefer, D. Feng, A.M. Dvorak, R.C. Mulligan, and H.F. Dvorak. 2000. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*. 80:99–115.
- Plendl, J., F. Sinowatz, and R. Auerbach. 1992. [The heterogenicity of the vascular endothelium]. *Anat Histol Embryol.* 21:256–62.
- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J* Biol Chem. 275:21785-8.
- Pober, J.S. 1999. Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res.* 19:225-32.
- Polverini, P.J. 1996. Cellular adhesion molecules. Newly identified mediators of angiogenesis. *Am J Pathol.* 148:1023-9.
- Pontoux, C., A. Banz, and M. Papiernik. 2002. Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol.* 14:233-9.
- Porter, J.C., M. Bracke, A. Smith, D. Davies, and N. Hogg. 2002. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol.* 168:6330-5.
- Porter, J.C., and N. Hogg. 1997. Integrin cross talk: activation of lymphocyte functionassociated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1mediated function. *J Cell Biol.* 138:1437-47.
- Postigo, A.A., and F. Sanchez-Madrid. 1993. Adhesion and homing molecules. *Transplant Proc.* 25:65-9.
- Postigo, A.A., P. Sanchez-Mateos, A.I. Lazarovits, F. Sanchez-Madrid, and M.O. de Landazuri. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates B cell binding to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1. Expression and function of alpha 4 integrins on human B lymphocytes. *J Immunol*. 151:2471-83.
- Postigo, A.A., J. Teixido, and F. Sanchez-Madrid. 1993. The alpha 4 beta 1/VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *Res Immunol.* 144:723-35; discussion 754-62.
- Prat, A., K. Biernacki, K. Wosik, and J.P. Antel. 2001. Glial cell influence on the human bloodbrain barrier. *Glia*. 36:145-55.

- Qian, D., S. Lev, N.S. van Oers, I. Dikic, J. Schlessinger, and A. Weiss. 1997. Tyrosine phosphorylation of Pyk2 is selectively regulated by Fyn during TCR signaling. *J Exp Med.* 185:1253-9.
- Read, S., S. Mauze, C. Asseman, A. Bean, R. Coffman, and F. Powrie. 1998. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol*. 28:3435-47.
- Restifo, N.P., Y. Kawakami, F. Marincola, P. Shamamian, A. Taggarse, F. Esquivel, and S.A. Rosenberg. 1993. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenetherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother*. 14:182–90.
- Riteau, B., D.F. Barber, and E.O. Long. 2003. Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med.* 198:469-74.
- Rodig, N., T. Ryan, J.A. Allen, H. Pang, N. Grabie, T. Chernova, E.A. Greenfield, S.C. Liang, A.H. Sharpe, A.H. Lichtman, and G.J. Freeman. 2003. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol*. 33:3117-26.
- Rollins, L.A., S. Leone-Kabler, M.G. O'Sullivan, and M.S. Miller. 1998. Role of tumor suppressor genes in transplacental lung carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 21:177-84.
- Rosenberg, S.A. 1996. The immunotherapy of solid cancers based on cloning the genes encoding tumor-rejection antigens. *Annu Rev Med*. 47:481-91.
- Rosenkilde, M.M., and T.W. Schwartz. 2004. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *Apmis*. 112:481-95.
- Roth, S.J., M.W. Carr, S.S. Rose, and T.A. Springer. 1995. Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J Immunol Methods*. 188:97-116.
- Ruoslahti, E., and M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 238:491-7.
- Saiki, I., J. Murata, T. Makabe, N. Nishi, S. Tokura, and I. Azuma. 1990. Inhibition of tumor angiogenesis by a synthetic cell-adhesive polypeptide containing the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence of fibronectin, poly(RGD). *Jpn J Cancer Res.* 81:668-75.
- Sakaguchi, S. 2002. Immunologic tolerance maintained by regulatory T cells: implications for autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Vox Sang.* 83 Suppl 1:151-3.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155:1151-64.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 182:18-32.
- Sako, D., X.J. Chang, K.M. Barone, G. Vachino, H.M. White, G. Shaw, G.M. Veldman, K.M. Bean,
  T.J. Ahern, B. Furie, and *et al.* 1993. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 75:1179-86.

- Salamone, M.C., C. Rosselot, G.V. Salamone, M. Barboza, M. Kado, and L. Fainboim. 2001. Antibodies recognizing CD24 LAP epitope on human T cells enhance CD28 and IL-2 T cell proliferation. *J Leukoc Biol*. 69:215-23.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev.* 177:134-40.
- Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*. 18:593-620.
- Salmi, M., P. Rajala, and S. Jalkanen. 1997. Homing of mucosal leukocytes to joints. Distinct endothelial ligands in synovium mediate leukocyte-subtype specific adhesion. *J Clin Invest*. 99:2165-72.
- Sanchez-Madrid, F., and M.A. del Pozo. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J.* 18:501-11.
- Sancho, D., M. Nieto, M. Llano, J.L. Rodriguez-Fernandez, R. Tejedor, S. Avraham, C. Cabanas, M. Lopez-Botet, and F. Sanchez-Madrid. 2000. The tyrosine kinase PYK-2/RAFTK regulates natural killer (NK) cell cytotoxic response, and is translocated and activated upon specific target cell recognition and killing. *J Cell Biol*. 149:1249-62.
- Santamaria, P., T. Utsugi, B.J. Park, N. Averill, S. Kawazu, and J.W. Yoon. 1995. Beta-cellcytotoxic CD8+ T cells from nonobese diabetic mice use highly homologous T cell receptor alpha-chain CDR3 sequences. *J Immunol*. 154:2494-503.
- Santana, M.A., and Y. Rosenstein. 2003. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol*. 195:392-401.
- Sarnacki, S., B. Begue, H. Buc, F. Le Deist, and N. Cerf-Bensussan. 1992. Enhancement of CD3-induced activation of human intestinal intraepithelial lymphocytes by stimulation of the beta 7-containing integrin defined by HML-1 monoclonal antibody. *Eur J Immunol.* 22:2887-92.
- Sato, T.N., Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire,
  T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau, and Y. Qin. 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 376:70-4.
- Savage, C.O., and C.J. Brooks. 1995. Human vascular endothelial cells do not induce anergy in allogeneic CD4+ T cells unless costimulation is prevented. *Transplantation*. 60:734-40.
- Scheffold, A., J. Huhn, and T. Hofer. 2005. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol*. 35:1336-41.
- Schleiffenbaum, B., O. Spertini, and T.F. Tedder. 1992. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol*. 119:229-38.
- Schoenberg, M.H., F. Gansauge, and R. Kunz. 1997. [Value of pylorus preserving partial duodenopancreatectomy in ductal pancreatic carcinoma]. *Chirurg*. 68:1262-7.
- Seliger, B., C. Harders, S. Lohmann, F. Momburg, S. Urlinger, R. Tampe, and C. Huber. 1998. Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur J Immunol*. 28:122-33.
- Semenza, G.L. 1999. Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:551-78.
- Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman, and A.C. Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376:62-6.

- Shamri, R., V. Grabovsky, S.W. Feigelson, O. Dwir, Y. Van Kooyk, and R. Alon. 2002. Chemokine stimulation of lymphocyte alpha 4 integrin avidity but not of leukocyte function-associated antigen-1 avidity to endothelial ligands under shear flow requires cholesterol membrane rafts. *J Biol Chem*. 277:40027-35.
- Shaw, S.K., B.N. Perkins, Y.C. Lim, Y. Liu, A. Nusrat, F.J. Schnell, C.A. Parkos, and F.W. Luscinskas. 2001. Reduced expression of junctional adhesion molecule and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) at human vascular endothelial junctions by cytokines tumor necrosis factor-alpha plus interferon-gamma Does not reduce leukocyte transmigration under flow. *Am J Pathol.* 159:2281-91.
- Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2:389-400.
- Shimizu, Y., W. Newman, T.V. Gopal, K.J. Horgan, N. Graber, L.D. Beall, G.A. van Seventer, and S. Shaw. 1991. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol*. 113:1203-12.
- Shimizu, Y., and S. Shaw. 1991. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *Faseb J.* 5:2292-9.
- Skonier, J.E., M.A. Bowen, J. Emswiler, A. Aruffo, and J. Bajorath. 1996. Mutational analysis of the CD6 binding site in activated leukocyte cell adhesion molecule. *Biochemistry*. 35:14743-8.
- Smith, A., M. Bracke, B. Leitinger, J.C. Porter, and N. Hogg. 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci.* 116:3123-33.
- Smith, C.W., T.K. Kishimoto, O. Abbassi, B. Hughes, R. Rothlein, L.V. McIntire, E. Butcher, and D.C. Anderson. 1991. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. J Clin Invest. 87:609-18.
- Solomayer, E.F., M. Feuerer, L. Bai, V. Umansky, P. Beckhove, G.C. Meyberg, G. Bastert, V. Schirrmacher, and I.J. Diel. 2003. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 9:174–80.
- Spertini, O. 1996. [Regulation of leukocyte migration by adhesion molecules]. *Schweiz Med Wochenschr.* 126:1926-34.
- Spertini, O., A.S. Cordey, N. Monai, L. Giuffre, and M. Schapira. 1996. P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*. 135:523-31.
- Spertini, O., G.S. Kansas, J.M. Munro, J.D. Griffin, and T.F. Tedder. 1991. Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. *Nature*. 349:691-4.
- Spertini, O., F.W. Luscinskas, G.S. Kansas, J.M. Munro, J.D. Griffin, M.A. Gimbrone, Jr., and T.F. Tedder. 1991. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J Immunol*. 147:2565-73.
- Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76:301–14.

- Stassen, M., S. Fondel, T. Bopp, C. Richter, C. Muller, J. Kubach, C. Becker, J. Knop, A.H. Enk,
  S. Schmitt, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2004. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol*. 34:1303-11.
- Stassen, M., H. Jonuleit, C. Muller, M. Klein, C. Richter, T. Bopp, S. Schmitt, and E. Schmitt. 2004. Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J Immunol.* 173:267-74.
- Steegmaier, M., J.E. Blanks, E. Borges, and D. Vestweber. 1997. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of mouse bone marrow-derived mast cells on P-selectin but not efficiently on E-selectin. *Eur J Immunol*. 27:1339-45.
- Sternlicht, M.D., and Z. Werb. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 17:463-516.
- Stewart, M., and N. Hogg. 1996. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem*. 61:554-61.
- Stewart, M.P., C. Cabanas, and N. Hogg. 1996. T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1. *J Immunol.* 156:1810-7.
- Streuli, C.H., and A.P. Gilmore. 1999. Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 4:183-91.
- Suffia, I., S.K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. *J Immunol*. 174:5444-55.
- Sundstedt, A., E.J. O'Neill, K.S. Nicolson, and D.C. Wraith. 2003. Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *J Immunol*. 170:1240-8.
- Sutmuller, R.P., L.M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T.N. Schumacher, M.E. Wildenberg, J.P. Allison, R.E. Toes, R. Offringa, and C.J. Melief. 2001. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. J Exp Med. 194:823-32.
- Swart, G.W. 2002. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol.* 81:313-21.
- Szekanecz, Z., G.K. Haines, L.A. Harlow, M.R. Shah, T.W. Fong, R. Fu, S.J. Lin, G. Rayan, and A.E. Koch. 1995. Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 76:187-94.
- Szekanecz, Z., M.J. Humphries, and A. Ager. 1992. Lymphocyte adhesion to high endothelium is mediated by two beta 1 integrin receptors for fibronectin, alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1. *J Cell Sci*. 101 (Pt 4):885-94.
- Szekanecz, Z., and G. Szegedi. 1992. [Cell surface adhesion molecules: structure, function, clinical aspects]. *Orv Hetil.* 133:135-42.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 10:1969-80.

- Takamoto, M., M. Isobe, and K. Sugane. 1998. The role of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4 interactions on T helper 2 cytokine production by lung T cells of Toxocara canisinfected mice. *Immunology*. 95:419-26.
- Tanchot, C., and B. Rocha. 1997. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med*. 186:1099–106.
- Tang, Q., E.K. Boden, K.J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi, and J.A. Bluestone. 2004. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 34:2996-3005.
- Tay, S.S., A. McCormack, C. Lawson, and M.L. Rose. 2003. IFN-gamma reverses the stop signal allowing migration of antigen-specific T cells into inflammatory sites. *J Immunol*. 170:3315-22.
- Tchilian, E.Z., J.J. Owen, and E.J. Jenkinson. 1997. Anti-alpha 4 integrin antibody induces apoptosis in murine thymocytes and staphylococcal enterotoxin B-activated lymph node T cells. *Immunology*. 92:321-7.
- Tereb, D.A., N.C. Kirkiles-Smith, R.W. Kim, Y. Wang, R.D. Rudic, J.S. Schechner, M.I. Lorber, A.L. Bothwell, J.S. Pober, and G. Tellides. 2001. Human T cells infiltrate and injure pig coronary artery grafts with activated but not quiescent endothelium in immunodeficient mouse hosts. *Transplantation*. 71:1622-30.
- Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*. 2:129–34.
- Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 188:287–96.
- Tononi, G., O. Sporns, and G.M. Edelman. 1999. Measures of degeneracy and redundancy in biological networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:3257-62.
- Toyokuni, S., K. Okamoto, J. Yodoi, and H. Hiai. 1995. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 358:1-3.
- Tozer, G.M., S.M. Ameer-Beg, J. Baker, P.R. Barber, S.A. Hill, R.J. Hodgkiss, R. Locke, V.E. Prise, I. Wilson, and B. Vojnovic. 2005. Intravital imaging of tumour vascular networks using multi-photon fluorescence microscopy. *Adv Drug Deliv Rev.* 57:135-52.
- Tozer, G.M., and C.C. Morris. 1990. Blood flow and blood volume in a transplanted rat fibrosarcoma: comparison with various normal tissues. *Radiother Oncol.* 17:153-65.
- Travis, L.B., R.E. Curtis, B.F. Hankey, and J.F. Fraumeni, Jr. 1993. Acute nonlymphocytic leukemia after small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 11:586-7.
- Trede, M. 1996. Quality of life--quality of surgery. *World J Surg*. 20:941-9.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 13:251-76.
- Tysnes, B.B., L.F. Larsen, G.O. Ness, R. Mahesparan, K. Edvardsen, I. Garcia-Cabrera, and R. Bjerkvig. 1996. Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer*. 67:777-84.
- Ueda, D., N. Sato, A. Matsuura, A. Sasaki, S. Takahashi, H. Ikeda, Y. Wada, and K. Kikuchi. 1995. T-cell receptor gene structures of HLA-A26-restricted cytotoxic T lymphocyte lines against human autologous pancreatic adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 86:691-7.
- Valmori, D., F. Levy, I. Miconnet, P. Zajac, G.C. Spagnoli, D. Rimoldi, D. Lienard, V. Cerundolo, J.C. Cerottini, and P. Romero. 2000. Induction of potent antitumor CTL

responses by recombinant vaccinia encoding a melan-A peptide analogue. *J Immunol.* 164:1125-31.

- van Buul, J.D., and P.L. Hordijk. 2004. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:824–33.
- van Buul, J.D., C. Voermans, V. van den Berg, E.C. Anthony, F.P. Mul, S. van Wetering, C.E. van der Schoot, and P.L. Hordijk. 2002. Migration of human hematopoietic progenitor cells across bone marrow endothelium is regulated by vascular endothelial cadherin. *J Immunol.* 168:588-96.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 254:1643-7.
- Van Epps, D.E., J. Potter, M. Vachula, C.W. Smith, and D.C. Anderson. 1989. Suppression of human lymphocyte chemotaxis and transendothelial migration by anti-LFA-1 antibody. *J Immunol*. 143:3207-10.
- van Kempen, L.C., J.M. Nelissen, W.G. Degen, R. Torensma, U.H. Weidle, H.P. Bloemers, C.G. Figdor, and G.W. Swart. 2001. Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J Biol Chem.* 276:25783-90.
- van Kempen, T.A., E. van Heugten, and N.L. Trottier. 2001. Adipic acid increases plasma lysine but does not improve the efficiency of lysine utilization in swine. *J Anim Sci.* 79:2406-11.
- van Kooyk, Y., and C.G. Figdor. 2000. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol*. 12:542-7.
- van Kooyk, Y., P. van de Wiel-van Kemenade, P. Weder, T.W. Kuijpers, and C.G. Figdor. 1989. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature*. 342:811-3.
- van Parijs, L., V.L. Perez, and A.K. Abbas. 1998. Mechanisms of peripheral T cell tolerance. *Novartis Found Symp.* 215:5-14; discussion 14-20, 33-40.
- van Wetering, S., J.D. van Buul, S. Quik, F.P. Mul, E.C. Anthony, J.P. ten Klooster, J.G. Collard, and P.L. Hordijk. 2002. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci*. 115:1837-46.
- van Wetering, S., N. van den Berk, J.D. van Buul, F.P. Mul, I. Lommerse, R. Mous, J.P. ten Klooster, J.J. Zwaginga, and P.L. Hordijk. 2003. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285:C343-52.
- Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson. 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*. 182:1597-601.
- Vestweber, D. 2000. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol.* 190:281-91.
- von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 6:338-44.
- Wagner, C.R., R.M. Vetto, and D.R. Burger. 1984. The mechanism of antigen presentation by endothelial cells. *Immunobiology*. 168:453–69.
- Wagner, U.G., P.J. Kurtin, A. Wahner, M. Brackertz, D.J. Berry, J.J. Goronzy, and C.M. Weyand. 1998. The role of CD8+ CD40L+ T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Immunol*. 161:6390-7.

- Warnock, R.A., S. Askari, E.C. Butcher, and U.H. von Andrian. 1998. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med*. 187:205-16.
- Watson, W., K. Oen, R. Ramdahin, and C. Harman. 1991. Immunoglobulin and cytokine production by neonatal lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 83:169-74.
- Westermann, J., J. Matyas, S. Persin, P. van der Meide, C. Heerwagen, and R. Pabst. 1994. Band T-lymphocyte subset numbers in the migrating lymphocyte pool of the rat: the influence of interferon-gamma on its mobilization monitored through blood and lymph. *Scand J Immunol.* 39:395-402.
- Westermann, J., and R. Pabst. 1990. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today*. 11:406–10.
- Westermann, J., and R. Pabst. 1992. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Investig*. 70:539-44.
- Westermann, J., S. Persin, J. Matyas, P. van der Meide, and R. Pabst. 1993. IFN-gamma influences the migration of thoracic duct B and T lymphocyte subsets in vivo. Random increase in disappearance from the blood and differential decrease in reappearance in the lymph. *J Immunol.* 150:3843-52.
- Westermann, J., Z. Puskas, and R. Pabst. 1988. The migration of lymphocyte subsets from blood to lymph in the normal rat. *Adv Exp Med Biol.* 237:547-51.
- Wildbaum, G., J. Westermann, G. Maor, and N. Karin. 2000. A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 106:671–9.
- Wong, D., R. Prameya, and K. Dorovini-Zis. 1999. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol*. 58:138-52.
- Woo, E.Y., H. Yeh, C.S. Chu, K. Schlienger, R.G. Carroll, J.L. Riley, L.R. Kaiser, and C.H. June. 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol.* 168:4272-6.
- Wood, K.J., and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 3:199-210.
- Wood, K.J., H. Ushigome, M. Karim, A. Bushell, S. Hori, and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory cells in transplantation. *Novartis Found Symp.* 252:177-88; discussion 188-93, 203-10.
- Woods, A., and J.R. Couchman. 2000. Integrin modulation by lateral association. *J Biol Chem*. 275:24233-6.
- Woods, M.L., and Y. Shimizu. 2001. Signaling networks regulating beta1 integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to extracellular matrix. *J Leukoc Biol*. 69:874-80.
- Worthylake, R.A., and K. Burridge. 2001. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 13:569–77.
- Ybarrondo, B., A.M. O'Rourke, A.A. Brian, and M.F. Mescher. 1994. Contribution of lymphocyte function-associated-1/intercellular adhesion molecule-1 binding to the adhesion/signaling cascade of cytotoxic T lymphocyte activation. *J Exp Med.* 179:359-63.
- Yoshida, M., W.F. Westlin, N. Wang, D.E. Ingber, A. Rosenzweig, N. Resnick, and M.A. Gimbrone, Jr. 1996. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 133:445-55.

- Zheng, C., Z. Xing, Z.C. Bian, C. Guo, A. Akbay, L. Warner, and J.L. Guan. 1998. Differential regulation of Pyk2 and focal adhesion kinase (FAK). The C-terminal domain of FAK confers response to cell adhesion. *J Biol Chem*. 273:2384-9.
- Zhu, H., and H.F. Bunn. 2001. Signal transduction. How do cells sense oxygen? *Science*. 292:449-51

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders bei *Herrn Prof. Dr. Volker Schirrmacher* bedanken. Er gab mir nicht nur die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung, sondern unterstützte mich auch durch seine stete Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge.

Ein ganz besonderes Dankeschön richtet sich an *Herrn PD Dr. Philipp Beckhove*, der durch seine freundliche und unkomplizierte Art, sowie seine konstruktive Kritik, sein Fachwissen und sein Vertrauen in selbstständiges Arbeiten, entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Wink danke ich sehr für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

*Herrn Prof. Dr. Eisenhut* und *Herrn Prof. Dr. Hilgenfeldt* danke ich für die bereitwillige Übernahme der Prüfung.

Mein Dank gilt auch *Herrn Prof. Dr. Weitz, Herr Dr. Moritz Koch, Herr Dr. Dalibor Antolovic und Herr Louis Galindo* für die ständige Versorgung mit Gewebe und Blutproben. Ohne ihr großes Engagement und Interesse wären diese Studien nicht durchführbar gewesen. Sie alle waren stets viel zu freundlich, um "nur" Kooperationspartner zu sein.

*Frau Mariana Bucur* möchte ich ein sehr herzliches Dankeschön zukommen lassen. Durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre Koordinationsfähigkeit war sie meine größte Stütze im täglichen Laborbetrieb. Vielen Dank auch für die Kaffeepausen, sowie für die unzähligen "Guzzls" und Gummibärchen. Die Küche mag ich sehr...

*Frau PD Dr. Elisabeth Suri-Payer* danke ich besonders für ihre fachlichen Diskussionen, ihre Anregungen, sowie für die Bereitstellung von Methodik und Material.

Schließlich danke ich auch allen *Freunden und Arbeitskollegen* für die gute Atmosphäre und die lustigen Stunden während und nach der Arbeit. *Herrn Dr. Maximilian Aigner und Herrn Kim Pietsch* gilt ein besonderer Dank für ihre freundliche Unterstützung in allen Lagen (merci und kamsa-hamnida).

*Yasmin* danke ich für ihre fortwährend liebevolle Unterstützung, ihre Stärke, ihre Wärme und ihr Vertrauen ("sukran habibti"). Ohne Humus und Sartar geht´s schon lange nicht mehr… aber Viez ist entschieden besser als Äppler!

Ganz besonders herzlich möchte ich *meinen Eltern* und damit gleichzeitig *meinen treusten Freunden* danken. Ihre Wärme und Hilfsbereitschaft ist grenzenlos.