

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Hämatologie und Onkologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Phänotypische Charakterisierung Tumor-assoziiertes B-Zellen im
B16 Melanom der Maus und im Kolorektalen-Karzinom des
Menschen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Laura Stephanie Neuhaus
aus Hannover

promoviert am 01. Juli 2015

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2016

Druck durch:
Druckzentrum der Eidgenössisch Technischen Hochschule Zürich,
Zürich, Schweiz

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. M. S. von Bergwelt - Baidon
2. Berichterstatterin: Frau Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. med. C. Mauch

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt-Baidon erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/ eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, 08.12.2014

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind, nach entsprechender Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt-Baildon, Dr. med. Alexander Shimabukuro-Vornhagen sowie Frau Dr. rer. nat. Tanja Liebig, von mir selbst durchgeführt worden. Unterstützung erhielt ich hierbei von der medizinisch-technischen Assistentin Frau Anne Fiedler. Die Patientenproben wurden am Universitätsklinikum Köln in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie (Leitung Universitätsprofessor Dr. A.H. Hölscher), im Marienhospital Brühl in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie (Leitung Dr. med. P. Scherwitz) und im St. Elisabeth Krankenhaus Köln in der Chirurgischen Klinik (Leitender Oberarzt Privatdozent Dr. med. T. Koslowsky) gesammelt und freundlicherweise zur weiteren Untersuchung an die AG Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bergwelt gereicht. Die Aufarbeitung der humanen Patientenproben erfolgte zudem gemeinsam mit Dr. med. H. A. Schlößer, Frau J. Malcher, Frau K. Wennhold, Frau L. Gryschock und Herrn H. J. Becker.

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Michael v. Bergwelt-Baildon aussprechen, der mich seit Beginn der Arbeit im Labor stets ermutigt und unterstützt hat. Durch ihn ergab sich für mich die Möglichkeit einer Promotion an der Klinik I für Innere Medizin unter der Leitung von Universitätsprofessor Dr. Michael Hallek. Dafür möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Die gesamte Laborarbeit verlief immer harmonisch, kollegial und freundschaftlich und wird mir immer in sehr positiver Erinnerung bleiben. Daher möchte ich mich auch ausdrücklich für die große Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Tanja Liebig und Herrn Dr. med. Alexander Shimabukuro-Vornhagen bedanken, die vor allem in den ersten Wochen immer als Ansprechpartner zur Verfügung standen und mich mit Geduld in alles einwiesen. Auch Herrn Dr. med. Hans Anton Schlösser möchte ich sehr für seine Unterstützung danken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit führte.

Mein Dank gilt jedoch auch meinen Kollegen und Freunden, die mich während des Studiums und der Zeit im Labor fachlich wie auch persönlich unterstützt haben. Rieke, Imaan, Miro, Hans, Michael, Kathi und Constanze, eure Hilfe, Rat und Humor haben die Jahre des Studiums und die Erstellung dieser Arbeit um vieles leichter gemacht.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern Jens und Paki, die mich seit Beginn des Studiums durch ihr unermüdliches Verständnis, ihre Motivation und ihren Beistand unterstützt und es mir ermöglichen haben, ein Semester für die wissenschaftliche Arbeit zu verwenden. Sie tragen einen Großteil zum Gelingen dieser Arbeit und meines Studiums bei.

Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem und seine Bedeutung für die Tumorgenese	1
1.2 Die B-Zelle als Regulator der Immunantwort	4
1.2.1 Tumor-assoziierte B-Zellen und ihre Rolle in der Tumorgenese.....	7
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Materialien	11
2.1.1 Reagenzien	11
2.1.2 Medien	12
2.1.3 Antikörper für durchflusszytometrische Messung	13
2.1.4 Laborgeräte	15
2.2 Methoden	17
2.2.1 Mäusestamm.....	17
2.2.1.1 Tumorinokulation und Überwachung des Wachstums.....	17
2.2.2 Aufarbeitung der Gewebeproben	17
2.2.2.1 Aufarbeitung der B16 Melanom-Tumorproben	17
2.2.2.2 Aufarbeitung der lymphatischen Organe (Milz).....	19
2.2.2.3 Zellisolation aus humanem peripheren Blut, Kolon-Tumoren und metastatischem Gewebe	20
2.2.3 Zellkulturarbeit.....	20
2.2.3.1 Kultur von B16 Melanozyten	20
2.2.3.2 Kultur und Ausplattierung muriner CD40L-Transfected HeLA Cells	22
2.2.3.3 CD40-Aktivierung muriner B-Zellen	22
2.2.3.4 IL-10 Stimulation und intrazellulärer Stain	23
2.2.3.5 Bestimmung der Zellzahl	25
2.2.3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellsuspensionen	25
2.2.4 Durchflusszytometrie.....	26
2.2.4.1 Antikörperfärbung zur Messung im Gallios™ Flow Cytometer	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Phänotypische Charakterisierung Tumor-assoziiierter B-Zellen des B16 Melanom der Maus.....	27

3.2 Charakterisierung Tumor-assoziiierter B-Zellen bei Patienten mit Kolorektalen-Karzinom (CRC).....	31
3.2.1 Patientencharakteristik.....	31
3.2.2 Vergleich der B-Zell-Population und Subpopulationen in CRC- Tumorgewebe, PBMC von CRC-Patienten und gesunden Spendern	32
3.3 Vergleich der Tumor-assoziierten B-Zellen in CRC des Menschen und B16 Melanom der Maus	34
3.4 CD40-Aktivierung muriner B-Zellen aus dem B16 Melanom.....	35
3.4.1 Wachstumsverlauf der B-Zellen unter CD40-Liganden.....	35
3.4.2 Mikroskopische Kontrolle der Clusterbildung	36
3.4.3 Durchflusszytometrische Analyse CD40-Aktivierung	37
3.5 IL-10 Stimulation der B-Zellen aus der Milz B16 Melanom-Tragender Tiere und aus den Milzen gesunder Tiere.....	39
4 Diskussion	42
5 Zusammenfassung.....	51
6 Literaturverzeichnis	56
7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	66
8 Anhang	67
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	67
9 Lebenslauf.....	68

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Antigen präsentierende Zelle
BLNK	B-cell linker protein
Breg	regulatorische B-Zelle
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CRC	Kolorektales Karzinom
CVID	Common variable immunodeficiency
d	Tag (engl. day)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetales Kalbsserum
FS	Forward-Scatter
g	Gramm
G	Gray
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society of Laboratory Animals
HC	Healthy Control
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HeLA	Henrietta Lacks Zelllinie
HEPES	4-(2Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonic-acid
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
MEM	Minimum Essential Media
MFI	Mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

n	Anzahl
NC	Negativkontrolle
ng	Nanogramm
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat buffered saline
PEB	Protein Extraction Buffer
PMA	Phorbol 12-Myristate
sec	Sekunde
sog.	sogenannte
SS	Sidewards-Scatter
TAB	Tumor-assoziierte B-Zelle
TDE	Tumordissoziations-Enzymreagenz
TGF- β	Transforming-Growth-Factor- β
Th	T-Helferzelle
U	Umdrehungen
UICC	Union internationale contre la cancer
vgl.	vergleiche
z.Bsp.	zum Beispiel
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem und seine Bedeutung für die Tumorgenese

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems ist die Erkennung körperfremder und damit potentiell schädlicher Zellen und ihrer Bestandteile sowie einer darauf generierten immunologischen Antwort zum Schutz des menschlichen Organismus.

Es wird in die angeborene (unspezifische) und erworbene (spezifische) Immunität unterteilt. Beim Gesunden besteht die angeborene Immunität aus der Haut, den Schleimhäuten, sowie den Monozyten/Makrophagen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und Granulozyten. Zudem bilden verschiedenste Proteine im Plasma und auf Zelloberflächen das Komplementsystem aus, welches ein wichtiges Verbindungsglied zwischen angeborener und erworbener Immunität bildet. Durch zellständige und lösliche Rezeptoren werden körpereigene und körperfremde Oberflächen erkannt. Grundsätzlich werden als Antigen Moleküle bzw. Strukturen bezeichnet, welche eine spezifische Immunantwort auslösen. Als Reaktion des angeborenen Immunsystems auf ein Antigen, kommt es zur Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten oder zur direkten Destruktion der Zielzellen durch die natürlichen Killerzellen. Dieses System aus humoralen und zellulären Effektormechanismen benötigt nicht, wie die erworbene Immunität, eine vorherige Exposition gegenüber den Antigenen zur Aktivierung. Andererseits ist es ihm jedoch nicht möglich, sich gegen die spezifischen Gegebenheiten der Pathogene zu adaptieren.

Zur erworbenen Immunität gehören T- und B-Lymphozyten sowie Haut- und Schleimhaut assoziiertes lymphatisches Gewebe. Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen stimulieren die Lymphozyten durch Endozytose und Prozessierung von Fremdstoffen und Präsentation der generierten Peptide auf ihrer Zelloberfläche. Die B-Zellen vermitteln in Folge dessen eine humorale Antwort in Form der Produktion von Antikörpern. Durch ihre Antigen-präsentierende Funktion vermitteln sie außerdem eine optimale Aktivierung der zellulären Abwehr. Diese erfolgt

durch die T-Zellen, welche wiederum in $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen unterteilt werden. Die Antigenpräsentation für diese zwei Subpopulationen erfolgt durch unterschiedliche Membranproteine, den Major Histocompatibility Complex I oder II (MHC-I oder MHC-II). Durch Präsentation zelleigener Proteine auf MHC-I können antigenspezifische $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen virale Antigene, aber auch Tumorantigene erkennen. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen, sowie zu einer Freisetzung von GranzymeB oder Perforin, welches zur Zytolyse oder Induktion des programmierten Zelltodes führt.

MHC-II hingegen kommt nur auf der Oberfläche von Zellen mit Antigenpräsentierender Kapazität vor. Über MHC-II kommt es zur lokalen Aktivierung der T-Helferzellen, welche wiederum durch die Produktion von Zytokinen zur Aktivierung und Proliferation anderer T- und B-Zellen führen. Daher unterscheidet man sie zusätzlich in zwei Subpopulationen, die sich je nach präsentiertem Antigen aus den $CD4^+$ T-Helferzellen bilden können. Th1-Zellen reagieren auf die Präsentation viraler und bakterieller Antigene mit der Produktion von Interferon- γ , welches wiederum die zelluläre, zytotoxische Immunantwort fördert. Th2-Zellen reagieren auf die Präsentation parasitärer Antigene mit der Produktion von Interleukin-4. Dies fördert wiederum die humorale Immunantwort. Somit nehmen T-Helferzellen eine zentrale Rolle ein, da sie für die Aktivierung der zellulären und humoralen Immunabwehr verantwortlich sind.

Im Rahmen der gezielten Reaktion des erworbenen Immunsystems kommt es zudem zur Differenzierung von T- und B-lymphozytärer Gedächtniszellen. Bei erneuter Exposition gegenüber einem Antigen, kann so eine stärkere und spezifischere immunologische Antwort erfolgen (Murphy, Travers, & Walport, 2009).

Nach kardiovaskulären Erkrankungen, stellen Neoplasien und deren Folgen die zweithäufigste Todesursache dar (Xu, Kochanek, & Murphy, 2010). Dazu stieg in den Jahren 2000 bis 2010 die Inzidenz an malignen Erkrankungen in der deutschen Bevölkerung bei Männern um 21% und bei Frauen um 14% an (Kaatsch, Spix, & Hentschel, 2013). Trotz operativer und medikamentöser

Therapieoptionen ist die Mortalität durch Malignome hoch und neue therapeutische Ansatzpunkte daher von großer Bedeutung.

Dass unser Immunsystem in der Tumorgenese involviert ist, zeigte schon Paul Ehrlich zum Ende des 19. Jahrhunderts durch onkologische Untersuchungen in Form von tierexperimentellen Vakzinierungsstudien deren Annahmen in den letzten Jahrzehnten bestätigt werden konnten (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem dabei vor Tumoren schützende aber auch die Malignomentstehung unterstützende Eigenschaften besitzt und somit eine Doppelrolle einnimmt (Schreiber, Old, & Smyth, 2011). Dass unser adaptives Immunsystem Krebszellen erkennen kann, zeigten verschiedene Untersuchungen und Versuche in Melanomen (R. Wang, 1999), Kolorektalem-Karzinom (Saeterdal et al., 2001) und chronisch myeloischer Leukämie (Clark et al., 2001). Das Immunsystem besitzt somit die Fähigkeit, Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen und so den Organismus vor malignen Erkrankungen zu schützen (Corthay, 2014). Klinische Beobachtungen diesbezüglich zeigten, dass es bei einer primären Immundefizienz deutlich häufiger zur Ausbildung von Malignomen kommt (Salavoura, Kolialexi, Tsangaris, & Mavrou, 2008; van der Meer, Weening, Schellekens, van Munster, & Nagengast, 1993). Patienten, die unter einer CVID litten, zeigten hierbei eine erhöhte Rate an Lymphomen, aber auch epithelialen Tumoren des Magens, der Brust, der Harnblase und des Gebärmutterhalses (Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, 1985; Mueller & Pizzo, 1995). Auch in Versuchsreihen mit Mäusen, die unter einem Verlust von B- und T-Lymphozyten litten, konnte nachgewiesen werden, dass diese wesentlich anfälliger für spontane Tumorneubildungen aber auch induzierte Karzinome waren (Shankaran et al., 2001).

Des Weiteren führen auch sekundäre Immundefizienzen, welche durch die Einnahme immunsuppressiver Medikamente entstanden, zu einem vermehrten Auftreten von malignen Erkrankungen. Dies konnte in verschiedenen Langzeitstudien an nierentransplantierten Patienten nachgewiesen werden, die neben verschiedenen Karzinomen in Kolon, Larynx, Lunge oder Blase, vor allem Lymphome entwickelten (Birkeland et al., 1995; Hoover & JR, 1973). Zudem wurde auch nach Leber-, Lungen- und

Herztransplantationen ein vermehrtes Auftreten von Malignomen verzeichnet (Engels, Pfeiffer, & Fraumeni, 2011). Auch Infektionen mit HIV und die damit verbundene Anti-Retrovirale-Therapie führen zu einer sekundären Immundefizienz und dem gesteigerten Auftreten von Neoplasien, wie Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen (Clifford et al., 2005).

Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass humane solide Tumore häufig von Lymphozyten, Makrophagen oder Mastzellen infiltriert sind und ihr Vorhandensein ein prognostischer Faktor für den Krankheitsverlauf darstellen kann (Fridman, Pagès, Sautès-Fridman, & Galon, 2012). So konnte zum Beispiel erwiesen werden, dass die Infiltration mit CD3⁺-T-Zellen im Ovarialen- und Kolon-Karzinom mit einem längeren Überleben der Patienten positiv korreliert (Galon et al., 2006; Zhang et al., 2003). Speziell für das Kolon-Karzinom konnte eine prognostische Überlegenheit des Ausmaßes der lymphozytären Infiltration gegenüber der klassischen UICC-Klassifikation gezeigt werden (Galon et al., 2006).

Trotzdem haben Tumore Wege gefunden der Überwachung durch unser Immunsystem zu entgehen. Hierzu gehören die Produktion immuninhibitorischer Zytokine, die Schaffung eines Milieus welches die T-Zellen in ihrer Funktion hemmt, der Antigenverlust der Tumorzellen, sowie die Resistenz der Lymphozyten gegenüber immunstimulatorischer Zytokine (Zitvogel, Tesniere, & Kroemer, 2006).

1.2 Die B-Zelle als Regulator der Immunantwort

In der Maus, wie auch im Menschen entstehen B-Zellen durch die Regulierung von intrinsischen Faktoren, Zytokinen und zellständigen Liganden aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und durchlaufen im Anschluss mehrere Kontrollen, bevor sie dieses verlassen (Bertrand et al., 2000). Anhand ihrer Entwicklungsstadien im Knochenmark und im lymphatischen System lassen sie sich in Pro-, Prä-, unreife-, Prä-Keimzentrum (naive)-, Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zelle sowie Plasmazellen unterscheiden (Murphy et al., 2009). Aus dem Knochenmark gelangen die vorerst unreifen B-Zellen in die Milz, wo sie zu reifen naiven B-

Zellen differenzieren. Durch weitere Zirkulation mit dem Blut erreichen sie die sekundären lymphatischen Organe, in welchen eine vollständige Aktivierung und Differenzierung durch Präsentation von Antigenen erfolgt (von Andrian & Mempel, 2003).

Grundlegend werden B-Zellen als positive Regulatoren der Immunantworten betrachtet und haben verschiedenste Funktionen: Durch ihre Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen haben sie eine zentrale Rolle in der humoralen Immunität. (D. J. DiLillo et al., 2007; LeBien & Tedder, 2008). Des Weiteren konnte in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden, dass sie die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Aktivierung und -Antwort gegen Fremd- und Selbstantigen regulieren (Bouaziz et al., 2007; Xiu et al., 2008). Zudem fungieren sie als Antigen-präsentierende Zellen und haben so einen wichtigen Stellenwert im adaptiven Immunsystem (Yuseff, Pierobon, Reversat, & Lennon-Duménil, 2013). Durch ihre Produktion von Zytokinen stellen sie stimulierende Moleküle zur Verfügung und treiben die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen in T-Helfer-Zellen 1 (Th1) oder die Th2 Subpopulation voran (Harris et al., 2000).

Es ist zudem erwiesen, dass B-Zellen durch antikörperabhängige und -unabhängige Mechanismen zur Pathogenese von autoimmunen Erkrankungen beitragen (Martin & Chan, 2006; Yanaba, Bouaziz, Matsushita, et al., 2008). Ergebnisse im Tierversuchsmodell zeigten außerdem, dass sie unabhängig von ihrer Antikörperproduktion, an der chronischen Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation involviert sind (Zeng et al., 2014).

Eine negative Regulation der allgemeinen Immunantwort konnte für eine spezifische B-Zell Subpopulation nachgewiesen werden (Claudia Mauri & Ehrenstein, 2008; Mizoguchi & Bhan, 2006). Es wurde der Begriff der regulatorischen B-Zellen geprägt (Breg), welche durch die Produktion von immunsupprimierendem Interleukin-10 (IL-10) und Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) die immunologische T-Zell Antwort beeinflusst bzw. inhibiert (Mizoguchi & Bhan, 2006). Studien zeigten zudem, dass der Tumor-inhibitorische Effekt von T-Zellen durch die Produktion von IL-10 reguliert wird, was wiederum eine Involvierung von Bregs in der Tumorgenese wahrscheinlich macht (Inoue, Leitner, Golding, & Scott, 2006).

Durch weitere Untersuchungen der Bregs ließen sich schließlich verschiedene Immunphänotypen in Maus und Mensch definieren. Eine Population von CD1d^{hi} CD5⁺ CD19⁺ Zellen (B10 Zellen) konnte in Milz und Peritonealhöhle von Mäusen phänotypisiert werden und gilt als zentraler Produzent von IL-10 und somit als Regulator der T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion (Yanaba, Bouaziz, Matsushita, & Tsubata, 2009; Yanaba, Bouaziz, Haas, et al., 2008). Auch beim Menschen konnte diese B10 Zellen Population mit dem Phänotyp CD24^{hi} CD27⁺ im peripheren Blut nachgewiesen werden (Iwata et al., 2011). Des Weiteren konnte eine einzigartige Population von CD19⁺ B220⁺ CD25⁺ regulatorischen B-Zellen, die tBregs, in dem 4T1 Mausemodell für Brustkrebs definiert werden (Olkhanud, Damdinsuren, et al., 2011). Durch ihre hohe Expression von TGF- β können tBregs nicht regulatorische CD4⁺ T-Zellen in aktive regulatorische T-Zellen umwandeln, welche wiederum die Proliferation von T-Zellen inhibieren und so eine Metastasierung des Tumors ermöglichen. Dies konnte für das obige Mausmodell aber auch für solide humane Tumoren in vitro nachgewiesen werden (Olkhanud, Damdinsuren, et al., 2011; Olkhanud, Rochman, et al., 2011). Dies zeigt, dass regulatorische B-Zellen die Tumorprogression positiv beeinflussen könnten.

Bezüglich der Expression von IL-10 durch die Bregs zeigten durchgeführte Experimente, dass die genetische Depletion von IL-10 in Mäusen zur Ausbildung chronischer Entzündungen führen kann (Kühn, Löhler, Rennick, Rajewsky, & Müller, 1993). Umgekehrt führte der Transfer IL-10 produzierender B-Zellen in Mäuse zu einem verminderten Auftreten von Entzündungsreaktionen, wie zum Beispiel einer Arthritis und beweist die positive immunologische Regulation durch Bregs (C. Mauri, Gray, Mushtaq, & Londei, 2003). Bezüglich der Wirkung von IL-10 auf Tumore konnte am Mausmodell gezeigt werden, dass Bregs die Effizienz einer Immuntherapie mit CD20 Antikörpern bei Lymphomen inhibieren können und folglich den Therapieerfolg beeinflussen (Horikawa, 2011).

1.2.1 Tumor-assoziierte B-Zellen und ihre Rolle in der Tumorgenese

Es ist bekannt, dass $CD8^+$ zytotoxischen T-Lymphozyten die Fähigkeit besitzen Tumorzellen direkt zu töten und es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen ihrer Infiltration im Tumorgewebe und dem Überleben von Patienten (Pagès et al., 2010). Jedoch spielen auch B-Lymphozyten durch ihre mögliche Interaktion mit T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der Tumorimmunologie (Nelson, 2010).

B-Zellen konnten in verschiedenen humanen Tumoren nachgewiesen werden, wie zum Beispiel im Mamma- (Menegaz, Michelin, Etchebehere, Fernandes, & Murta, 2008), Lungen- (Yasuda, Takenoyama, & Obata, 2002), Ovarial- (Nielsen et al., 2012) und Kolorektalen- Karzinom (Maletzki et al., 2012). Zudem konnte für das Mamma-Karzinom eine positive Korrelation im Ausmaß der B-Zell-Infiltration und der Prognose gezeigt werden (Eiró et al., 2012; Martinet et al., 2011). Im Gegensatz dazu sind für andere Tumorentitäten negative Auswirkungen einer B-Zell-Infiltration beschrieben (Quan et al., 1999; Wejksza et al., 2013). Ebenfalls sind für die B-Zelle das Wachstum von Malignomen fördernde als auch hemmende Effekte nachgewiesen worden (Fremd, Schuetz, Sohn, Beckhove, & Domschke, 2013). Diese Resultate lassen eine unterschiedliche Zusammensetzung der B-Zell-Subpopulationen in Tumoren vermuten und machen eine genauere Untersuchung daher umso wichtiger.

Zudem konnte gezeigt werden, dass B-Zellen zur optimalen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell Tumor Immunität benötigt werden. Bei Mäusen die unter einem B16 Melanom und gleichzeitigem Verlust der B-Zell-Reihe litten, wurde ein verstärktes Wachstum des Melanoms beobachtet (David J DiLillo, Yanaba, & Tedder, 2010). Ergebnisse in einer Versuchsreihe mit Ratten zeigten, dass es unter B-Zell-Depletion zu einem vermehrten Auftreten von Metastasen kam (Quan et al., 1999). Dieser Sachverhalt konnte in anderen Tiermodellen bestärkt werden, in denen B-Zellen eine T-Zell vermittelte Anti-Tumor Immunität induzierten und es zu einer Tumorregression kam (Li et al., 2011; Sorenmo et al., 2011).

Auch die regulatorischen B-Zellen scheinen durch ihre Zytokinproduktion die T-Zell abhängige antitumor-Antwort zu unterdrücken und so die

Tumorentstehung zu fördern (Balkwill, Montfort, & Capasso, 2013; Shah et al., 2005). Unter Abwesenheit von B-Zellen konnte jedoch wiederum eine verstärkte T-Zell-Antwort nach Tumorstimulation bei gleichzeitig signifikant geringerer Karzinombildung nachgewiesen werden (Inoue et al., 2006; Qin et al., 1998). Dies verstärkt die Annahme, dass TABs immunsuppressiv und immunregulatorisch wirken können und so ein Tumorstadium begünstigen. Einen weiteren Beleg hierfür liefern Ergebnisse bei denen Tumor-assoziierte IL-10 produzierende regulatorische B-Zellen die TNF-alpha abhängige Karzinogenese plattenepithelialer Tumore der Haut unterstützen (Schioppa & Moore, 2011). Interessanterweise konnte im peripheren Blut von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) auch nach radikaler Tumorentfernung eine erhöhte Zahl regulatorischer B-Zellen nachgewiesen werden, welche die Ursache für das schlechte Outcome bei dieser Erkrankung sein könnten (Chen et al., 2012).

Auch im peripheren Blut von anderen Tumorentitäten konnten Veränderungen bezüglich der B-Zell-Subpopulationen festgestellt werden. So zeigte sich im peripheren Blut von Melanompatienten ein relativer bis absoluter Verlust der Memory-B-Zellen bei gleichzeitiger Plasmazellvermehrung (Carpenter et al., 2009). Auch im Blut von Urothel- und Pankreaskarzinompatienten fanden sich vermehrt Plasmazellen. Eine genauere Untersuchung der Tumor-assoziierten B-Zellen der Patienten mit Urothelkarzinom zeigte ein vermehrtes Auftreten von Memory-B-Zellen und Plasmablasten (Zirakzadeh, Marits, Sherif, & Winqvist, 2013). Dies lässt eine Verschiebung der B-Zell-Subpopulationen zu reifen und aktivierten B-Zell-Phänotypen erkennen.

Einen weiteren Nachweis für die Tumorstimulation durch B-Zellen gelang im Mausmodell sowie für das maligne Melanom beim Menschen. Hier war eine deutliche Förderung, vor allem der lymphogenen Metastasierung durch B-Zellen nachzuweisen (Ruddell, Harrell, Furuya, & Kirschbaum, 2011; Staquicini et al., 2008). Zudem konnte schon vor längerem nachgewiesen werden, dass chronische Entzündungen einen Risikofaktor für die Entstehung einiger Krebsarten bilden (Thun, Henley, & Gansler, 2004). Auf dieser Basis durchgeführte Mausmodelle lassen vermuten, dass B-Zellen als Mediatoren chronische Entzündungen fördern und somit aktiv an der daraus

resultierenden Karzinomentstehung beteiligt sind (de Visser, Korets, & Coussens, 2005).

Dass B-Lymphozyten auch tumorprotektive Eigenschaften besitzen müssen zeigen neuere Ergebnisse. In einer retrospektiven Langzeitstudie von Lymphompatienten, welche eine Hochdosis-Chemotherapie mit dem B-Zell-depletierendem Antikörper Rituximab erhielten, zeigte sich im Verlauf der nächsten Jahre eine erhöhte Inzidenz an soliden Tumoren (Tarella et al., 2011).

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass B-Zellen anscheinend einerseits die Entstehung von Tumoren fördern, jedoch auch protektive Eigenschaften besitzen. Eine phänotypische Charakterisierung der TABs mit anschließenden funktionellen Untersuchungen ist daher von großem Interesse. Zumal viele der bisherigen Ergebnisse durch immunhistochemische Färbungen eines einzelnen B-Zell-Markers gewonnen wurden.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

B-Lymphozyten haben nachweislich sowohl tumorprotektive als auch das Tumorstadium unterstützende Eigenschaften. Eine genauere Untersuchung selbiger könnte daher wichtige Informationen bezüglich eines mit oder auf B-Zellen ausgerichteten Therapieansatzes von Malignomen liefern. Ziel dieser Arbeit ist eine phänotypische Charakterisierung Tumor-assoziiierter B-Zellen aus dem B16 Melanom der Maus. Durch die gleichzeitige Mitarbeit an der Aufarbeitung und Charakterisierung Tumor-assoziiierter B-Zellen aus dem humanen Kolon-Tumor, dürfen Teile der dabei gewonnen Daten in dieser Doktorarbeit genutzt und zum direkten Vergleich der TABs der beiden Tumorentitäten und Spezies genutzt werden. Hieraus lässt sich ermitteln, ob grundlegende Unterschiede in der B-Zellverteilung und den B-Zellsubpopulationen in den Tumoren der beiden Spezies bestehen, welche in Hinblick auf weitere Untersuchungen der TABs berücksichtigt werden sollten. Bezüglich des B16 Melanoms würde nach Inokulation und ausreichendem Wachstum aus diesem eine Einzelzellsuspension erstellt werden und eine gezielte Isolation der TABs erfolgen. Diese würden anschließend mittels

FACS-Analyse phänotypisch charakterisiert und die Ergebnisse mit B-Zellen aus der Milz gesunder sowie melanomtragender Tiere verglichen werden. Aufgrund der Nutzung eines 10-Farben FACS-Geräts sollte eine spezifische Definition der Tumorgewebe infiltrierenden B-Lymphozyten ermöglicht werden. Auch aus den Kolon-Karzinomen würde eine Einzelzellsuspension gewonnen und die Ergebnisse mit PBMCs aus dem Blut der Tumorpatienten und gesunden Kontrollen verglichen werden.

Zur zusätzlichen funktionellen Analyse der murinen B16 Melanom TABs könnten zwei verschieden Versuche erfolgen. Über CD40-Liganden tragenden HeLA-Zellen würden die TABs in einer Zellkultur stimuliert und ihre mögliche Aktivierung mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt werden. Sollte eine Antigen-präsentierende Eigenschaft sowie Expansion nachzuweisen sein, könnte dies für weitere Experimente zur präventiven und therapeutischen Tumorstimmung am murinen B16 Melanom eingesetzt werden.

Eine weitere Option der funktionellen Untersuchung wäre die IL-10 Stimulation der Zellen. Auch bei diesem Versuch würde nach dem Ansatz einer Zellkultur die durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis der möglichen IL-10 Produktion, sowie der für die Produktion dieses Interleukins bekannten Population von CD19^{hi} CD1d^{hi} CD5⁺ regulatorischen B-Zellen aus dem TABs erfolgen. Bei beiden funktionellen Untersuchungen erfolgt die Kontrolle bzw. der Vergleich mit isolierten B-Zellen aus der Milz gesunder und tumortragender Tiere.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

Produkte	Hersteller
DMEM liquid High Glucose (4,5g/l) ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Fetales Kalbsserum (FBS) South American	Invitrogen GmbH
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Phospat buffered saline ohne Calcium und Magnesium (PBS)	PAA Laboratories GmbH
Natriumchlorid	Roth
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH
Wasser	Fresenius Kabi
B Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec
Tumordissoziations-Enzymreagenz ATP-TCA (TDE)	DCS-Innovative Diagnostik Systems GmbH
Ficoll-Plaque™ PLUS	GE Healthcare Life-Sciences
RPMI 1640 liquid mit HEPES und L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
HEPES Puffer	PAA Laboratories GmbH
Hygromycin B	invitrogen
MEM liquid mit Earle's Salts und L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Trypanblau 0,4%	Gibco
0,9% Natriumchlorid-Lösung	Berlin Chemie AG
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich
Phorbol 12-Myristate 13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Ionomycin Kalzium Salz	Sigma-Aldrich

Protein Transport Inhibitor Monensin (Golgistop)	BD Biosciences
Formaldehyd (Formafix4%)	PathoMed Logistik GmbH
Saponin	Sigma-Aldrich
Casein	Sigma-Aldrich
Interleukin 4 (IL-4)	Immuno Tools, Friesoythe
Cell-Wash	BD Biosciences
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
EasySep CD19 Biotin positiv Selection Kit	Stemcell

2.1.2 Medien

B16 Medium	500ml DMEM Medium 50 ml FBS 625µl Gentamycin 1ml β-Mercaptoethanol
PBS+5% FBS	95% PBS 5% FBS
1,6% Natrium-Chloridlösung	8g Natriumchlorid 500ml Wasser
0,2% Natrium-Chloridlösung	1g Natriumchlorid 500ml Wasser
B-Selection Medium	500ml PBS 2% FBS 1mM EDTA
PEB-Puffer	500ml PBS 0,5% FBS 2mM EDTA
Einfriermedium	FBS 10% DMSO
3,7% Formaldehyd-Puffer	37% Formaldehyd PBS

HeLA-Wildtyp(WT)-Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin (300µg/ml) 10%FBS 10mM HEPES 15µg/ml Gentamycin
HeLA-Selection-Medium	RPMI 1640 10% FBS 10mM HEPES 15µg/ml Gentamycin 0,2mg/ml Hygromycin B
mCD40B-Medium	500ml DMEM-Medium 10% (50ml) FBS 1% (5ml) HEPES 1% (5ml) MEM 187,6µl Gentamycin
mCD40Bwash-Medium	500ml DMEM-Medium 1% (5ml) HEPES 1% (5ml) MEM 187,6µl Gentamycin
PEB-Puffer	PBS mit pH 7,2 5% FBS (BSA) 2nM EDTA
Saponin-Puffer	PBS 0,5% Saponin 0,25% Casein

2.1.3 Antikörper für durchflusszytometrische Messung

Murine Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Klon</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Produzent</u>
CD86 FITC	GL1	Rat(LOU) IgG2a, κ	BD Bioscience
CD138 PE	281-2	Rat (F344) IgG2a, κ	BD Bioscience
CD19 PE-TR	6D5	Rat IgG2a	invitrogen

IgM PE-Cy5.5	II/41	Rat IgG2a, κ	eBioscience
CD27 PE-Cy7	LG.7F9	Arm. Hamster IgG	eBioscience
CD80 APC	16-10A1	Arm. Hamster IgG2, κ	BD Bioscience
CD45R/B220 APC-Alexa 750	RA3-6B2	Rat IgG2a	invitrogen
IgD eFlour 450	11-26c	Rat IgG2a, κ	eBioscience
IgG FITC	A85-1	Rat(LOU) IgG1, κ	BD Bioscience
MHC-II APC	M5/114.15.2	Rat IgG2b, κ	eBioscience
MHC-I FITC	28-14-8	Mouse IgG2a, κ	eBioscience
CD80 FITC	16-10A1	QC Testing: Mouse	BD Bioscience
CD86 PE	GL1	Rat(Lou)IgG2a, κ	BD Bioscience
IAb FITC	AF6-120.1	Mouse(BALB/c)IgG _{2a} , κ	BD Bioscience
H2Db PE	KH95	Mouse(BALB/c)IgG _{2b} , κ	BD Bioscience
CD19 PE-Cy7	1D3	Rat(LEW)IgG2a, κ	BD Bioscience
CD3 APC-Cy7	145-2C11	Arm. Hamster IgG1, κ	BD Bioscience
CD1d FITC	1B1	Rat IgG2b, κ	eBioscience
CD5 APC	53-7.3	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Bioscience
IL-10 PE	JES5-16E3	Rat IgG2b	BD Bioscience
IgG2b PE (Isotyp)	A95-1	Rat(Lou)IgG2b, κ	BD Bioscience
CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)	2.4G2	Rat IgG2b, κ	BD Bioscience

Humane Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Klon</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Produzent</u>
IgD FITC	IA6-2	Mouse IgG2a, κ	BD Bioscience
CD10 ECD	ALB1	Mouse IgG1	Beckman Coulter
CD19 APC Alexa780	H1B 19	Mouse IgG1, κ	eBioscience
CD20 Pacific Blue	2H7	Mouse IgG2b, κ	BioLegend
CD21 APC	B-ly4	Mouse IgG1, κ	BD Bioscience
CD24 PE	ML5	Mouse IgG2a, κ	BioLegend
CD27 PC 7	1A4CD27	Mouse IgG1, κ	Beckman Coulter
CD38 PC 5.5	LS198.4.3	Mouse IgG1	Beckman Coulter
CD45 Pacific Orange	HI30	Mouse IgG1	life Technologies
CD80 FITC	BB1	Mouse IgM, κ	BD Bioscience
CD86 PE	2331 (FUN-1)	Mouse IgG1, κ	BD Bioscience

2.1.4 Laborgeräte

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Zellkulturflaschen	Greiner Labortechnik
Kanülen 0,45mm x 13mm	BD Microlance 3
Spritzen	BD Plastipak
Petrischale	Nunc A/S
Einmalskalpelle	Feather Safety Razor CO., LTD
Zentrifugenröhrchen (15ml/50ml)	Sarstedt
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Einmalfilter/Zellfilter (70µm/100µm)	Falcon, A Corning Brand
gentleMACS-Tube	Miltenyi Biotec
gentleMACS-Gerät	Miltenyi Biotec
6/24 Well-Platte	Corning Incorporated
Objektträger	AL

Deckgläschen	Mariefeld
Einfrierröhrchen	Sarstedt
autoMACSpro	Miltenyi Biotec

2.2 Methoden

2.2.1 Mäusestamm

6 bis 8 Wochen alte C57/BL6 Mäuse (Haplotyp H-2b) wurden von Charles River (Deutschland) erworben. Alle Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in den Stallungen der Experimentellen Medizin an der Universität zu Köln gehalten und im Alter von 8 bis 12 Wochen für die Experimente eingesetzt.

2.2.1.1 Tumorinokulation und Überwachung des Wachstums

Die Injektion der B16 Melanozyten erfolgte bei 8 bis 12 Wochen alten Mäusen des Stammes C57/BL6 in die jeweils rechte oder linke hintere Flanke. Zuvor wurde die Injektionsstelle desinfiziert. Bei der Injektion war darauf zu achten, dass diese streng subkutan erfolgte. Die Tiere wurden zuvor markiert, damit eine genaue Überwachung des Tumorwachstums möglich war. Die Entstehung eines Tumors wurde durch tägliches Abtasten der Flanke bzw. des Rückens kontrolliert. Bei vorhandenen Tumoren erfolgte die Messung mittels einer Schieblehre, um die Tumorgöße mithilfe des maximalen Produktes zweier lotrechter Durchmesser in mm^2 zu berechnen. Bei Auftreten eines Abbruchkriteriums der GV-SOLAS, wie völlige Apathie, Abwehrreaktionen oder Aggressivität beim Palpieren der Tumoren, stark verminderte Futter- oder Wasseraufnahme, Atembeschwerden, motorische Auffälligkeiten, abnormale Körperhaltung, Gewichtsverlust und Überschreiten der Tumorgöße von 150mm^2 wurden die Tiere vorzeitig durch zervikale Dislokation getötet. Ansonsten wurden die Tiere wie geplant 10-14 Tagen nach der Tumorinokulation und bei ausreichender Tumorgöße getötet und die lymphatischen Organe, sowie der Tumor zu Analyse Zwecken entnommen.

2.2.2 Aufarbeitung der Gewebeproben

2.2.2.1 Aufarbeitung der B16 Melanom-Tumorproben

Die Aufbereitung der Melanome und die Selektion der B-Lymphozyten aus ihnen erwies sich als kompliziert. Ein Problem bestand in der Konsistenz der

Melanome. Auch nach mehrmaligem Waschen, Filtern und Auftrennen entlang eines Dichtegradienten mittels Ficoll, enthielten die Proben noch sehr viele Melanozyten. Diese verliehen der Zellsuspension eine adhärenzte Konsistenz. Dies stellte wiederum Probleme für die Anwendung verschiedener Selektions-Systeme für B-Zellen dar. Auch nach Berechnung der maximalen Verdünnung führte die Tumorzellsuspension zum Verschluss von Filtern oder einer unzureichenden Bindung von Antikörpern. Hinzu kam eine sehr geringe Ausbeute an Tumor-assoziierten B-Zellen die nicht in Relation zum Materialverbrauch stand. Bis zur Erstellung des folgenden Protokolls wurden folgende Systeme zur Gewinnung der B-Zellen aus dem B16 Melanom ausprobiert: Das EasySep CD19⁺ Biotin positiv Selection Kit (Stemcell) bei dem die adhärenzte Melanommasse eine magnetische Separation verhinderte. Das pluriSelect CD19⁺ pluriBead Kit (pluriSelect) bei dem jedoch die Filter verstopften. Außerdem die murine CD19 MultiSort Anreicherung (Miltenyi Biotec) bei dem die magnetische Säule durch die Zellsuspension verstopfte. Sowie der ARIA III Sorter (BD), bei dem es jedoch zu Laserstrahlabbrüchen und einer übermäßigen Belastung des Gerätes aufgrund der niedrigen Flowrate kam. Letztendlich erfolgte die Aufreinigung mittels autoMACSpro und einer vorangegangenen Tumoraufbereitung durch den gentleMACS wie folgt:

Bei ausreichender Tumorgroße wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und anschließend die Tumore, sowie die lymphatischen Organe frei präpariert und entfernt. Letztere wurden wie unten beschrieben (vgl. 2.2.2.2) weiter bearbeitet. Die Tumore (5 Tumore von 5 Tieren) wurden in einer Petrischale mittels Skalpell zerkleinert und die Stückchen in ein gentle-MACS-Tube gegeben. In dieses wurde zusätzlich TDE 1:1 gegeben und auf Eis gelagert, bis die Probengewinnung abgeschlossen war. Anschließend wurde das Tube verschlossen und durchlief das gentleMACS Programm m_impTumor_02. Nach dessen Beendigung wurde das Tube bei 37°C für 40min auf einem Roller inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Durchlauf des Programms m_impTumor_02. Die entstandene Tumorsuspension wurde über einen 70µm Zellfilter in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Röhrchen anschließend mit 50ml PEB-Puffer aufgefüllt. Nach einer Zentrifugierung bei 1300U/min für 10min, wurde der Überstand abgenommen

und die Zellen in 30ml PEB-Puffer resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde danach vorsichtig auf 15ml Ficoll, welches sich in einem neuen 50ml Röhrchen befand, aufgetragen. Dieses wurde anschließend für 30min bei 2400U/min ohne Bremse zentrifugiert. Nach diesem Vorgang zeigten sich drei Schichten in dem Röhrchen. Die oberste Schicht wurde vorsichtig abgezogen und verworfen. Die intermediäre Schicht, welche die Tumorlymphozyten enthalten sollte, wurde abpipettiert und in ein frisches Röhrchen überführt. Diese Tumorlymphozyten wurden mit 30ml B-Selection-Medium suspendiert und es erfolgte eine Zentrifugierung bei 1200U/min für 5min. Nach erneuter Resuspension in B-Selection-Medium erfolgte die Aufreinigung bzw. Gewinnung der B-Lymphozyten nach dem beiliegendem Protokoll für den autoMACSpro mit dem B cell Isolation kit über 2 Säulen.

2.2.2.2 Aufarbeitung der lymphatischen Organe (Milz)

Die Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde zügig die Milz frei präpariert, entnommen und in einem Zentrifugenröhrchen, welches mit PBS gefüllt und auf Eis gelagert war, gegeben. Auf ein frisches Zentrifugenröhrchen (50ml) wurde dann ein 100µm Zellfilter gesetzt und dieser mit einer Lösung aus PBS+5%FBS befeuchtet. Danach wurde die Milz auf den Filter gelegt und mittels eines Spritzenstempels zerdrückt. Anschließend wurde der Zellfilter mit 10-15ml der PBS+5%FBS-Lösung gespült und das Zentrifugenröhrchen mit selbiger Lösung auf 50ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugierung bei 1200U/min für 5min. Danach wurde der Überstand abgenommen und eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 5ml einer 1,6% Natriumchlorid-Lösung für 30sec versetzt, gefolgt von der Zugabe weiterer 5ml einer 0,2% Natriumchlorid-Lösung. Durch den osmotischen Stress kam es zum Zerplatzen der Erythrozyten. Anschließend wurde das Röhrchen mit 50ml der PBS+5%FBS Lösung aufgefüllt und es erfolgte eine Zentrifugierung bei 1200U/min für 5min. Nach abpipettieren des Überstandes erfolgte eine Resuspension der Zellen in B-Selection Medium. Die weitere Gewinnung der

B-Zellen aus den Proben erfolgte dann mittels EasySep CD19⁺ Biotin positiv Selection und dem dazu beiliegendem Protokoll.

2.2.2.3 Zellisolation aus humanem peripheren Blut, Kolon-Tumoren und metastatischem Gewebe

Peripheres Blut wurde von gesunden und an einem Kolon-Karzinom erkrankten Spendern mit deren Einverständnis entnommen. Zur Gewinnung der PBMC erfolgte eine auf unterschiedliche Dichte der Zellen basierende Auftrennung mittels Ficoll. Hierzu wurden in ein 50ml Zentrifugenröhrchen 15ml Ficoll vorgelegt und das Blut, welches mit PBS auf ein Volumen von 35ml suspendiert wurde, vorsichtig darauf pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugierung bei 2400U/min ohne Bremse für 20min. Die entstandene Intermediärschicht wurde danach abgezogen und zweimalig mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen gezählt und für die FACS-Analyse weiter bearbeitet.

Die frischen und unfixierten Tumorgewebeproben wurden nach der operativen Entnahme innerhalb von 12h aufgearbeitet.

Hierzu wurde das Gewebe in einer Petrischale mittels Einmalskalpell zerkleinert und in ein gentleMACS-Tube überführt. Anschließend erfolgte die weitere Aufbereitung nach dem Protokoll für die Dissoziation humaner Tumorgewebeproben mittels gentleMACS Dissociater von Miltenyi Biotec. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde zum Schluss über einen 70µm Zellfilter gegeben und anschließend zur durchflusszytometrischen Analyse vorbereitet.

2.2.3 Zellkulturarbeit

2.2.3.1 Kultur von B16 Melanozyten

Zur Kultur der B16 Melanozyten wurden ca. 1×10^6 Zellen nach dem Auftauen in 20 ml B16 Medium in einer 75cm² Kulturflasche im Brutschrank inkubiert. Das Wachstum wurde alle zwei Tage kontrolliert und ein Abernten der Zellen

konnte nach 3 Tagen erfolgen. Hierzu wurde zunächst das Medium vorsichtig abpipettiert und anschließend der Zellrasen mit 4ml 0,5fach verdünntem Trypsin gespült. Dieses wurde erneut vorsichtig abgezogen und es erfolgte eine erneute Zugabe von 4ml 0,5fach verdünntem Trypsin in die Zellkulturflasche. Anschließend wurde diese für 5-10min bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle über die Ablösung der Zellen erfolgte mikroskopisch. Durch die Zugabe von 4ml B16 Medium wurde die Flasche gespült und mit dem darin enthaltenen FBS das Trypsin inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen insgesamt in 40ml B16 Medium aufgenommen, in ein 50ml Falcon überführt und bei 1000U/min für 5min zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung wurden die Zellen mit B16 Medium resuspendiert und gezählt. Im Anschluss erfolgte der erneute Ansatz einer Kultur mit ca. 1×10^6 Zellen. Überschüssige B16 Melanozyten wurden eingefroren (vgl. 2.2.3.6).

2.2.3.1.1 Aufbereitung der B16 Melanozyten zur Injektion

Um die B16 Melanozyten für die Injektion vorzubereiten, wurden sie nach dem oben beschriebenen Vorgang abgeerntet (vgl. 2.2.3.1). Nach der ersten Zentrifugierung in B16 Medium wurden die Zellen dann jedoch zweimal aufeinanderfolgend in 50ml PBS resuspendiert und jeweils bei 1000U/min für 5min zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 10ml PBS und die Zellen wurde über einen 100µm Zellfilter in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Röhrchen zusätzlich auf Eis gelagert. Nach der Zählung wurde die Zellsuspension in eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/100µl durch die Zugabe von PBS gebracht. Hieraus wurden anschließend Einmalspritzen für die subkutane Injektion mit einem Volumen von 100µl aufgezogen, wobei die Bildung von Luftblasen in der Spritze vermieden werden sollte. Anschließend wurden die Spritzen steril und kühl gelagert und möglichst schnell dem Tier injiziert.

2.2.3.2 Kultur und Ausplattierung muriner CD40L-Transfected HeLA Cells

Bei diesem Versuchsmodell handelt es sich um eine etablierte Methode, die zu einer Aktivierung muriner B-Lymphozyten führen kann (Liebig, Fiedler, Klein-Gonzalez, Shimabukuro-Vornhagen, & von Bergwelt-Baildon, 2010). Zur Vorbereitung des anschließenden Versuchs mussten die adhärenenten HeLA-Zellen zunächst ausplattiert werden. Hierfür wurde das alte Medium aus der 75cm² Zellkulturflasche abpipettiert und diese vorsichtig mit 10ml PBS gespült. Anschließend wurden 4ml Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben und diese für 5-10min bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Durch die Zugabe von 20ml HeLA-WT-Medium wurde die enzymatische Ablösungsreaktion gestoppt und die Flasche erneut gespült. Die Zellen wurden dann in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und dieses auf 40ml mit HeLA-WT-Medium aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugierung bei 1200U/min für 5min. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und die Zellen in 10ml HeLA-WT-Medium resuspendiert und anschließend gezählt. Zur Weiterführung der Kultur wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen in ein separates 50ml Röhrchen gegeben, mit HeLA-WT-Medium versetzt und nochmals bei 1200U/min für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 10ml HeLA-Selection-Medium resuspendiert, zurück in die 75cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37°C inkubiert. Die Teilung der Zellen erfolgte nach diesem Schema 2 mal wöchentlich.

Die restlichen Zellen wurden im Zentrifugenröhrchen belassen und durch die Zugabe zusätzlichen HeLA-WT-Mediums in eine Konzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht. Diese wurden anschließend einmalig mit 78G bestrahlt. Die Ausplattierung erfolgte danach auf die benötigte Anzahl von 6-Well-Platten mit 2ml Zellsuspension bzw. $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Well. Die Platten wurden dann bei 37°C inkubiert und die Adhärenz mikroskopisch kontrolliert.

2.2.3.3 CD40-Aktivierung muriner B-Zellen

Die Platten mit den CD40L-Transfected HeLA-Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet (vgl. 2.2.3.2). Aus den Tumoren/Milzen wurden die B-

Lymphozyten gewonnen (vgl. 2.2.2.1 bzw. 2.2.2.2) und in mCD40B-Medium in eine Konzentration von $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht. Zusätzlich wurden diese Tumor-assoziierten oder lymphatischen B-Zellen mit $2 \mu\text{l/ml}$ IL-4 und $2 \mu\text{l/ml}$ β -Mercaptoethanol versetzt.

Die am Vortag vorbereiteten 6-Well-Platten mit den CD40L-Transfected HeLA-Zellen wurden aus dem Inkubator genommen und die Adhärenz der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde das Medium aus den Wells vorsichtig abpipettiert, ohne die Zellen dabei zu berühren oder zu lösen. Danach wurden 3×10^6 Tumor-assoziierte oder lymphatische B-Zellen bzw. 4ml ihrer Zellsuspension auf die CD40L-HeLA-Zellen aufgetragen. Auch hierbei war darauf zu achten, dass sich die adhärenenten HeLA-Zellen nicht lösen. Die 6-Well-Platten wurden dann für 4 Tage bei 37°C inkubiert. An Tag 4 nach Ansatz der Kultur wurden die Tumor-assoziierten/lymphatischen B-Zellen durch Spülen der Wells mit dem darin befindlichen Medium gelöst. Die Zellsuspensionen wurden in 50ml Röhrchen überführt und auf 40ml mit mCD40Bwash-Medium aufgefüllt. Nach einer Zentrifugierung für 5min bei 1200U/min wurde der Überstand aus den Röhrchen abgenommen und die Zellen in 10ml mCD40B-Medium suspendiert. Nach dem Zählen der Zellen erfolgte die Einstellung der Zellsuspensionen auf $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml mit mCD40B-Medium. Im Anschluss wurden die B-Zell-Suspensionen erneut mit IL-4 und β -Mercaptoethanol versetzt. Wie zu Beginn der Kultur wurden die Zellen auf die am Vortag vorbereiteten 6-Well-Platten der CD40L-HeLA-Zellen ausplattiert. Das Umsetzen der B-Zellen wurde erneut an Tag 8 und 12 der Kulturen durchgeführt. An Tag 14 nach Beginn wurden die Kulturen beendet. Proben von 1×10^6 B-Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils an Tag 0, 7 und 14 entnommen und mittels folgender Oberflächenmarker analysiert: CD80, CD86, MHC-I (H2Db), MHC-II (IAb), CD19, CD3.

2.2.3.4 IL-10 Stimulation und intrazellulärer Stain

Durch die erschwerte und ungenügende Gewinnung von B-Zellen aus den B16 Melanomen erfolgte dieser Versuch mit B-Zellen aus den Milzen der

tumortragenden Tiere, sowie mit B-Zellen aus den Milzen gesunder Kontrolltiere. Die B-Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen (vgl. 2.2.2.2). Anschließend wurden die Zellen in HeLA-WT Medium in eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml gebracht und unter Berücksichtigung einer jeweiligen Negativ- und Isotypenkontrolle auf einer 24 Well Platte ausplattiert. In jedes Well wurde 1ml der Zellsuspension gegeben. Leere Wells wurden mit PBS gefüllt. Die Stimulation lief insgesamt über 48 Stunden. Zu Beginn wurden die Zellen mit 10µg/ml LPS versetzt und für 43 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde den Proben zusätzlich 50ng/ml PMA, 0,5µg/ml Ionomycin und 2µM Monensin (Golgistop) zugegeben und diese für die restlichen 5 Stunden inkubiert. Für den nachfolgenden intrazellulären Stain wurden die Zellen aus den Wells in FACS-Röhrchen überführt, mit Cell-Wash versetzt und für 5min bei 1500U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Proben mit 100µl PEB-Puffer sowie mit 1µl FcR-Block resuspendiert und für 10min bei Dunkelheit und 4°C Umgebungstemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit den Oberflächenantikörpern für die durchflusszytometrische Analyse und eine erneute Inkubation von 25min bei 4°C im Dunkeln. Danach wurden die Proben mit 1ml PBS bei 1500U/min für 5min gewaschen. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Röhrchen kurz gevortext und mit 100µl PBS und 100µl des 3,7% Formaldehyd-Puffers versetzt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 30min in Dunkelheit und bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen erst mit 1ml PBS, dann mit 1ml Saponin-Puffer gewaschen. Nach dem der Überstand verworfen wurde, erfolgte eine Resuspension mit 100µl Saponin-Puffer und Inkubation für 20min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem intrazellulären Antikörper gegen IL-10 und eine Inkubation der Proben von 10min bei 4°C im Kühlschrank. Nach einer Zentrifugierung mit 1ml Saponin-Puffer zum Herauswaschen des nicht gebundenen Antikörpers, wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl einer Zellsuspension entnommen und mit 90µl einer 1:10 verdünnten Trypanblaulösung angefärbt. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, abgestorbene oder perforierte Zellen nehmen jedoch den Farbstoff auf und färben sich dunkelblau an. Es wurden die lebenden Zellen in 4 großen Eckquadraten einer Neubauer Zählkammer gezählt und die Zellzahl nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl}/4 \times 10 \times 10^4 \times \text{Volumen der Zellsuspension(ml)} = \text{Zellzahl} \times 10^6$$

2.2.3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellsuspensionen

Zum Einfrieren der Zellen wurde die Zellsuspension zunächst bei 1500U/min für 7min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellen wurden dann in Einfriermedium in eine Konzentration von $3\text{-}6 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht und in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden zunächst bei -80°C für mindestens 24 Stunden eingefroren und anschließend in einen Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden 10-20ml des entsprechenden Mediums in ein 50ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Das Einfrierröhrchen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, für ungefähr 2min im 37°C warmen Wasserbad angetaut und anschließend von außen desinfiziert. Mit dem vorgewärmten Medium wurden die Zellen aus dem Einfrierröhrchen gelöst, dieses gespült und in das Zentrifugenröhrchen überführt. Letzteres wurde danach auf 50ml mit dem entsprechenden Medium aufgefüllt und bei 1500U/min für 7min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und der erneuten Suspension in Medium konnten die Zellen weiter verwendet werden.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, welches die Analyse und quantitative Bestimmung von Zellen, intrazellulären Peptiden und Proteinen erlaubt. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Bei der Messung wird eine einzelne Zelle durch eine Kapillare gesaugt und durch den Messbereich eines Lasers geführt. Detektiert wird dann zum einen die Lichtstreuung der Zelle und zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der antikörpergekoppelten Fluorophore. Anschließend erfolgt die Darstellung aller Einzelsignale in Diagrammen aus welchen statistische Ergebnisse über die Zellpopulationen generiert werden können.

Die hier beschriebenen Untersuchungen erfolgten mit dem Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter). Dieses Gerät verfügt über 3 Laser und ermöglicht die Analyse von Zellsuspension mit bis zu 10 Färbungen gleichzeitig. Die anschließende Analyse der Daten erfolgte mit der zugehörigen Kaluza Software (Version 1.1, Beckman Coulter).

2.2.4.1 Antikörperfärbung zur Messung im Gallios™ Flow Cytometer

Je nach durchzuführender Färbung wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen in FACS-Tubes vorgelegt, mit Cell-Wash suspendiert und bei 1500U/min für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und die Antikörper zu den Zellen gegeben. Zur optimalen Vermischung wurden die Tubes kurz gevortext und dann bei 4°C im dunklen Kühlschrank für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen in Cell-Wash suspendiert und erneut zentrifugiert, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde danach wieder verworfen und die Zellen in 200µl Cell-Fix resuspendiert. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypische Charakterisierung Tumor-assoziiierter B-Zellen des B16 Melanom der Maus

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden die B16 Melanozyten wie beschrieben den Mäusen injiziert (vgl. 2.2.3.1.1) und die B-Zellen aus den Melanomen gewonnen (vgl. 2.2.2.1). Zum Vergleich der B-Zellpopulationen wurden zudem die B-Zellen aus den Milzen von den B16 Melanom tragenden Tier untersucht (vgl. 2.2.2.2). Außerdem erfolgte auch die durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten gesunder Tiere, aus denen jedoch nicht zuvor die B-Zellen separiert wurden. Daher kann ein direkter Vergleich nur zwischen den extrahierten B-Zellen aus den B16 Melanomen und den B-Zellen aus den Milzen der erkrankten Tiere erfolgen. Diese Ergebnisse lassen wiederum einen indirekten Vergleich mit den Ergebnissen aus den gesunden Kontrollmilzen zu und zeigen, ob deutliche Unterschiede vorliegen.

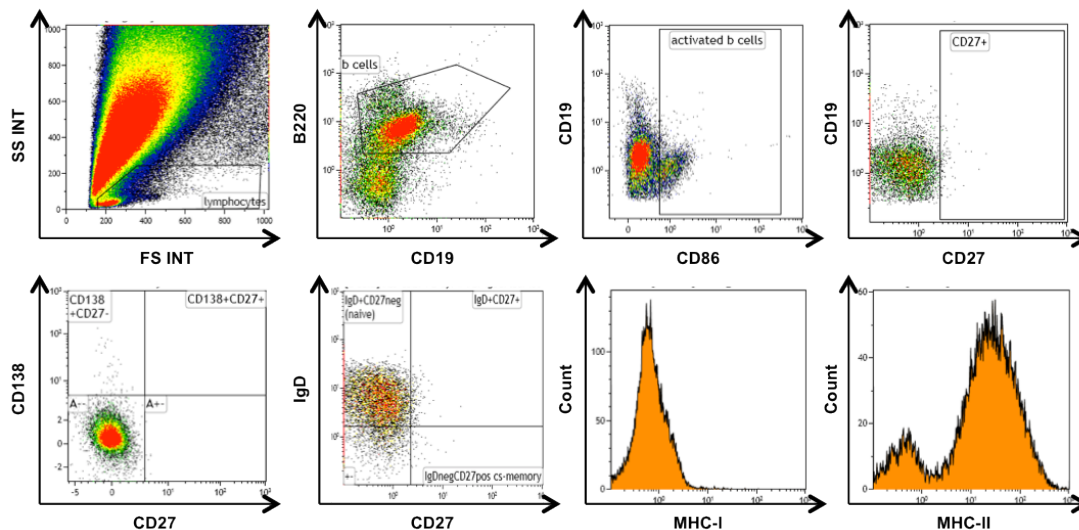


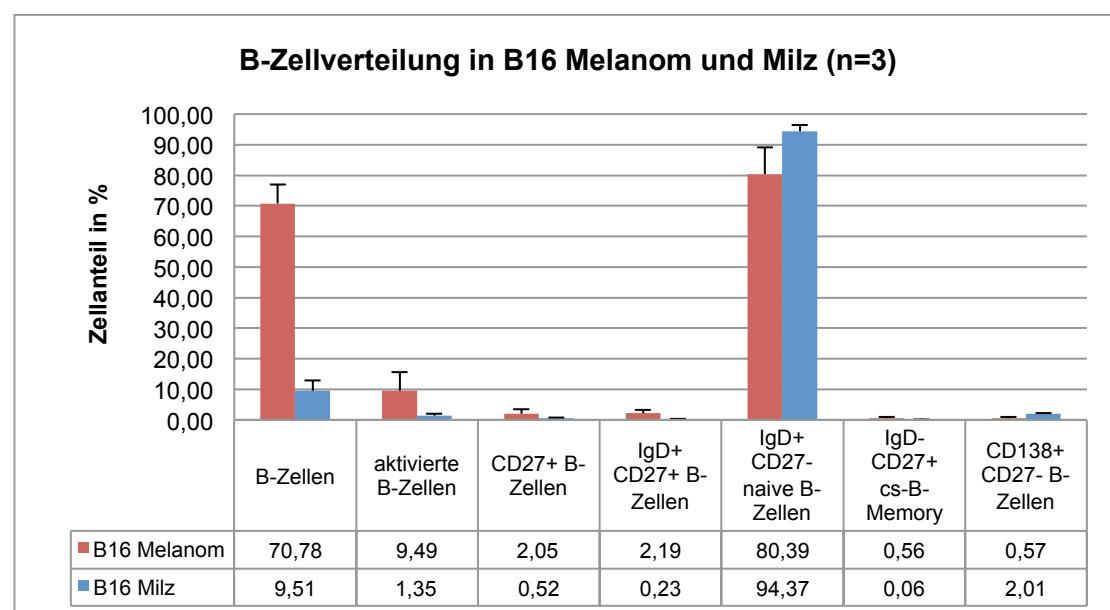
Abb. 1: Vorbild für die FACS-Analyse und Gating-Strategie am Beispiel eines aufgereinigten B16 Melanoms.

Abbildung 1 zeigt beispielhaft die FACS-Analyse/Dot Plots und Gating-Strategie an einem B16 Melanom. Zunächst wurde über den Forward- und Sidewards-Scatter auf die Lymphocyten-Population gateget. Der Forward

Scatter (FS/Vorwärtsstreulicht) ist ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel und hängt von dem Volumen der Zelle ab. Der Sidewards Scatter (SS/Seitwärtsstreulicht) ist ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel und ist abhängig von der Granularität der Zelle, der Struktur ihres Zellkerns und der Menge ihrer Vesikel. Anhand dieser beiden Parameter lassen sich auch ungefärbte Zellen gut unterscheiden und ermöglichen eine erste Einteilung. So streuen Granulozyten, die eine recht raue Oberfläche haben und viele Vesikel beinhalten deutlich mehr Licht, als zum Beispiel glattere B-Lymphozyten. Wie im ersten Dot Plot (vgl. Abb. 1) am Beispiel des B16 Melanoms zu erkennen ist, befinden sich trotz B-Zell-selektiver Aufreinigung noch viele grob-granuläre Zellreste in der Probe.

Im Weiteren wurde aus dem Lymphozyten-Gate auf die B-Zell-Population gegatet, welche als $CD19^+ B220^+$ definiert wurden. B220 bei der Maus ist hierbei gleichzusetzen mit CD45 der humanen Zellen und dient somit als Pan-Leukozytenmarker. Aus der hieraus definierten B-Zell-Population wurde dann wiederum über verschiedene Oberflächemarkern auf B-Zell-Subpopulationen gegatet und deren prozentualer Anteil bestimmt. Über die Mean Fluorescence Intensity (MFI) wurde die Expression von MHC-I und MHC-II auf den B-Zellen ermittelt. Die MFI ist ein Maß für die Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel und lässt so Rückschlüsse über die Expression eines Oberflächenmoleküls auf der Zelle zu.

A



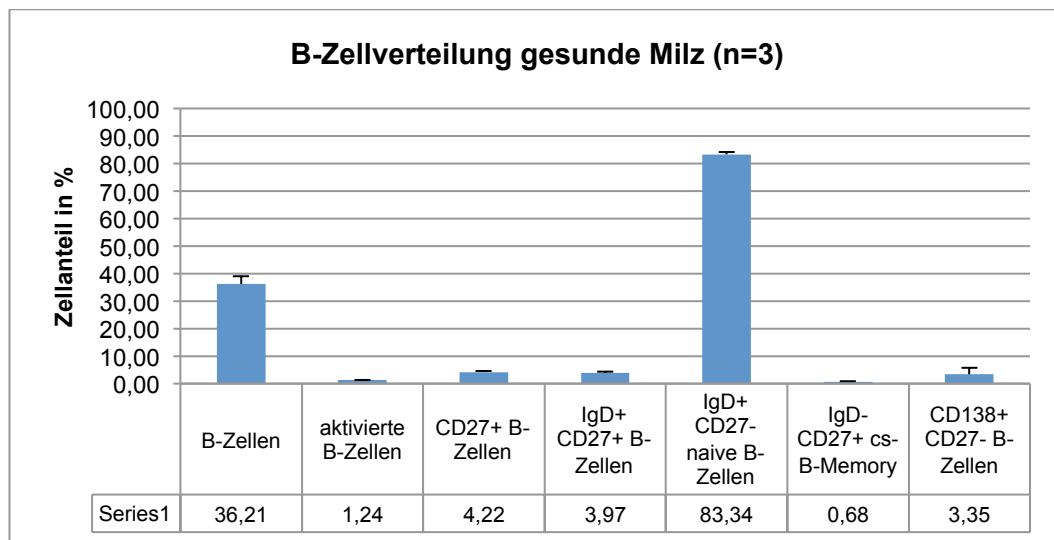
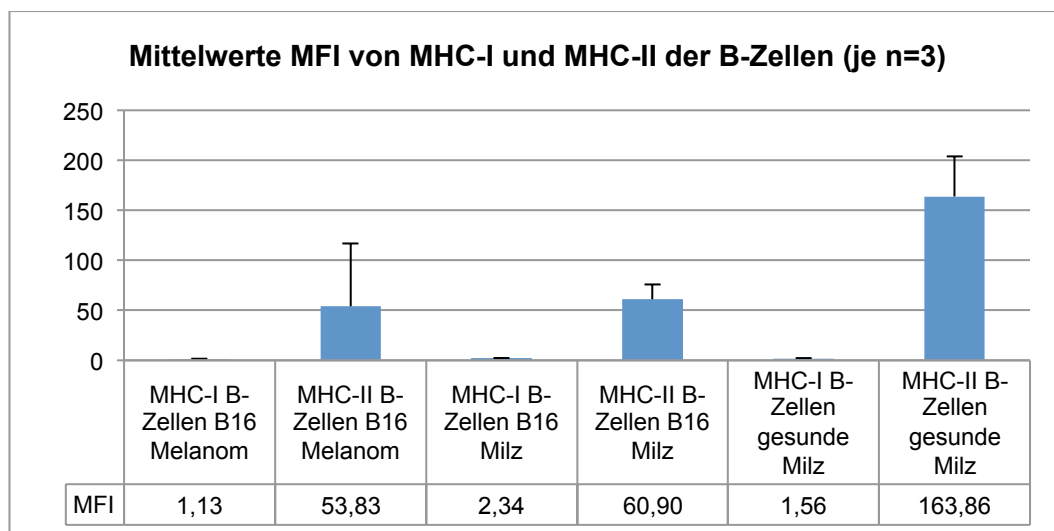
B**C**

Abb. 2: Diagramme A-C zeigen die Anteile der B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen aus jeweils 3 Proben von B16 Melanom, den Milzen der B16 Melanom tragenden Tiere und gesunden Kontrollmilzen

Betrachtet man im direkten Vergleich die prozentuale Verteilung der B-Zellen in Diagramm A der Abb. 2, so finden sich deutlich mehr CD19⁺ B220⁺ positive B-Zellen in den B16 Melanom Tumorproben als in den Milzen der erkrankten Tiere (70,78% vs. 9,51%). Auch die aktivierten B-Zellen, welche als CD86⁺CD19⁺ Zellen aus den B-Zellen ermittelt wurden, machen einen prozentual höheren Anteil in den Tumorproben aus, als in den Milzen der B16 Melanom tragenden Tiere (9,49% vs. 1,35). Eine Population von CD27⁺ B-

Zellen, welche als aktiviert und antigenerfahren gelten, finden sich in beiden Proben, wobei auch hier ihr Anteil in den Tumorproben höher ist (2,05% vs. 0,52%). Eine fast ähnliche Verteilung zeigt sich für gleichzeitig reife B-Zellen, welche als CD27⁺ und IgD⁺ positiv eingeteilt wurden. Hier finden sich im B16 Melanom mehr als in den Milzen der erkrankten Tiere (2,19% vs. 0,23%). Die reifen naiven B-Zellen (IgD⁺ CD27⁻) zeigen jedoch einen höheren Anteil in den Milzen der erkrankten Tiere als in den B16 Melanom Tumorproben (94,37% vs. 80,39%) und machen bei beiden den größten Anteil der B-Zell-Population aus. Der Anteil der B-Memory-Zellen (IgD⁻ CD27⁺) ist in beiden Proben sehr gering, wobei er in den Tumorproben noch leicht höher liegt (0,56% vs. 0,06%). Für die Plasmazellen, welche als CD138⁺ und CD27⁻ definiert wurden, zeigten sich auch hier bei beiden Zellreihen niedrige Anteile, wobei der Anteil in den Milzen der erkrankten Tiere höher lag, als bei den Tumoren (2,01% vs. 0,57%).

Im Diagramm B der Abb. 2 ist die B-Zellverteilung in der gesunden Milz dargestellt. In den drei analysierten Kontrollen machten die B-Zellen im Mittel einen Anteil von 36,21% aus. Die weitere Untersuchung der B-Zell-Subpopulationen ergab einen Anteil von 1,24% der CD86⁺ aktivierten B-Zellen. Die CD27⁺ antigenerfahrenen B-Zellen machten 4,22% und die reifen antigenerfahrenen Zellen (CD27⁺ IgD⁺) 3,97%. Die naiven B-Zellen (IgD⁺ CD27⁻) machten den Großteil der B-Zell-Subpopulation mit 83,34% aus. Die B-Memory-Zellen (IgD⁻ CD27⁺) und Plasmazellen (CD138⁺ CD27⁻) machten mit 0,68% und 3,35% wiederum einen geringeren Anteil aus.

Betrachtet man die MHC-I und MHC-II Expression der drei Untersuchten Probentypen in Diagramm C der Abb. 2, so ist zu erkennen, dass sich die Expression von MHC-I auf den B16 TABs, den B-Zellen aus den Milzen der erkrankten Tiere und den gesunden Kontrollmilzen nur geringfügig unterscheidet (MFI 1,13 vs. 2,34 vs. 1,56). Auch die MHC-II Expression der B16 TABs und der B-Zellen aus den Milzen der erkrankten Tiere zeigen ähnliche Werte (MFI 53,83 vs. 60,90). Jedoch weisen die B16 TABs hier eine

höhere Standardabweichung auf. Die MFI von MHC-II auf den B-Zellen der Kontrollmilzen liegt im Mittel bei 163,86.

3.2 Charakterisierung Tumor-assoziiertes B-Zellen bei Patienten mit Kolorektalen-Karzinom (CRC)

3.2.1 Patientencharakteristik

Im Rahmen der Untersuchung wurden B-Zell-Populationen aus Tumoren (n=38) und dem peripheren Blut (n=46) von insgesamt 51 Patienten charakterisiert, welche an einem diagnostizierten Kolorektalen-Karzinom (CRC) litten. Die Patienten waren im Durchschnitt 70 (± 11) Jahre alt und zu 61% männlichen und 39% weiblichen Geschlechts. Nach Einteilung in UICC Stadien befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung 4% der Erkrankten in Stadium I, 34% in Stadium II, 27% in Stadium III und 35% in Stadium IV. Zum Vergleich der Tumor-assoziierten B-Zellpopulation dienten PBMCs von 10 gesunden Spendern, welche durchschnittlich 65 (± 11) Jahre alt und zu 40% männlichen und 60% weiblichen Geschlechts waren.

3.2.2 Vergleich der B-Zell-Population und Subpopulationen in CRC-Tumorgewebe, PBMC von CRC-Patienten und gesunden Spendern

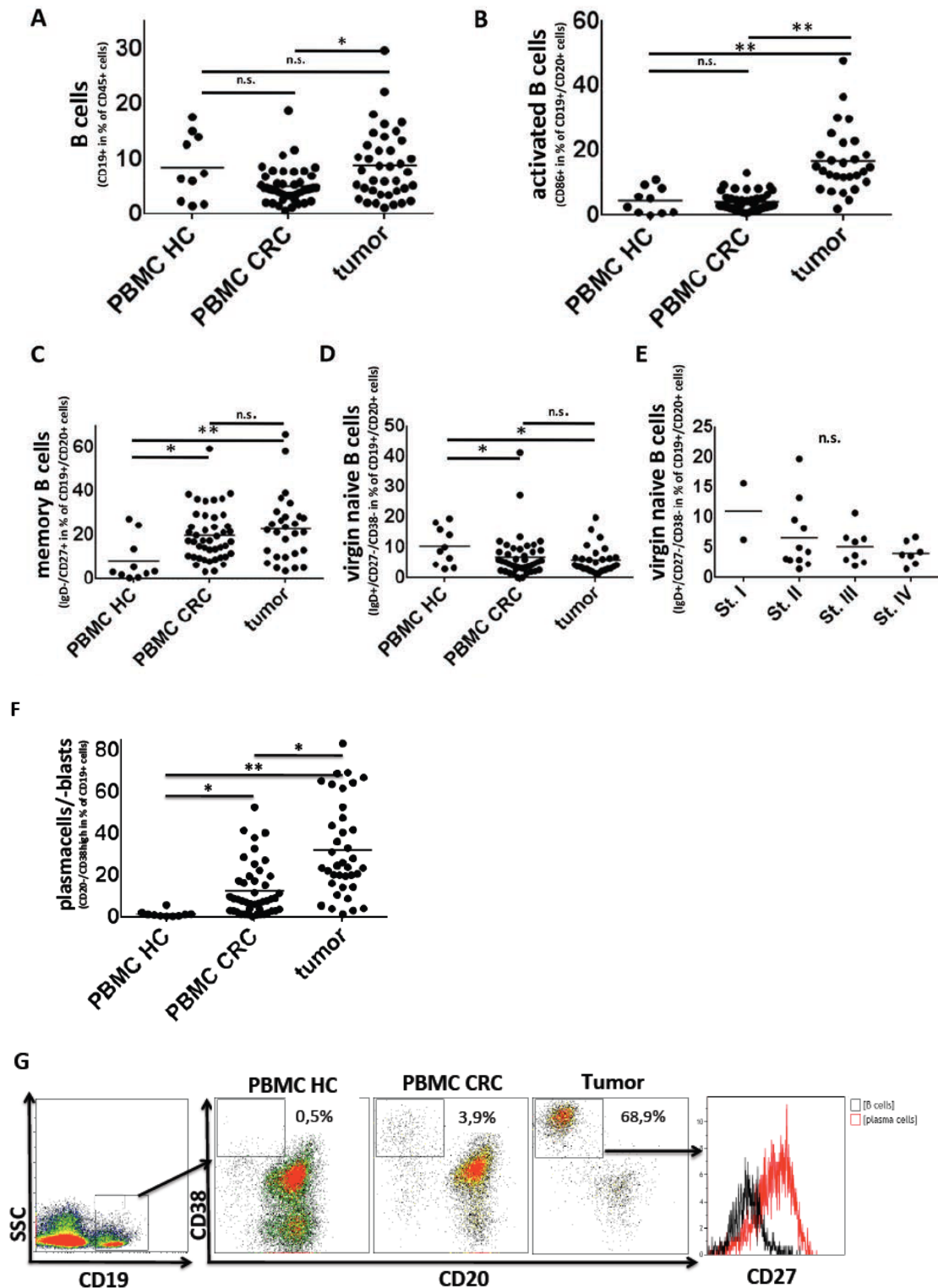


Abb. 3: B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen in PBMC und Tumor-Proben von Patienten mit CRC und in PBMC von gesunden Spendern (A-F)

Nach Gewinnung der PBMCs und Herstellung einer Zellsuspension aus dem Tumorgewebe (vgl. 2.2.2.3) wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Im Anschluss erfolgte die weitere Analyse durch Kaluza und der Anteil der einzelnen Populationen konnte mittels Gating-Strategie ermittelt und untereinander verglichen werden. Hierzu wurde zunächst auf alle Lymphozyten bzw. alle $CD45^+$ Zellen gated. $CD45$ gilt als Pan-Leukozytenmarker und kommt auf den hämatopoetischen Zellen vor. Somit eignet er sich gut, um von ihm auf die mit $CD19^+$ definierten B-Zellen zu gaten.

Wie in Figur A der Abb. 3 zu sehen ist, zeigte sich hierbei ein signifikant höherer prozentualer Anteil von $CD19^+$ B-Zellen in den Tumorgewebeproben ($n=38$) im Vergleich zu den PBMCs der erkrankten Personen ($n=46$) (8,9% vs. 5,1% aus $CD45^+$ Lymphozyten, $p<0,05$). Bezüglich des Anteils der B-Zellen in den gesunden Kontrollen besteht jedoch keine Signifikanz ($n=10$).

Zur weiteren Analyse der spezifischen B-Zell-Subpopulationen wurden die doppelt positiven $CD19^+ CD20^+$ B-Zellen untersucht.

Figur B in Abb. 3 zeigt den prozentualen Anteil und die Verteilung der aktivierten B-Zellen, welche als $CD19^+$, $CD20^+$ und $CD86^+$ definiert wurden. Dabei enthielten die Tumor-assoziierten B-Zellen ($n=22$) einen höheren prozentualen Anteil an ihnen, als die PBMCs der CRC-Patienten und gesunden Kontrollen (16,8% vs. 4,1/4,5% $p<0,005$). Auch der Anteil der Memory-B-Zellen war in den PBMCs ($n=44$) und im Tumorgewebe ($n=28$) der CRC-Patienten erhöht im Vergleich zu ihrem Anteil in den PBMCs der gesunden Kontrollen ($n=10$) (19,3/22,7% vs. 8,2% ; $p<0,05/<0,005$). Die Memory-B-Zellen wurden hierbei als $CD27^+IgD^-$ Zellen aus den doppelt positiven $CD19^+ CD20^+$ B-Zellen bestimmt. In Abhängigkeit zu einem Anstieg der Memory-B-Zellen waren die unreifen naiven B-Zellen ($IgD^+ CD27^- CD38^-$ aus doppelt positiven $CD19^+ CD20^+$ B-Zellen) in den PBMCs ($n=44$) und in den Tumorproben ($n=28$) der CRC-Patienten (Figur D) erniedrigt, verglichen mit den PBMCs ($n=10$) der gesunden Spender ($p<0,05$).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Anteil der unreifen naiven B-Zellen und dem UICC-Stadium ($n=28$) wurde in Figur E der Abb. 3 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es mit zunehmendem Stadium zu einem Verlust der

IgD⁺ CD27⁻ CD38⁻ naiven B-Zellen kommt. Dieser Verlauf ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Wie in Figur F der Abb. 3 zu sehen ist, zeigte sich auch für die Plasmazellen (CD20⁻CD38^{high} aus CD19⁺ B-Zellen) in den PBMCs (n=46) sowie im Tumorgewebe (n=38) der CRC-Patienten eine deutliche Erhöhung im Gegensatz zu den PBMCs der gesunden Kontrollen (n=10) (12,6%/31,7% vs. 1,4%; p<0,05/<0,005). Figur G der Abb. 3 zeigt hierzu exemplarisch das Gating auf die CD45⁺CD19⁺CD20⁻CD38^{high} Plasmazellen aus dem peripheren Blut und Tumorgewebe von CRC-Patienten und den PBMC von gesunden Spendern. Die Plasmazellen wurden phänotypisch mittels ihrer CD27 Expression charakterisiert.

3.3 Vergleich der Tumor-assoziierten B-Zellen in CRC des Menschen und B16 Melanom der Maus

Bei beiden Malignomen ist eine Anreicherung von B-Zellen in den Tumorproben zu verzeichnen. Auch die aktivierten B-Zellen (CD86⁺) sind beim B16 Melanom im Vergleich zu B-Zellen aus der Milz der erkrankten Tiere und gesunder Kontrollmilz erhöht. Gleiches zeigte sich für die Tumorproben des CRC bei denen sogar ein signifikanter Unterschied für den Anteil der aktivierten B-Zellen zu den PBMCs aus dem Blut der CRC-Patienten und gesunden Kontrollen besteht. Bezüglich der Memory-B-Zellen (IgD⁻ CD27⁺) zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Malignomen. Im B16 Melanom machen sie einen kaum zu definierenden Anteil der B16 TABs aus (0,56%), sind jedoch auch nur zu geringen Anteilen in B-Zellen der Milz der erkrankten Tiere (0,06%) und in der gesunden Milz zu finden. Hingegen zeigen sich erhöhte Werte in den PBMCs und Tumorproben der CRC-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Diesem Anstieg der Memory-B-Zellen folgend sind die naiven B-Zellen (IgD⁺ CD27⁻) in den PBMCs und Tumorproben der CRC Patienten im Vergleich zu den PBMCs der gesunden Kontrollen erniedrigt. Beim B16 Melanom der Maus zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede. Hier machen die naiven B-Zellen den Hauptanteil der TABs aus. Gleiches gilt für die B-Zellen aus den Milzen der

erkrankten Tiere und gesunden Milzen. Auch in Bezug auf die Population von Plasmazellen (CD38^{high} bzw. CD138⁺) zeigen sich verschiedene Bilder in den Malignomen. In den Tumorproben und PBMCs der CRC-Patienten sind die Plasmazellen signifikant im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht. Im B16 Melanom der Maus machen sie einen kaum nachweisbaren Wert der TABs aus (0,57%). Zudem ist ihre Anteil an den B-Zellen in der erkrankten und gesunden Milz eindeutig höher als im B16 Melanom (2,01%/3,35% vs. 0,56%).

3.4 CD40-Aktivierung muriner B-Zellen aus dem B16 Melanom

3.4.1 Wachstumsverlauf der B-Zellen unter CD40-Liganden

Es ist erwiesen, dass humane aber auch murine B-Zellen durch CD40-Liganden stimuliert, aktiviert und somit ihre Antigen-präsentierende Funktion verbessert werden kann (Liebig et al., 2010; Schultze et al., 1997). Um eine mögliche Antigen-präsentierende Funktion von TABs nachzuweisen, wurde dieser Versuch mit aufgereinigten B-Zellen aus dem murinen B16 Melanom und B-Zellen aus der Milz gesunder Kontrolltiere durchgeführt. Die B-Zellen wurden wie beschrieben gewonnen (vgl. 2.2.2.1 bzw. 2.2.2.2) und über 14 Tage in Kultur mit CD40-Liganden tragenden HeLA-Zellen genommen (vgl. 2.2.3.3).

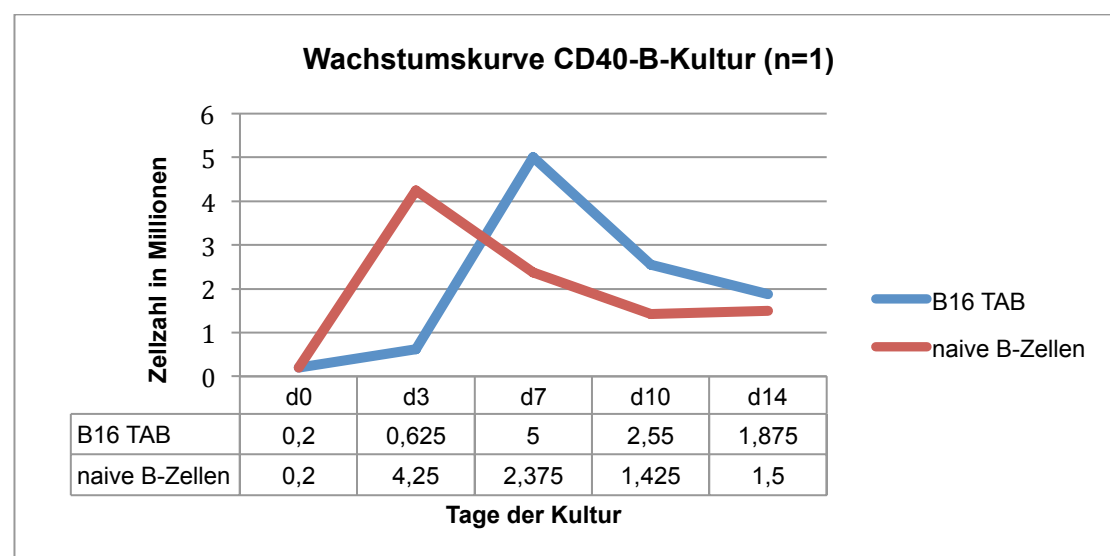


Abb. 4: Wachstumskurve einer CD40B-Kultur mit aufgereinigten B-Zellen aus B16 Melanom und B-Zellen aus der Milz einer gesunden Maus

Abbildung 4 zeigt die Wachstumskurven der beiden Zelllinien während der 14 Tage der Kultur. Bei beiden Zellreihen ist eine zeitversetzte Zu- und Abnahme der Zellzahl zu erkennen. Hierbei erreichen die B16 TABs mit einem langsamen Zellzahlanstieg erst an Tag 7 der Kultur ihren Höchststand mit insgesamt 5 Millionen Zellen. Die naiven B-Zellen erreichen mit 4,25 Millionen Zellen diesen schon an Tag 3. Nach dem Zellzahlhöchststand kommt es bei beiden Zellreihen zu einer Halbierung der Zellzahl in den folgenden Tagen der Kultur. Beide Reihen beenden den Versuch an Tag 14 mit über 1 Million Zellen, wobei die B16 TABs noch etwas über den naiven B-Zellen liegen (1,875 vs. 1,5 Millionen Zellen).

3.4.2 Mikroskopische Kontrolle der Clusterbildung

Neben der Bestimmung der Zellzahl wurde der Verlauf der Zellkultur auch mikroskopisch beobachtet. Als Zeichen der Stimulation und Aktivierung ist hierbei die Bildung von Clustern zu beobachten, welche sich aufgrund der homotopen Aggregation ausbilden.

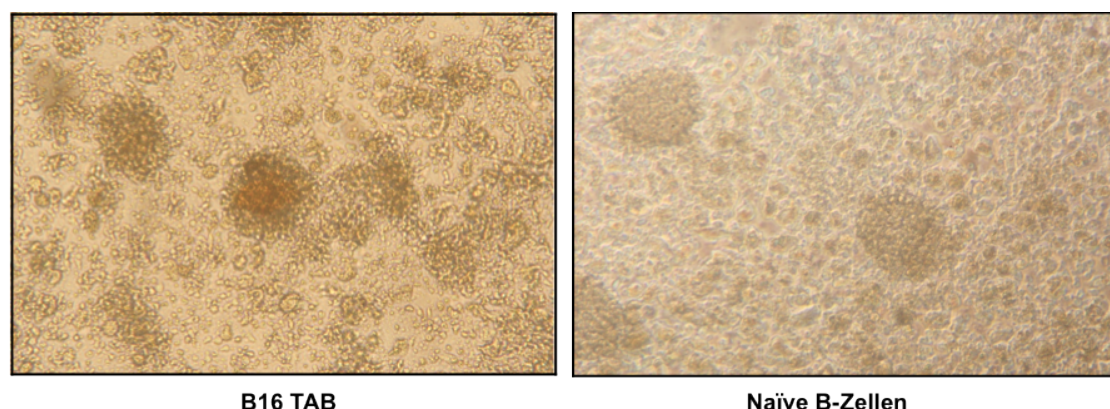


Abb. 5: Bilder der B16 TAB und B-Zellen aus gesunder Milz in CD40B-Kultur an d7

Abbildung 5 zeigt die Cluster-Bildung der B16 TABs und naiven B-Zellen an Tag 7 des Versuchs. Es sind bei beiden Zellreihen deutlich Cluster zu erkennen, welche auch ungefähr die gleiche Größe aufweisen. Bei den B16 TABs sind zudem noch kleinere und undefiniertere Cluster zu erkennen, wobei das Bild bei den naiven B-Zellen recht homogen wirkt.

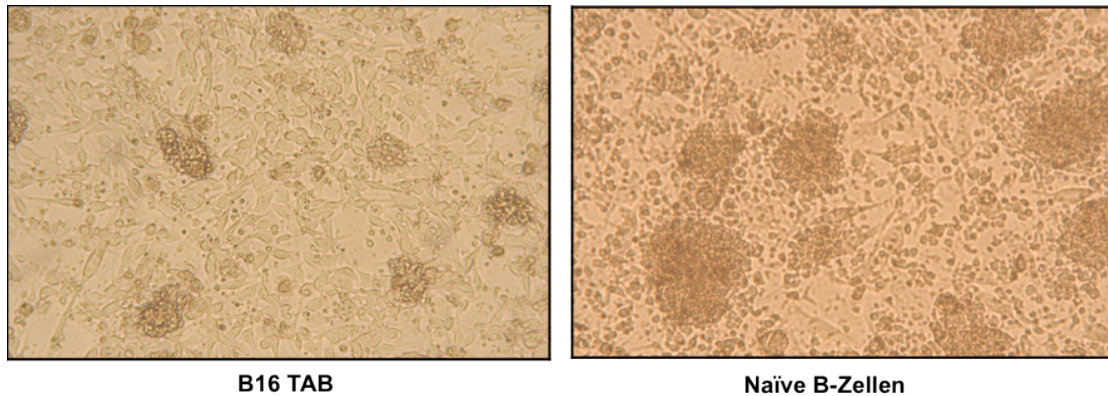


Abb. 6: Bilder der B16 TAB und B-Zellen aus gesunder Milz in CD40B-Kultur an d14

In Abb. 6 ist die Cluster-Bildung der beiden Zellreihen an Tag 14 gezeigt. Hierbei sind deutliche Unterschiede zu erkennen bezüglich Größe und Dichte der Cluster. Bei den B16 TABs sind nur vereinzelte, weniger dichte und kleinere Cluster zu erkennen. Am Boden der Well-Platte sind die adhärenenten HeLA-Zellen sichtbar. Bei den naiven B-Zellen hingegen zeigen sich ähnlich dichte und große Cluster wie an Tag 7 der Kultur.

3.4.3 Durchflusszytometrische Analyse CD40-Aktivierung

Um zu ermitteln, inwieweit die beiden verschiedenen B-Zellreihen stimuliert bzw. aktiviert wurden, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse von Proben an den Tagen 0, 7 und 14 der Kultur. Hierbei wurde die Expression für CD80, CD86, MHC-I und MHC-II mittels der MFI bestimmt. CD80 und CD86 gelten als costimulatorische Moleküle für die Aktivierung von T-Zellen. Auf naiven B-Zellen wird CD86 in geringen Mengen expremiert, CD80 hingegen überhaupt nicht oder nur sehr wenig. MHC-II wird von B-Zellen expremiert, welche als Antigen-präsentierende-Zellen fungieren und dadurch eine von ihnen induzierte Aktivierung von T-Zellen bewirken.

Um nur die MFI der B16 TABs und naiven B-Zellen zu ermitteln wurde zuvor auf die CD19⁺ B-Zellen gategatet. Um einen besseren Vergleich durchzuführen wurde die MFI für die einzelnen Marker im Overlay dargestellt.

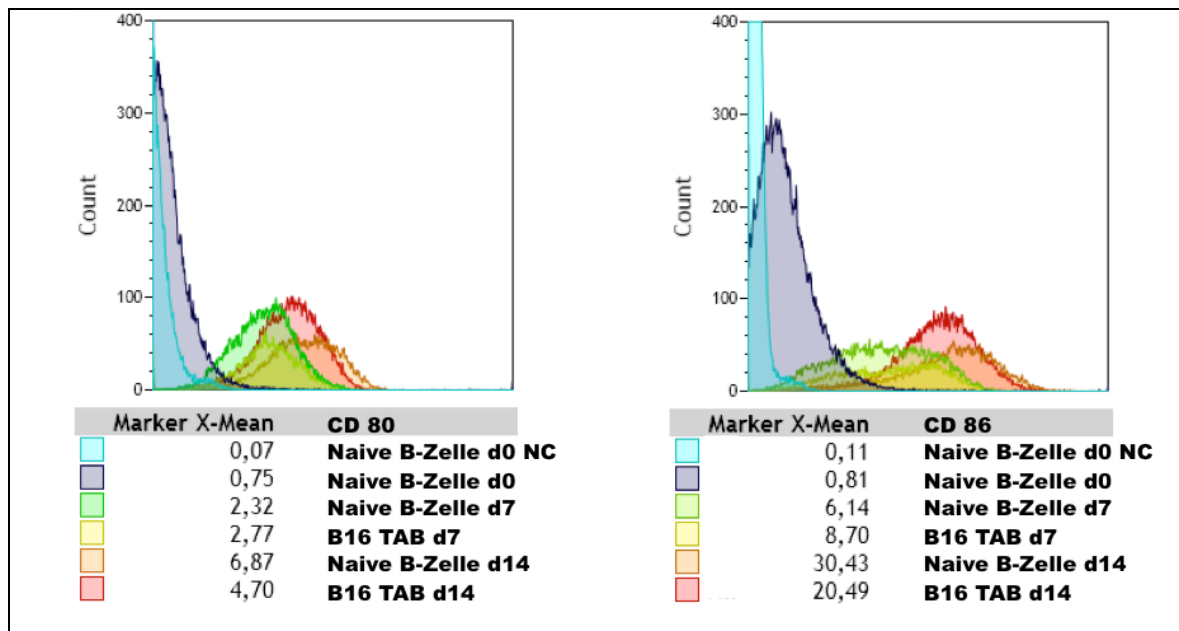


Abb. 7: MFI der CD80 und CD86 Expression der B16 TAB und naiven B-Zellen an d7 und 14 der CD40-Aktivierung

In Abb. 7 sind die Overlays der MFI für die Expression von CD80 und CD86 dargestellt. Zum Beginn der Kultur wurde zudem eine Negativkontrolle (NC), sowie eine Färbung der naiven B-Zellen für die Marker vorgenommen. Leider konnte für die B16 TABs keine Färbung für Tag 0 vorgenommen werden, da keine Zellen nach Ansatz der Kultur mehr übrig waren. Für den Marker CD80 ist eine deutlich Zunahme der Expression über den Verlauf der 14 Tage bei beiden Zellreihen zu erkennen (vgl. Abb. 7). An Tag 7 sind die Werte für die B16 TABs und naiven B-Zellen beinahe gleich (2,77 vs. 2,32). Nach 14 Tagen zeigen jedoch die naiven B-Zellen eine deutlich höhere Expression an CD80 als die B16 TABs (6,87 vs. 4,70).

Auch für CD86 ist eine Zunahme der Expression auf beiden Zelllinien durch die CD40-Aktivierung zu beobachten. An Tag 7 der Kultur zeigen die B16 TABs hierbei eine höherer Expression als die naiven B-Zellen (8,70 vs. 6,14). Zum Ende der Kultur zeigen jedoch wiederum die naiven B-Zellen eine deutlich höhere Expression als die B16 TABs (30,43 vs. 20,49).

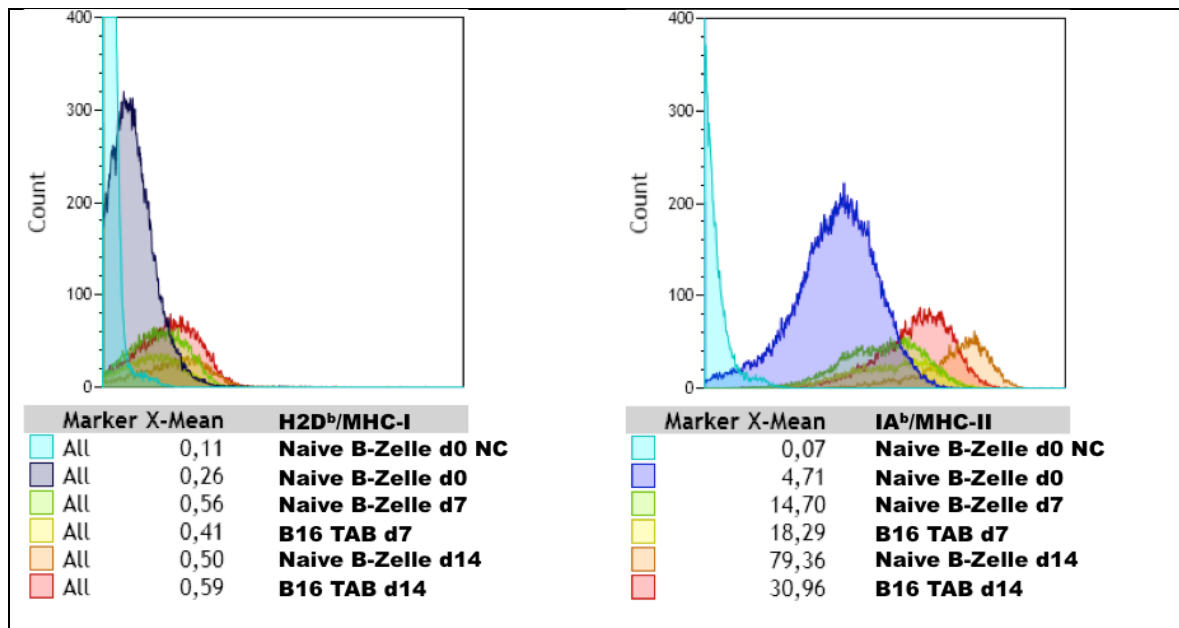


Abb. 8: MFI der MHC-I und MHC-II Expression der B16 TAB und naiven B-Zellen an d7 und 14 der CD40B-Aktivierung.

Abbildung 8 zeigt die Overlays der MFI für die Expression von MHC-I und MHC-II. Auch hier wurde zu Beginn der Kultur jeweils eine NC entnommen und eine Färbung der naiven B-Zellen für den jeweiligen Oberflächenmarker zum Vergleich vorgenommen. Bezüglich der Expression von MHC-I ist im Verlauf der 14 Tage bei beiden Zellreihen eine leichte Zunahme zu beobachten, wobei zum Ende die Werte für die B16 TABs etwas höher liegen, als für die naiven B-Zellen (0,59 vs. 0,50). Für die MHC-II Expression ist bei den B16 TABs und den naiven B-Zellen im 14-tägigen Verlauf eine deutliche Zunahme zu erkennen. An Tag 7 der Aktivierung liegen hierbei die B16 TABs etwas höher als die naiven B-Zellen (18,29 vs. 14,70). Jedoch zeigen die naiven B-Zellen zum Ende der Kultur eine deutlich höhere Expression von MHC-II als die B16 TABs (79,36 vs. 30,96).

3.5 IL-10 Stimulation der B-Zellen aus der Milz B16 Melanom-Tragender Tiere und aus den Milzen gesunder Tiere

Da eine ausreichende Gewinnung von B-Zellen aus dem B16 Melanom nicht gelang, erfolgte die IL-10 Stimulation mit selektierten B-Zellen aus der Milz der tumortragenden Tiere und B-Zellen aus den Milzen gesunder

Kontrolltiere. Die Stimulation erfolgte wie beschrieben (vgl. 2.2.3.4) zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Proben. Hierbei wurde zunächst auf die CD19⁺ B220⁺ B-Zell-Population gegatet. Aus ihr wurde wiederum auf die als B10-Zellen bezeichnete Population von CD1d^{hi} CD5⁺ Zellen gegatet. Deren IL-10 Produktion wurde ermittelt und mit einer Isotypenkontrolle für IL-10 verglichen. Die Isotypenkontrolle wird im allgemeinen durchgeführt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern und somit falsch positive Ergebnisse nachzuweisen. Dabei ist die Isotypenkontrolle ein Antikörper des gleichen Subtyps jedoch gegen ein Antigen gerichtet, das bei Säugern für gewöhnlich nicht vorkommt.

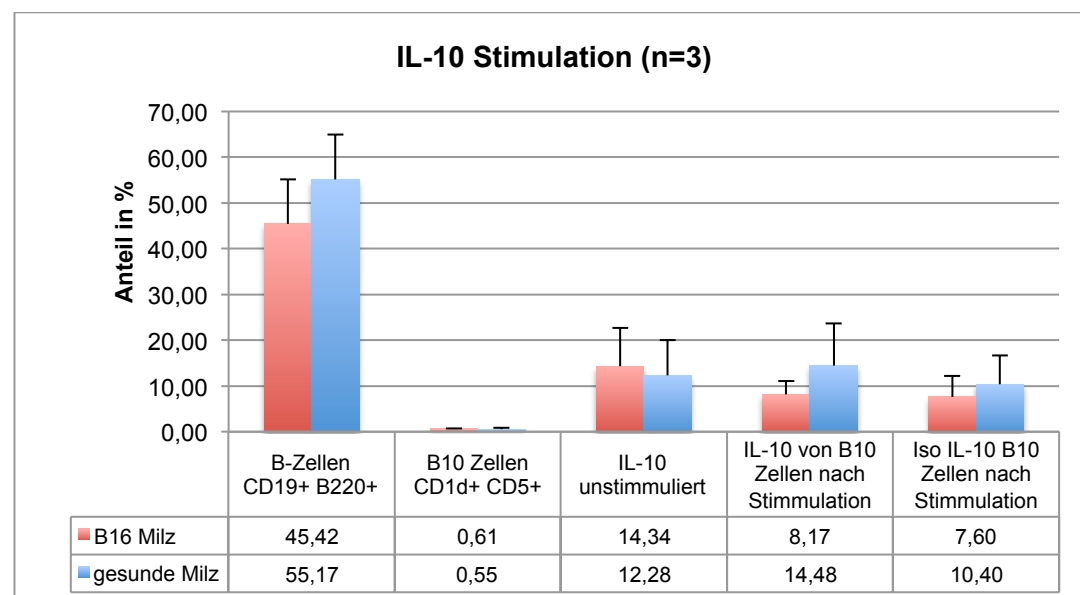


Abb. 9: Ergebnisse der IL-10 Stimulation von B-Zellen aus Milzen von B16 Melanom tragenden Mäusen und B-Zellen aus Milzen gesunder Mäuse

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der IL-10 Stimulation von selektierten B-Zellen aus den Milzen von Tieren, die an einem B16 Melanom litten und gesunden Kontrolltieren. Wie zu erkennen, ist der prozentuale Anteil der B-Zellen in den gesunden Milzen höher als in den Milzen der erkrankten Tiere (55,17% vs. 45,42%). Die Population von B10-Zellen (CD1d^{hi} CD5⁺) macht bei beiden Proben nur einen sehr geringen Anteil aus, liegt jedoch bei den B-Zellen aus den Milzen der erkrankten Tiere minimal höher (0,61% vs. 0,55%). Zur Kontrolle der IL-10 Stimulation wurden die Werte des IL-10 einmal vor

Stimulation und dann speziell für die B10-Zellen nach Stimulation mit dem normalen Antikörper und einer Isotypenkontrolle bestimmt. Bei beiden Proben sind die Werte für IL-10 der B-Zellen ohne Stimulation angezeigt. Betrachtet man die B10 Population der erkrankten Tiere, so liegt der Wert für IL-10 nach Stimulation unter dem unstimulierten IL-10 Wert (8,17% vs. 14,34%) und nur leicht über der Isotypenkontrolle nach Stimulation (8,17% vs. 7,60%). Somit ist davon auszugehen, dass keine Stimulation erfolgt ist.

Für die B-Zellen der gesunden Milz ist jedoch eine geringfügige Stimulation zu verzeichnen. Zum einen liegt der Wert für IL-10 der B10 Zellen nach Stimulation etwas höher als der unstimulierte IL-10 Wert (14,48% vs. 12,28%). Zum anderen ist der Wert der Isotypenkontrolle von IL-10 für die B10-Zellen geringer als der Wert für IL-10 nach der Stimulation (10,40% vs. 14,48%).

4 Diskussion

Viele bisher durchgeführte Untersuchungen an Tumor-assoziierten B-Zellen wurden anhand von immunhistochemischen Färbungen durchgeführt (Bindea et al., 2013; Nielsen et al., 2012b; Zirakzadeh et al., 2013). Dabei war zu erkennen, dass B-Zellen viele unterschiedliche humane Tumore infiltrieren und ihre Präsenz mit dem Überleben der Patienten korreliert. Wie B-Zellen jedoch der Entstehung von Malignomen entgegen wirken könnten, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte zum einen eine antikörpervermittelte Protektion (Julien et al., 2009) aber auch ein über Antigenpräsentation induzierter Schutz vor Malignomen nachgewiesen werden (Candolfi, Curtin, Yagiz, & Assi, 2011). Andererseits konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die alleinige Präsenz von B-Zellen das Tumorwachstum fördert oder die Anti-Tumor Immunität durch sie negativ reguliert werden kann (Inoue et al., 2006; Shah et al., 2005). Somit zeigen sich tumorprotektive, als auch die Tumorprogression unterstützende Eigenschaften der B-Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse ermöglicht auf eine einfache und zugängliche Art und Weise eine genauere Charakterisierung von B-Zellen in Zellsuspensionen. Außerdem ist so der spezifische Vergleich der B-Zell-Populationen zwischen den Proben von erkrankten und gesunden Probanden sowie unterschiedlichen Spezies möglich. Dieser Vergleich fand in der Arbeit am Beispiel des Kolorektalen-Karzinoms des Menschen und dem B16 Melanom der Maus statt. Bei beiden Tumorproben fanden sich vermehrt B-Zellen und aktivierte B-Zellen, als in den zum Vergleich aufgearbeiteten Materialien. Dies war jedoch auch die einzige Übereinstimmung. In den TABs sowie in den PBMCs der CRC Patienten zeigten sich deutlich weiter ausdifferenzierte B-Zellen in Form von Memory-B und Plasmazellen. Hingegen überwogen in den TABs des B16 Melanoms die naiven B-Zellen. Dies kann auf unterschiedliche Ursachen beruhen. Zum einen mussten aus den B16 Melanomproben die B-Zellen vorher gewonnen werden, da der Tumor von Grund auf eine sehr adhärente Konsistenz aufwies und eine durchflusszytometrische Analyse sonst nicht möglich gewesen wäre. Weitere Probleme ergaben sich in der Selektion der B-Zellen wie vorangegangen

beschrieben. Auch nach der B-Zell-Selektion wiesen die Proben mehr Zellreste und Tumorb Bestandteile auf, als Lymphozyten. Dies ist sehr gut im ersten Dot Plot der Abb.1 zu erkennen, bei dem im Sidewards-Scatter der Granularität nach ansteigend, viele Zellen bzw. Tumorroste zu erkennen sind. Die gewonnenen B-Zellen (1,5-2 Millionen Zellen) reichten meist gerade für die durchflusszytometrische Analyse aus. Da dieser Gewinn an Zellen mit einem hohen Arbeitsaufwand und Materialverbrauch verbunden war, wurde die Analyse nur dreimal vorgenommen. Damit ist ein Vergleich mit den Daten aus den insgesamt 51 Proben der CRC-Patienten nur indirekt möglich und in der Aussagekraft als gering einzuordnen. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse, vor allem die Verteilung der Plasmazellen und Memory-B-Zellen betreffend, könnte das Tumormodell darstellen. Bei dem B16 Melanom handelt es sich um ein sehr schnell wachsendes Tumormodell und die Tiere wurden spätestens an Tag 14 nach Injektion der B16 Melanozyten getötet. Ein weiteres Wachstum des Melanoms wäre nicht vertretbar gewesen. Dies ist jedoch eine geringe Zeitspanne um die Ausbildung eines Tumor-Microenvironments und eine speziell gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu ermöglichen. Im Vergleich dazu bestanden die Malignome der CRC-Patienten länger als 2 Wochen, meistens über Monate. Dies könnte eine Erklärung für den hohen Anteil an naiven B-Zellen in B16 Melanom und den Milzen der erkrankten Tiere sein. Der Anteil der aktivierten $CD86^{+}$ B-Zellen und antigenerfahrenen $CD27^{+}$ in den B16 TABs (9,49% und 2,05%) im Vergleich zu den gleichen Populationen aus Milz der erkrankten Tiere (1,35% und 0,52%) zeigt zudem, dass eine tumorbezogene Aktivierung stattfand. Eine Erklärung warum sich jedoch kaum Plasmazellen in den B16 TABs (0,57%) und mehr in den Milz-assoziierten B-Zellen der erkrankten (2,01%) und gesunden (3,35%) Tiere befinden, könnte mit der Hypothese begründet werden, dass Plasmazellen um ihre „Überlebensnische“ konkurrieren müssen bevor sie zu langlebigen Plasmazellen ausdifferenzieren können (Radbruch et al., 2006). Möglicherweise bietet das B16 Melanom hierzu nicht das richtige Milieu oder es müsste ein längeres Wachstum ermöglicht werden. Andererseits befinden sich 80-90% der langlebigen Plasmazellen vor allem im Knochenmark (Benner, Hijmans, & Haaijman, 1981; Radbruch et al., 2006), welches in

diesen Versuchen jedoch nicht untersucht wurde. Vielleicht kam es auch im Zuge des B-Zell-Selektions-Prozesses zu einem Verlust der Plasmazellen, da sich in den Proben noch weniger Plasmablasten fanden (Daten nicht gezeigt), welche noch zum Teil Merkmale von aktivierten B-Zellen auf ihrer Oberfläche tragen und den Übergang zu den nicht mehr teilungsfähigen Plasmazellen darstellen. Die Proben der CRC-Patienten wurden hingegen nicht speziell auf B-Zellen selektiert.

Bezüglich der TABs im B16 Melanom und anderen Tumor-Mausmodellen zeigten sich folgende Ergebnisse. Auch im Prostata-Karzinom-Modell der Maus fanden sich vermehrt Tumor-infiltrierende B-Zellen (Woo et al., 2014), jedoch erfolgte keine weitere Charakterisierung selbiger, die einen Vergleich mit den hier gezeigten Daten ermöglichen würde. Neuste Daten zeigen, dass B-Zellen die Tumormunität speziell gegen das B16 Melanom erhöhen (Kobayashi et al., 2014). In dem Modell mit BLNK^{-/-} knock-out Mäusen konnte zudem nachgewiesen werden, dass B-Zellen die T-Zell-Infiltration in das Melanom und deren Zytokinproduktion fördern. Leider erfolgte auch hier keine genaue phänotypische Charakterisierung der B-Zellen die einen Vergleich ermöglichen könnte. Diese Ergebnisse unterstützend konnte nachgewiesen werden, dass B-Zellen in Bezug auf das B16 Melanom für die optimale T-Zell-Immunität gebraucht werden und ihre Depletion das Melanomwachstum fördert (D J DiLillo et al., 2010). Moutai et al konnte zudem zeigen, dass der Transfer von in vitro Antigen-spezialisierten B-Zellen das Wachstum und die Metastasierung des B16 Melanoms unterdrücken kann (Moutai, Yamana, Nojima, & Kitamura, 2014). B-Lymphozyten erweisen sich somit als effektive Möglichkeit einer Immuntherapie des B16 Melanoms und verdeutlichen in diesem Fall ihre tumorprotektive Rolle. Leider finden sich keine vergleichbaren Daten der Phänotypisierung wie sie hier vorgenommen wurde, für das B16 Melanom oder ein anderes vergleichbares Tumormaus-Modell.

Grundlegend wäre es von Vorteil gewesen, die B-Zell-Infiltration des humanen Kolorektalen-Karzinoms mit einem entsprechenden murinen Modell zu vergleichen. Es existieren zwar verschiedene murine CRC-Modelle, jedoch sind sie in einigen Fällen sehr zeit-, aufwands- und kostenintensiv und garantieren nur bei zwei Dritteln der Tiere die Entstehung eines

Adenokarzinoms des Kolons (Ericsson, Myles, Davis, & Ma, 2010). Melanome hingegen setzten sich aus einer Vielzahl phänotypischer und genetisch unterschiedlicher Zellen zusammen und stellten mit dem B16-Melanom der Maus ein leicht zugängliches und gut reproduzierbares immunogenes Tumormodell dar (Thompson, Scolyer, & Kefford, 2005). In neueren Untersuchungen humaner Melanome konnte eine Population von CD20⁺ und HMW-MAA⁺ Zellen detektiert werden, welche weniger als 2% der Melanomzellen der Tumormasse repräsentieren, jedoch nicht der B-Zellreihe zugeordnet werden konnten. Eine gezielte Elimination dieser Population über den Transfer zytotoxischer T-Zellen, welche einen chimären Antigen-Rezeptor präsentierten, führte zur Eradikation der Melanome und einem Rezidiv freien Intervall der Mäuse über 36 Wochen (P. Schmidt & Kopecky, 2011). Eine auf diesen Erkenntnissen basierende Behandlung eines Patienten mit fortgeschrittenem metastasiertem Melanom (Stadium IIIB nach AJCC) durch Injektion des CD20 spezifischen Antikörpers Rituximab in die Metastasen und Läsionen, führte zu einer kompletten Remission des Melanoms (Schlaak, Schmidt, & Bangard, 2012). Der Oberflächenmarker CD 20⁺ scheint hierbei nicht funktionell entscheidend zu sein. Er markiert eine spezifische Zellpopulation, welche nicht der B-Zellreihe zugeordnet werden kann und somit eher als Marker einer spezifischen Population tumorhaltende Stammzellen dient. Diese Ergebnisse berücksichtigend stellt sich auch die Frage, inwieweit geeignet ein murines Melanom-Modell zur Untersuchung von tumorassoziierten B-Zellen ist, wenn die Elimination dieser kleinen spezifischen nicht B-Zell zugehörigen Population zur Remission des Tumors führen kann.

Auch wenn sich nur grob und nur den B-Zell-Anteil im Tumor und die aktivierten B-Zellen betreffend, eine gleiche Tendenz zwischen CRC und B16 Melanom abzeichnet, kann davon ausgegangen werden, dass die Untersuchung eines geeigneteren Tumor-Mausmodells möglicherweise kongruentere Daten liefern könnte.

In Bezug auf das Kolorektale-Karzinom konnte gezeigt werden, dass eine Klassifikation basierend auf der Infiltration von Immunzellen besser zu sein scheint, als das konventionelle Tumor-Staging (Galon et al., 2006). In den hier

beschriebenen Daten zeigte sich vor allem eine Ansammlung von terminal differenzierten Memory-B-Zellen und Plasmazellen in den CRC Tumorproben. Dies lässt auf eine speziell gegen den Tumor gerichtete Immunantwort schließen. In einer Untersuchung, welche die B-Zellen im peripheren Blut von Krebspatienten untersuchte, führte ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium zu einem Verlust der Memory-B-Zellen und zu einem Anstieg der Plasmazellen (Carpenter et al., 2009). Für die PBMCs der CRC Patienten konnten ähnliche Ergebnisse mit einem gleichzeitig starken Anstieg der Plasmazellen (CRC-Tumorgewebe: 31,7%; PBMCs-CRC: 12,6% vs. PBMCs-gesunde Kontrolle: 1,4%) verzeichnet werden. Bezüglich des Kolorektalen-Karzinoms ist die Plasmazell-Infiltration mit einem günstigen Krankheitsverlauf assoziiert (Richards et al., 2012; M. Schmidt et al., 2012). Bezüglich des Anteils aktivierter B-Zellen fanden sich in dem untersuchten Blut von Krebspatienten keine Unterschiede (Carpenter et al., 2009), jedoch ein vermehrtes Vorkommen in Ovarial- und Blasen-Karzinom (Zirakzadeh et al., 2013). Auch der erwähnte Verlust von Memory-B-Zellen im peripheren Blut von Krebspatienten zeigte sich in den hier aufgeführten CRC-Proben nicht. Dafür ist ein signifikanter Anstieg der Memory-B-Zellen in Tumorgewebe und PBMCs der CRC-Patienten im Vergleich zu den PBMCs der gesunden Kontrollen zu verzeichnen (22,7%/19,3% vs. 8,2%; $p < 0,005$ / $p < 0,05$). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten in einer andersgearteten Gating-Strategie begründet liegen. Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Daten zum Kolorektalen-Karzinom sagen, dass eine deutliche Veränderung im Bereich der B-Zellen, verglichen zu den gesunden Kontrollen besteht. Auch wenn hier erst eine geringe Anzahl an Proben untersucht wurde und damit eine geringe statistische Aussagekraft besteht. Es wird deutlich, dass die TABs vorzugsweise aktiviert und weiter ausdifferenziert sind, was auf eine spezifische Immunantwort gegenüber dem Tumor schließen lässt. Diese Erkenntnisse könnten sich auf den weiteren Verlauf der auf B-Zellen ausgerichtete Immunotherapie von Malignomerkrankungen auswirken.

Bezüglich der funktionellen Analyse der B16 TABs wurde zum einen ihre Aktivierbarkeit über einen CD40-Liganden, zum anderen ihre Produktion von IL-10 nach Stimulation untersucht.

Die CD40 - CD40-Liganden Interaktion ist entscheidend für die T-Lymphozyten abhängige Immunantwort (Armitage et al., 1992; Noelle et al., 1992). Des weiteren führt die Stimulation durch CD40-Liganden bei B-Lymphozyten zu einer Proliferation, einem Immunglobulin-Klassen-Wechsel (Armitage et al., 1992; Aruffo et al., 1993; Fuleihan, Ramesh, & Geha, 1993), einer Antikörper-Sekretion (Nonoyama, Hollenbaugh, Aruffo, Ledbetter, & Ochs, 1993; Rousset, Garcia, & Banchereau, 1991) und dem Schutz vor Apoptose (Fang et al., 1997). Auch die Antigen-präsentierende Funktion der B-Zellen wird so verbessert (Schultze et al., 1997). Zudem ist bekannt, dass Tumor-infiltrierende B-Zellen Antigen-erfahren sind und dem entsprechend Marker wie CD80 und CD86 aber auch APC-Marker entsprechend MHC-I und MHC-II exprimieren (Nielsen et al., 2012).

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass auch aus dem B16 Melanom gewonnene TABs durch die Interaktion mit einem CD40-Liganden proliferieren und gesteigert aktiviert werden können. Dies ist anhand der Wachstumskurve (vgl. Abb.4), der Clusterbildung und der Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD86, MHC-I und MHC-II zu erkennen (vgl. Abb. 5, 6, 7 und 8). Dabei war die Zunahme der Expression der Aktivitäts- und APC-Marker nach 14 Tagen zwar bei den B-Zellen aus der Kontrollmilz höher (MFI CD80 d14: 6,87; CD86: 30,43; MHC-I: 0,50; MHC-II: 79,36), jedoch war auch eine deutlich Zunahme für die B16 TABs zu verzeichnen (MFI CD80 d14: 4,70; CD86: 20,49; MHC-I: 0,59; MHC-II: 30,96). Die Proliferation hingegen ist bei den B16 TABs und den B-Zellen aus der gesunden Milz nicht fortlaufend und erreicht ihren Höhepunkt zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vgl. Abb. 4). Für die B-Zellen aus der gesunden Milz gilt dies hierbei schon an Tag 3 ($4,25 \times 10^6$ Zellen) nach Beginn der Kultur, für die B16 TABs an Tag 7 (5×10^6 Zellen). Dies ist ein untypischer Verlauf auch für die B-Zellen aus der gesunden Kontrolle, da eine fortlaufende Proliferation und Zunahme der B-Zellen stattfinden sollte (Liebig et al., 2010). Dieser untypische Wachstumsverlauf kann damit in Zusammenhang stehen, dass zum Zeitpunkt der Experimente die transfezierten HeLA-Zellen nicht gut proliferierten und angesetzte Kulturen auch beendet werden mussten, da die Feederzellen abgestorben waren. Wie sich später herausstellte lag der Grund hierfür in einer Mycoplasmeninfektion der transfezierten HeLA-Zellen. Die Expression

des CD40-Liganden war hierbei jedoch kaum beeinflusst. Dies ist einer der Gründe, warum dieser Versuch nur einmal durchgeführt werden konnte. Ein weiterer bestand wie schon vorherig beschrieben, in der aufwendigen Aufarbeitung und Gewinnung der B16 TABs. Zudem führte der immer noch hohe Anteil an Tumorzellresten in den Proben dazu, dass das Medium wesentlich schneller verbraucht wurde, als bei den B-Zellen der Kontrolle und so ein Umsetzen mit Austausch des Mediums viel früher als alle 4 Tage hätte erfolgen müssen. Dies hätte jedoch eine kürzere Zeitspanne für die CD40-Liganden B-Zell-Interaktion bedeutet. Dies könnte auch eine Erklärung sein, warum sich die Cluster an Tag 14 der Kultur (vgl. Abb. 6) zwischen den beiden Zellreihen unterscheiden und die Clusterdichte bei den B16 TABs deutlich geringer ist. Trotzdem zeigt dieser eine Versuch, dass auch TABs durch die CD40-Liganden aktiviert werden und so die Anti-Tumor-Immunantwort beeinflusst werden könnte. Diese Annahme unterstützend konnte nachgewiesen werden, dass B-Zellen die von dendritischen Zellen induzierte Tumor-Immunität negativ beeinflussen, jedoch CD40-Liganden aktivierte B-Zellen dies nicht tun (Watt, Ronchese, & Ritchie, 2007). Des weiteren gelang es über den Transfer von CD40-Liganden aktivierten und mit Tumorpeptid-beladenen B-Zelle eine antigenspezifische Anti-Tumor-Antwort in Mäusen zu induzieren (Ritchie, Yang, Hermans, & Ronchese, 2004). Dies ist durch die Kreuz-Präsentation von Antigenen an die APCs und durch eine direkte T-Zell-Aktivierung zu erklären. Bezüglich des CD40-Liganden zeigten neuere Ergebnisse zudem, dass er in Verbindung mit Chemotherapeutika durch direkte Zytotoxizität und Wiederherstellung einer T-Zellimmunität Anti-Tumor-Effekte auf humane Krebszelllinien hat (Z.-Q. Wang, Wang, Ling, Zhang, & Shi, 2013). Zusammenfassend ist zu erkennen, dass in dem CD40-Liganden und die durch ihn aktivierten B-Zellen eine mögliche Option für krebsbezogene Immuntherapien bestehen könnte. Es ist jedoch eindeutig, dass durch diesen einmalig durchgeführten Versuch noch keine signifikanten Aussagen getroffen und weitere Untersuchungen in dieser Richtung am Besten mit TABs aus anderen Tumormodellen durchgeführt werden sollten. Wie schon in der Einleitung erwähnt, können B-Zellen auch durch die Sekretion von immunsupprimierendem IL-10 regulatorischen Einfluss auf die Immunantwort nehmen und so auch einen inhibitorischen Effekt auf die Anti-

Tumor Immunität bewirken (Inoue et al., 2006; Mizoguchi & Bhan, 2006). Diesen Sachverhalt aufgreifend, sollte daher mittels Stimulation die Produktion von IL-10 durch die B16 TABs analysiert werden. Für die Maus ist zudem eine spezifische B-Zell-Population von B10 Zellen ($CD1d^{high} CD5^{+} CD19^{+}$) beschrieben, welche als Hauptproduzent von IL-10 gilt (Matsushita & Tedder, 2011) und auch hier daraufhin untersucht wurde. Auch bei diesem Versuchsaufbau stellte die Gewinnung ausreichender B16 TABs einen limitierenden Faktor dar. Zudem verbrauchten auch hier die in den aufgereinigten Proben enthaltenen Tumorzellereste schnell das in dem Ansatz enthaltene Medium und führten zum Tod der enthaltenen TABs. Daher wurden hierzu die B-Zellen aus der Milz der an einem B16 Melanom erkrankten Tiere gewonnen, stimuliert und die Daten mit B-Zellen aus einer gesunden Milz nach Stimulation verglichen. Leider war für die B10-Zellen aus den Milzen der erkrankten Tiere überhaupt keine Produktion von IL-10 (IL-10 vor Stimulation: 14,34%; IL-10 der B10-Zellen nach Stimulation: 8,17%; Isotypenkontrolle IL-10 der B10-Zellen nach Stimulation: 7,60%) und für die B10-Zellen aus den gesunden Kontrollmilzen nur eine sehr geringe Produktion zu verzeichnen (IL-10 vor Stimulation: 12,28%; IL-10 der B10-Zellen nach Stimulation: 14,48%; Isotypenkontrolle IL-10 der B10 Zellen nach Stimulation: 10,40%). Vor allem die Ergebnisse der B10-Zellen der Kontrollmilzen lassen darauf schließen, dass die Stimulation an sich noch nicht optimal funktioniert hat. Dies lässt sich aus folgenden Sachverhalten schließen. Angaben zufolge machen die B10-Zellen 1-2% der B-Zellen aus den Milzen gesunder Mäuse aus (Matsushita & Tedder, 2011; Yanaba, Bouaziz, Haas, et al., 2008). Aus den B-Zellen der hier untersuchten gesunden Kontrollmilzen machten sie im Mittel gerade einmal 0,55% und bei den erkrankten Milzen 0,61% aus. Beide liegen damit deutlich unter den zu erwarteten Werten. Obwohl sich für die Stimulation sehr an bekannten Protokollen orientiert wurde (Matsushita, Horikawa, Iwata, & Tedder, 2010), könnte allein schon ein unterschiedliches bzw. strengeres Vorgehen im Gating diese Werte erklären. Die Stimulation an sich erfolgte dann mittels LPS, PMA, Ionomycin und Monensin über 48h Stunden (vgl. 2.2.3.4). Andere Arbeiten diesbezüglich konnten durch die alleinige Stimulation mit PMA, Ionomycin und Golgi-Stop eine deutliche zytoplasmatische IL-10 Synthese

und durch die zusätzliche Zugabe von LPS und PIM(L+PIM) auch nach 5h einen Produktion von IL-10 durch B-Zellen nachweisen (Matsushita & Tedder, 2011; Yanaba et al., 2009). Andere Untersuchungen konnte zudem zeigen, dass die Stimulation der B-Zellen mit LPS, CpG und apoptotischen Zellen eine signifikant höhere IL-10 Synthese ermöglicht im Gegensatz zu der Stimulation mit PMA und Ionomycin (Brummel & Lenert, 2005; Gray, Miles, Salter, Gray, & Savill, 2007). Diese Ergebnisse zeigen somit weitere Möglichkeiten auf, die Stimulation zu optimieren. Andererseits scheint der richtige Ansatz gefunden zu sein, da für die B10-Zellen aus der gesunden Milz eine minimaler Nachweis von IL-10 möglich war. Eine andere Untersuchung im Zuge dieser Thematik konnte zeigen, dass es durch eine B-Zell-Depletion und den damit verbundenen Verlust der B10-Zellen zu einem Rückgang von Lymphomen im Mausmodell kam (Minard-Colin et al., 2008). Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass im Zuge einer CD20 Antikörpertherapie im Lymphom-Mausmodell, eine geringe Anzahl an verbliebenen B10-Zellen und die daraus resultierende IL-10 Sekretion ausreicht, um den Therapieerfolg negativ zu beeinflussen (Horikawa, 2011). Das auch Krebszellen selber IL-10 produzieren konnte am Beispiel der CLL nachgewiesen werden (D J DiLillo et al., 2013). Regulatorische B-Zellen und CLL-Zellen teilen gleiche Oberflächenmarker und sind durch ex vivo Stimulation in der Lage IL-10 zu produzieren. Diese IL-10 kompetenten CLL-Zellen haben somit eine regulatorische Funktion und steuern so zur Immunsuppression der CLL-Patienten bei. Diese Beispiele geben eindeutige Hinweise darauf, dass TABs aber auch Tumorzellen selber, durch eine IL-10 Produktion den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen und somit auch ein mögliches therapeutisches Ziel darstellen können. Somit sollte an der Optimierung der hier erfolgten IL-10 Stimulation gearbeitet und vor allem Versuche mit TABs möglichst aus einem anderen Tumormodell erfolgen.

5 Zusammenfassung

Erkrankungen an Malignomen und deren Folgen stellen die zweithäufigste Todesursache unserer heutigen Zeit dar (Xu et al., 2010). Schon früh stellte sich dabei die Frage, in wie weit unser Immunsystem Neoplasien erkennen und diese auch abwehren kann. Die Annahmen Paul Ehrlichs aus den zum Ende des 19. Jahrhunderts durchgeführten tierexperimentellen onkologischen Vakzinierungsstudien konnten später belegt werden (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). Auch für den humanen Organismus belegen Untersuchungen eine entscheidende Bedeutung des Immunsystems an der Tumorentstehung und Tumorabstoßung. Dabei konnte gezeigt werden, dass es unter einer immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantationen eine deutlich höhere Inzidenz von Karzinomen gibt als gegenüber der Normalpopulation (Ippoliti, Rinaldi, Pellegrini, & Viganò, 2005; Vallejo, Romero, & de Vicente, 2005). Für einige Malignome konnte zudem eine positive Korrelation von Prognose und Ausmaß der lymphozytären Infiltration gezeigt werden (Gooden, de Bock, Leffers, Daemen, & Nijman, 2011; Ogino et al., 2009). Wenig ist jedoch bisher über den Einfluss von B-Zellen auf die Tumor-Biologie bekannt, obwohl sie in viele humanen Tumoren infiltrierend nachgewiesen werden konnten (Menegaz et al., 2008; Nielsen et al., 2012a; Yasuda et al., 2002). Bezüglich des Mamma-Karzinoms konnte eine positive Korrelation im Ausmaß der B-Zell-Infiltration und der Prognose gezeigt werden (Eiró et al., 2012; Martinet et al., 2011). Für andere Tumorlokalisationen und in Rahmen von Tierversuchen konnten demgegenüber negative Auswirkungen der B-Zell-Infiltration beschrieben werden (Quan et al., 1999; Ruddell et al., 2011). Somit werden der B-Zelle tumorprotektive aber auch die Tumorprogression unterstützende Eigenschaften zugeschrieben.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der immunologischen Vorgänge bei Krebserkrankungen leisten, indem sie einerseits die Daten einer phänotypischen Charakterisierung von B-Zellen aus dem B16 Melanom der Maus mit denen von humanen Kolorektalen-Karzinom-Patienten vergleicht und andererseits eine funktionelle Untersuchung der B16 Melanom Tumor-

assoziierten B-Zellen anhand einer CD40-Liganden-Aktivierung und IL-10 Stimulation untersucht. Somit könnten mögliche Unterschiede bezüglich der Tumor-assoziierten B-Zellen zwischen den beiden Spezies aufgedeckt und dieses Wissen für weitergehende Experimente genutzt werden. Bei beiden Tumorentitäten erfolgte die phänotypische Charakterisierung anhand einer durchflusszytometrischen Analyse und wurde beim B16 Melanom mit den B-Zellen aus der Milz der erkrankten Tiere und gesunden Kontrolltieren verglichen. Die Tumor-assoziierten B-Zell-Populationen der Kolon-Karzinom-Patienten wurde mit B-Zellen aus dem peripheren Blut erkrankter Patienten und gesunder Kontrollen verglichen. Für das B16 Melanom zeigte sich hierbei ein höherer Anteil an B-Zellen als in den Milzen der erkrankten und gesunden Tiere (70,78% vs. 9,51%/36,21%). In Bezug auf die aktivierten B-Zellen (CD86⁺ aus CD19⁺ B220⁺) waren auch hier größere prozentuale Anteile in den Tumor-assoziierten B-Zellen als in den B-Zellen der erkrankten und der gesunden Milz auszumachen (9,49% vs. 1,35%/1,24%). Dies lässt auf eine mögliche Aktivierung durch Tumorantigene schließen. Die naiven B-Zellen (IgD⁺ CD27⁻ aus CD19⁺ B220⁺) machten jedoch in B16 Melanom, erkrankter Milz und Kontrollmilz den größten Anteil der B-Zellen aus (80,39% vs. 94,37% vs. 83,34%) und waren im B16 Melanom im Umkehrschluss zum Anteil der aktivierten B-Zellen leicht erniedrigt. Bezüglich der Plasmazellen (CD138⁺ CD27⁻ aus CD19⁺ B220⁺) und Memory-B-Zellen (IgD⁻ CD27⁺ aus CD19⁺ B220⁺) zeigten sich in Tumor und erkrankter Milz prozentual extrem geringe Anteile (Plasmazellen B16 TABs 0,57% und 2,01% in erkrankter Milz; Memory-B-Zellen B16 TABs 0,56% und 0,06% in erkrankter Milz) als im Vergleich zu der gesunden Kontrollmilz (Plasmazellen 3,35%; Memory-B-Zellen 0,68%). Diese Ergebnisse unterscheiden sich hinsichtlich der ausdifferenzierten B-Zell-Subpopulationen von denen im CRC des Menschen. Auch hier fand sich im Tumorgewebe ein signifikant höherer B-Zell-Anteil als in den PBMCs aus dem Blut der CRC-Patienten (8,9% vs. 5,1%; $p < 0,05$). Auch in Bezug auf die aktivierten B-Zellen wiesen die Tumor-assoziierten B-Zellen einen höheren Anteil auf als die PBMCs der CRC-Patienten und der gesunden Kontrollen (16,8% vs. 4,1%/4,5%; $p < 0,005$). Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus dem B16 Melanom der Maus. Jedoch wiesen die CRC-Tumorproben und die PBMCs der CRC-Patienten einen geringen Anteil

an naiven B-Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen auf ($p < 0,05$). Dies ist durch den Umgekehrt starken Anstieg der Memory-B-Zellen zu erklären, welche in den Tumorgewebeproben aber auch den PBMCs der CRC-Patienten mindestens doppelt so hoch lagen, wie in den gesunden Kontrollen (22,7%/19,3% vs. 8,2%; $p < 0,005 / < 0,05$). Auch die Plasmazellen machten mit ca. 1/3 einen hohen Anteil der TABs im CRC aus und waren auch in den PBMCs der Erkrankten im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen erhöht (31,7%/12,6% vs. 1,4%; $p < 0,005 / < 0,05$). Somit zeigt sich im Kolorektalen-Karzinom des Menschen eine terminal ausdifferenziertere Population von Tumor-assoziierten B-Zellen als im B16 Melanom der Maus. Gründe hierfür können zum einen ein Verlust von B-Zellen im Zuge der komplizierten und erschwerten Aufreinigung der B16 Melanom Tumorproben sein, aber auch eine zu geringe Zeit um in diesem Tumormodell eine ausgeprägte B-Zell-assoziierte Tumorantwort zu generieren. Eine gemeinsame Grundtendenz ist jedoch in beiden Tumorentitäten anhand des B-Zell-Anteils und dem Anteil der aktivierten B-Zellen zu erkennen. Für andere humane Tumoren fanden sich zudem auch erhöhte Anteile für Plasmazellen im peripheren Blut, jedoch ein Verlust von Memory-B-Zellen (Carpenter et al., 2009).

Hinsichtlich der Aktivierung der B16 TABs durch einen CD40-Liganden und ihre mögliche daraus resultierende Funktion als Antigen-präsentierende Zelle konnte nachgewiesen werden, dass sich die Expression dies bezüglich untersuchter APC-Marker im Verlauf von 14 Tagen erhöht und eine Aktivierung zu verzeichnen ist. Untersucht wurden hierbei CD80 (MFI Tag7: 2,77 Tag14: 4,70), CD86 (MFI Tag7: 8,70 Tag14: 20,49), MHC-I (MFI Tag7: 0,41 Tag14: 0,59) und MHC-II (MFI Tag7: 18,29 Tag14: 30,96). Die Expression der gleichen Marker für die zur Kontrolle dienenden naiven B-Zellen stieg im gleichen Zeitraum etwas höher an. Leider wurde dieser Versuch aufgrund der sehr geringen Ausbeute an B16 TABs bei der Aufreinigung aus dem Tumorgewebe nur einmal durchgeführt. Trotzdem bestätigt er die Annahme, dass auch tumorassoziierte B-Zellen durch CD40-Liganden aktiviert und als APCs eine Anti-Tumorantwort induzieren können. Für naive B-Zellen im Tiermodell gelang dies bezüglich auch schon der Nachweis (Ritchie et al., 2004).

Ein anderer funktioneller Aspekt der B-Zellen wurde durch die Versuche hinsichtlich ihrer IL-10 Produktion nach Stimulation untersucht. Bekannt ist, dass eine Population von B10 Zellen ($CD1d^{high} CD5^{+} CD19^{high}$) 1-2% der B-Zellen in Wildtyp-Mäusen ausmachen kann und diese Zellen Hauptproduzenten des immunsupprimierenden IL-10 sind (Matsushita & Tedder, 2011; Yanaba, Bouaziz, Haas, et al., 2008). In Hinblick darauf wurden B-Zellen aus den Milzen der Melanom-tragenden Tiere sowie aus gesunden Milzen gewonnen und in 3 Versuchen stimuliert. Leider war für die B10-Zell-Population in den gesunden Milzen nur ein geringer Nachweis von IL-10 (IL-10 vor Stimulation: 12,28%; IL-10 der B10-Zellen nach Stimulation: 14,48%; Isotypenkontrolle IL-10 der B10 Zellen nach Stimulation: 10,40%) zu führen und für die B-Zellen aus den erkrankten Milzen keiner (IL-10 vor Stimulation: 14,34%; IL-10 der B10-Zellen nach Stimulation: 8,17%; Isotypenkontrolle IL-10 der B10-Zellen nach Stimulation: 7,60%). Untersuchungen aus anderen Arbeiten und eindeutige IL-10 Nachweise im Zuge einer Stimulation lassen daher darauf schließen, dass die hier angewandte Stimulations-Methode noch nicht optimiert ist (Brummel & Lenert, 2005; Gray et al., 2007; Yanaba et al., 2009). Zudem konnten andere Arbeiten nachweisen, dass Tumorzellen selber IL-10 produzieren können und somit immunsupprimierend wirken (D J DiLillo et al., 2013) und B10-Zellen den Rückgang von Tumoren unter Therapie negativ beeinflussen können (Horikawa, 2011).

Zusammenfassen zeigt sich, dass Patienten mit einem Kolorektalen-Karzinom deutliche Veränderungen hinsichtlich ihrer Tumordinfiltrierenden B-Zellen zeigen. Es finden sich phänotypisch aktivierte und reife B-Zell-Subpopulationen in Form von Plasma- und B-Memory-Zellen, sowie aktivierten B-Zellen. Dies lässt eine tumorspezifische Immunantwort vermuten. Im B16 Melanom der Maus finden sich auch vermehrt aktivierte B-Zellen jedoch keine weiter ausdifferenzierte reife Form. Da sich dieses Tumormodell als eher ungeeignet bezüglich der phänotypischen Charakterisierung von B-Zellen erwies, sollten daher Vergleiche und Untersuchungen mit einem passenderen Tumormausmodell in Betracht gezogen werden. Neuere Untersuchungen von Melanomen zeigten zudem eine spezifische Population von $CD20^{+}$ Zellen, welche allerdings nicht der B-Zell-Reihe angehören, jedoch als sog. Tumor-

Stammzellen entscheidend die Progression des Tumors beeinflussen und bei Eradikation zu einer Remission der Erkrankung führten (Schlaak et al., 2012; P. Schmidt & Kopecky, 2011). Das Melanom erweist sich somit als eher ungeeignet für die Untersuchung von Tumor-assoziierten B-Zellen im Mausmodell. Zudem müssen um einen wirklichen Vergleich zwischen den TABs der beiden Spezies ermöglichen zu können, annähernd gleiche Anzahlen an Proben untersucht werden. In diesem Falle wurden aufgrund der komplizierten Aufbereitung der B16 Melanome nur 3 gewonnene Zellsuspensionen aus Tumoren untersucht, dem 51 untersuchte CRC-Tumorproben entgegenstehen. Trotzdem lassen vor allem die Ergebnisse der CD40-Liganden-Aktivierung sowie beschriebene Untersuchungen hinsichtlich der IL-10 Produktion von B-Zellen auf regulatorische Effekte auch in der Tumorummunologie schließen. Die phänotypisch charakterisierten unterschiedlichen B-Zell-Populationen in kranken und gesunden Probanden verdeutlichen die Veränderungen die B-Zellreihen während einer Tumorerkrankungen durchlaufen können. Zusätzlich ist zu erkennen, dass eine durch Tumorantigene induzierte B-Zell-Antwort ausgelöst wird und eine therapeutische Depletion in einem frühen Erkrankungsstadium sich nachteilig auf den weiteren Krankheitsverlauf auswirken könnte. Bezüglich ihrer APC-Funktion und Aktivierbarkeit durch CD40-Liganden stellen B-Zellen neue Optionen und Wege für eine erfolgsversprechende Immuntherapie von Malignomen dar. Dieses Potenzial konnte hier nur andeutungsweise nachgewiesen werden und bedarf auf jeden Fall weiterer Untersuchung um einen immunologischen Therapieansatz von Tumorerkrankungen weiter verfolgen und ausbauen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Maliszewski, C. R. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 357, 80–82
2. Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Neubauer, M. (1993). The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*, 72, 291–300
3. Balkwill, F., Montfort, A., & Capasso, M. (2013). B regulatory cells in cancer. *Trends in Immunology*, 34(4), 169–73
4. Benner, R., Hijmans, W., & Haaijman, J. J. (1981). The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clinical and Experimental Immunology*, 46(1), 1–8
5. Bertrand, F. E., Eckfeldt, C. E., Fink, J. R., Lysholm, a S., Pribyl, J. a, Shah, N., & LeBien, T. W. (2000). Microenvironmental influences on human B-cell development. *Immunological Reviews*, 175(5), 175–86
6. Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A. C., Galon, J. (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*, 39(4), 782–95
7. Birkeland, S. A., Storm, H. H., Lamm, L. U., Barlow, L., Blohmé, I., Forsberg, B., Frödin, L. (1995). Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964–1986. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 60, 183–189
8. Bouaziz, J.-D., Yanaba, K., Venturi, G. M., Wang, Y., Tisch, R. M., Poe, J. C., & Tedder, T. F. (2007). Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20878–83
9. Brummel, R., & Lenert, P. (2005). Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174, 2429–2434
10. Candolfi, M., Curtin, J., Yagiz, K., & Assi, H. (2011). B Cells Are Critical to T-cell Mediated Antitumor Immunity Induced by a Combined Immune-Stimulatory/Conditionally Cytotoxic Therapy for Glioblastoma. *Neoplasia*, 13(10), 947–960
11. Carpenter, E. L., Mick, R., Rech, A. J., Beatty, G. L., Colligon, T. a, Rosenfeld, M. R., Vonderheide, R. H. (2009). Collapse of the CD27+ B-

cell compartment associated with systemic plasmacytosis in patients with advanced melanoma and other cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(13), 4277–87

12. Chen, T., Song, D., Min, Z., Wang, X., Gu, Y., Wei, B., Zheng, S. (2012). Perioperative dynamic alterations in peripheral regulatory T and B cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 10, 14
13. Clark, R. E., Anthony Dodi, I., Hill, S. C., Lill, J. R., Aubert, G., Macintyre, A. R., Alejandro Madrigal, J. (2001). Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood*, 98, 2887–2893
14. Clifford, G. M., Polesel, J., Rickenbach, M., Dal Maso, L., Keiser, O., Kofler, A., Franceschi, S. (2005). Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(6), 425–32
15. Corthay, A. (2014). Does the Immune System Naturally Protect Against Cancer? *Frontiers in Immunology*, 5(May), 197
16. De Visser, K. E., Korets, L. V., & Coussens, L. M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 7(5), 411–23
17. DiLillo, D. J., Hamaguchi, Y., Ueda, Y., Yang, K., Uchida, J., Haas, K. M., Tedder, T. F. (2007). Maintenance of Long-Lived Plasma Cells and Serological Memory Despite Mature and Memory B Cell Depletion during CD20 Immunotherapy in Mice. *The Journal of Immunology*, 180(1), 361–371
18. DiLillo, D. J., Weinberg, J. B., Yoshizaki, a, Horikawa, M., Bryant, J. M., Iwata, Y., Tedder, T. F. (2013). Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*, 27(1), 170–82
19. DiLillo, D. J., Yanaba, K., & Tedder, T. F. (2010). B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(7), 4006–16
20. Eiró, N., Pidal, I., Fernandez-Garcia, B., Junquera, S., Lamelas, M. L., del Casar, J. M., Vizoso, F. J. (2012). Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PloS One*, 7(12), e52796

21. Engels, E., Pfeiffer, R., & Fraumeni, J. (2011). Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *Jama*, 306(17), 1891–1901
22. Ericsson, A., Myles, M., Davis, W., & Ma, L. (2010). Noninvasive detection of inflammation-associated colon cancer in a mouse model. *Neoplasia*, 12(12), 1054–1065
23. Fang, W., Nath, K. A., Mackey, M. F., Noelle, R. J., Mueller, D. L., & Behrens, T. W. (1997). CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating bcl-xL expression and blocking oxidant accumulation. *The American Journal of Physiology*, 272, C950–C956
24. Fremd, C., Schuetz, F., Sohn, C., Beckhove, P., & Domschke, C. (2013). B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*, 2(7), e25443
25. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews. Cancer*, 12(4), 298–306
26. Fuleihan, R., Ramesh, N., & Geha, R. S. (1993). Role of CD40-CD40-ligand interaction in Ig-isotype switching. *Current Opinion in Immunology*, 5, 963–967
27. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5795), 1960–4
28. Gooden, M. J. M., de Bock, G. H., Leffers, N., Daemen, T., & Nijman, H. W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 105(1), 93–103
29. Gray, M., Miles, K., Salter, D., Gray, D., & Savill, J. (2007). Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 14080–14085
30. Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Lund, F. E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology*, 1(6), 475–82
31. Hoover, R., & JR, J. F. (1973). Risk of cancer in renal-transplant recipients. *The Lancet*, (July), 16–17
32. Horikawa, M. (2011). Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4268–80

33. Inoue, S., Leitner, W. W., Golding, B., & Scott, D. (2006). Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Research*, 66(15), 7741–7
34. Ippoliti, G., Rinaldi, M., Pellegrini, C., & Viganò, M. (2005). Incidence of cancer after immunosuppressive treatment for heart transplantation. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 56(1), 101–13
35. Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., Tedder, T. F. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117(2), 530–41
36. Julien, S., Picco, G., Sewell, R., Vercoutter-Edouart, a-S., Tarp, M., Miles, D., Burchell, J. M. (2009). Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *British Journal of Cancer*, 100(11), 1746–54
37. Kaatsch, P., Spix, C., & Hentschel, S. (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=3479> (Zuletzt abgerufen am 27.07.2014)
38. Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7556–7561
39. Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF (1985). Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet*, 263–266.
40. Kobayashi, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Takehara, K., & Matsushita, T. (2014). B Cells Promote Tumor Immunity against B16F10 Melanoma. *The American Journal of Pathology*, (August), 1–10
41. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., & Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263–74
42. LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570–80
43. Li, Q., Lao, X., Pan, Q., Ning, N., Yet, J., Xu, Y., Chang, A. E. (2011). Adoptive transfer of tumor reactive B cells confers host T-cell immunity and tumor regression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(15), 4987–95

44. Liebig, T. M., Fiedler, A., Klein-Gonzalez, N., Shimabukuro-Vornhagen, A., & von Bergwelt-Baildon, M. (2010). Murine model of CD40-activation of B cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (37), 1–4
45. Maletzki, C., Jahnke, A., Ostwald, C., Klar, E., Prall, F., & Linnebacher, M. (2012). Ex-vivo clonally expanded B lymphocytes infiltrating colorectal carcinoma are of mature immunophenotype and produce functional IgG. *PloS One*, 7(2), e32639
46. Martin, F., & Chan, A. C. (2006). B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annual Review of Immunology*, 24, 467–96
47. Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J.-J., Girard, J.-P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Research*, 71(17), 5678–87
48. Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., & Tedder, T. F. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(4), 2240–52
49. Matsushita, T., & Tedder, T. F. (2011). Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 677, 99–111
50. Mauri, C., & Ehrenstein, M. R. (2008). The “short” history of regulatory B cells. *Trends in Immunology*, 29(1), 34–40
51. Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., & Londei, M. (2003). Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *J. Exp. Med.*, 197(4), 489–501
52. Menegaz, R. A., Michelin, M. A., Etchebehere, R. M., Fernandes, P. C. J., & Murta, E. F. C. (2008). Peri- and intratumoral T and B lymphocytic infiltration in breast cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 29, 321–326
53. Minard-Colin, V., Xiu, Y., Poe, J. C., Horikawa, M., Magro, C. M., Hamaguchi, Y., Tedder, T. F. (2008). Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood*, 112, 1205–1213
54. Mizoguchi, a., & Bhan, a. K. (2006). A Case for Regulatory B Cells. *The Journal of Immunology*, 176(2), 705–710

55. Moutai, T., Yamana, H., Nojima, T., & Kitamura, D. (2014). A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells selected in vitro. *PloS One*, 9(3), e92732
56. Mueller, B., & Pizzo, P. (1995). Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies. *The Journal of Pediatrics*, 126(January), 1–10
57. Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M. (2009). Janeway Immunologie. 7. Auflage Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH
58. Nelson, B. H. (2010). CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(9), 4977–82
59. Nielsen, J. S., Sahota, R. a, Milne, K., Kost, S. E., Nesslinger, N. J., Watson, P. H., & Nelson, B. H. (2012). CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(12), 3281–92
60. Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., & Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6550–6554
61. Nonoyama, S., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., & Ochs, H. D. (1993). B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 178, 1097–1102
62. Ogino, S., Noshio, K., Irahara, N., Meyerhardt, J. A., Baba, Y., Shima, K., Fuchs, C. S. (2009). Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clinical Cancer Research*, 15, 6412–6420
63. Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Research*, 71(10), 3505–15
64. Olkhanud, P. B., Rochman, Y., Bodogai, M., Malchinkhuu, E., Wejksza, K., Xu, M., Biragyn, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(10), 5656–62

65. Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., & Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093–102
66. Qin, Z., Richter, G., Schuler, T., Ibe, S., Cao, X., & Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med*, 4, 627–630
67. Quan, N., Zhang, Z., Demetrikopoulos, M. K., Kitson, R. P., Chambers, W. H., Goldfarb, R. H., & Weiss, J. M. (1999). Evidence for Involvement of B Lymphocytes in the Surveillance of Lung Metastasis in the Rat Evidence for Involvement of B Lymphocytes in the Surveillance of Lung Metastasis in the Rat 1. *Cancer Research*, 59, 1080–1089
68. Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G. C., Dörner, T., & Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature Reviews. Immunology*, 6(10), 741–50
69. Richards, C. H., Flegg, K. M., Roxburgh, C. S. D., Going, J. J., Mohammed, Z., Horgan, P. G., & McMillan, D. C. (2012). The relationships between cellular components of the peritumoural inflammatory response, clinicopathological characteristics and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 106(12), 2010–5
70. Ritchie, D. S., Yang, J., Hermans, I. F., & Ronchese, F. (2004). B-Lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8(+) T-cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60(6), 543–51
71. Rousset, F., Garcia, E., & Banchereau, J. (1991). Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 173, 705–710
72. Ruddell, A., Harrell, M. I., Furuya, M., & Kirschbaum, S. B. (2011). B Lymphocytes Promote Lymphogenous Metastasis of, 13(8), 748–757
73. Saeterdal, I., Bjørheim, J., Lislud, K., Gjertsen, M. K., Bukholm, I. K., Olsen, O. C., Gaudernack, G. (2001). Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13255–60
74. Salavoura, K., Kolialexi, A., Tsangaris, G., & Mavrou, A. (2008). Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Research*, 28(2B), 1263–9

75. Schioppa, T., & Moore, R. (2011). B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 26–31
76. Schlaak, M., Schmidt, P., & Bangard, C. (2012). Regression of metastatic melanoma by targeting cancer stem cells. *Oncotarget*, 3(1), 22–30
77. Schmidt, M., Hellwig, B., Hammad, S., Othman, A., Lohr, M., Chen, Z., Hengstler, J. G. (2012). A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin κ C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(9), 2695–703
78. Schmidt, P., & Kopecky, C. (2011). Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2474–79
79. Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1565–70
80. Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Nadler, L. M. (1997). CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2757–65
81. Shah, S., Divekar, A. a, Hilchey, S. P., Cho, H.-M., Newman, C. L., Shin, S.-U., Rosenblatt, J. D. (2005). Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 117(4), 574–86
82. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, a T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–11
83. Sorenmo, K. U., Krick, E., Coughlin, C. M., Overley, B., Gregor, T. P., Vonderheide, R. H., & Mason, N. J. (2011). CD40-activated B cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-Hodgkin's lymphoma. *PloS One*, 6(8), e24167
84. Staquicini, F. I., Tandle, A., Libutti, S. K., Sun, J., Zigler, M., Bar-Eli, M., Lopes, J. D. (2008). A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Research*, 68(20), 8419–28

85. Tarella, C., Passera, R., Magni, M., Benedetti, F., Rossi, A., Gueli, A., Rambaldi, A. (2011). Risk factors for the development of secondary malignancy after high-dose chemotherapy and autograft, with or without rituximab: a 20-year retrospective follow-up study in patients with lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(7), 814–24
86. Thompson, J. F., Scolyer, R. a, & Kefford, R. F. (2005). Cutaneous melanoma. *Lancet*, 365(9460), 687–701
87. Thun, M. J., Henley, S. J., & Gansler, T. (2004). Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Foundation Symposium*, 256, 6–21
88. Vallejo, G. H., Romero, C. J., & de Vicente, J. C. (2005). Incidence and risk factors for cancer after liver transplantation. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 56(1), 87–99
89. Van der Meer, J. W., Weening, R. S., Schellekens, P. T., van Munster, I. P., & Nagengast, F. M. (1993). Colorectal cancer in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Lancet*, 341(8858), 1439–40
90. Von Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Reviews. Immunology*, 3(11), 867–78
91. Wang, R. (1999). Cloning Genes Encoding MHC Class II-Restricted Antigens: Mutated CDC27 as a Tumor Antigen. *Science*, 284(5418), 1351–1354
92. Wang, Z.-Q., Wang, J., Ling, W.-H., Zhang, X.-G., & Shi, Q. (2013). Effects of CD40 ligation combined with chemotherapy drugs on human breast cancer cell lines. *The Journal of International Medical Research*, 41(5), 1495–504
93. Watt, V., Ronchese, F., & Ritchie, D. (2007). Resting B cells suppress tumor immunity via an MHC class-II dependent mechanism. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 30, 323–332
94. Wejksza, K., Lee-Chang, C., Bodogai, M., Bonzo, J., Gonzalez, F. J., Lehrmann, E., Biragyn, A. (2013). Cancer-produced metabolites of 5-lipoxygenase induce tumor-evoked regulatory B cells via peroxisome proliferator-activated receptor α . *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(6), 2575–84
95. Woo, J. R., Liss, M. a, Muldong, M. T., Palazzi, K., Strasner, A., Ammirante, M., Jamieson, C. a M. (2014). Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 30

96. Xiu, Y., Wong, C. P., Bouaziz, J.-D., Hamaguchi, Y., Wang, Y., Pop, S. M., Tedder, T. F. (2008). B Lymphocyte Depletion by CD20 Monoclonal Antibody Prevents Diabetes in Nonobese Diabetic Mice despite Isotype-Specific Differences in Fc R Effector Functions. *The Journal of Immunology*, 180(5), 2863–2875
97. Xu, J., Kochanek, K. D., & Murphy, S. L. (2010). *National Vital Statistics Reports Deaths: Final Data for 2007* (Vol. 58)
98. Yanaba, K., Bouaziz, J., Matsushita, T., & Tsubata, T. (2009). The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *J Immunol*, 182(12), 7459–7472
99. Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M., & Tedder, T. F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28(5), 639–50
100. Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Magro, C. M., St Clair, E. W., & Tedder, T. F. (2008). B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 223, 284–99
101. Yasuda, M., Takenoyama, M., & Obata, Y. (2002). Tumor-infiltrating B Lymphocytes as a Potential Source of Identifying Tumor Antigen in Human Lung Cancer. *Cancer Research*, 62, 1751–1756.
102. Yuseff, M.-I., Pierobon, P., Reversat, A., & Lennon-Duménil, A.-M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nature Reviews. Immunology*, 13(7), 475–86
103. Zeng, Q., Ng, Y., Singh, T., Jiang, K., Sheriff, K. A., Ippolito, R., Hoffman, R. A. (2014). Brief report B cells mediate chronic allograft rejection independently of antibody production. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3)
104. Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. a, Massobrio, M., Regnani, G., Coukos, G. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(3), 203–13
105. Zirakzadeh, a A., Marits, P., Sherif, A., & Winqvist, O. (2013). Multiplex B cell characterization in blood, lymph nodes, and tumors from patients with malignancies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(11), 5847–55
106. Zitvogel, L., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews. Immunology*, 6(10), 715–27

7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Folgendes Manuskript zur Publikation von Daten zur vorliegenden Dissertation wurde veröffentlicht:

Shimabukuro-Vornhagen A.; Schlößer H.A.; Gryschock L.; Malcher J.; Wennhold K.; Garcia-Marquez M.; Herbold T.; Neuhaus L.S.; Becker H.J.; Fiedler A.; Scherwitz P.; Koslowsky T.; Hake R.; Stippel D.L.; Hölscher A.H.; Eidt S.; Hallek M.; Theurich S.; von Bergwelt-Baildon M.S.

„Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer“

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vorbild für die FACS-Analyse und Gating-Strategie am Beispiel eines aufgereinigten B16 Melanoms.....	27
Abb. 2: Diagramme A-C zeigen die Anteile der B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen aus jeweils 3 Proben von B16 Melanom, den Milzen der B16 Melanom tragenden Tiere und gesunden Kontrollmilzen	29
Abb. 3: B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen in PBMC und Tumor-Proben von Patienten mit CRC und in PBMC von gesunden Spendern (A-F)	32
Abb. 4: Wachstumskurve einer CD40B-Kultur mit aufgereinigten B-Zellen aus B16 Melanom und B-Zellen aus der Milz einer gesunden Maus.....	35
Abb. 5: Bilder der B16 TAB und B-Zellen aus gesunder Milz in CD40B-Kultur an d7.	36
Abb. 6: Bilder der B16 TAB und B-Zellen aus gesunder Milz in CD40B-Kultur an d14	37
Abb. 7: MFI der CD80 und CD86 Expression der B16 TAB und naiven B-Zellen an d7 und 14 der CD40-Aktivierung.	38
Abb. 8: MFI der MHC-I und MHC-II Expression der B16 TAB und naiven B-Zellen an d7 und 14 der CD40B-Aktivierung.....	39
Abb. 9: Ergebnisse der IL-10 Stimulation von B-Zellen aus Milzen von B16 Melanom tragenden Mäusen und B-Zellen aus Milzen gesunder Mäuse.....	40

9 Lebenslauf

Laura Stephanie Neuhaus

Zurlindenstrasse 55
8003 Zürich
Schweiz

Mobil: +41789083637
neuhaus.lauras@gmail.com

*18.02.1988 in Hannover

Studium & Dissertation

04/2007 – 05/2014	Universität zu Köln, Humanmedizin Staatsexamen 05/2014
03/2010 – 12/2014	Uniklinik Köln, Klinik I für Innere Medizin Experimentelle Doktorarbeit im Labor für Interventionelle-Immunologie AG Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael von Bergwelt-Baildon „Phänotypische Charakterisierung Tumor- assoziierte B-Zellen im B16 Melanom der Maus und Kolorektalen-Karzinom des Menschen“

Berufserfahrungen

06/2011 – 12/2012	St. Josef-Hospital, Bonn-Beuel: Studentische Aushilfskraft in Nachtdienst mit Arbeit in der Notaufnahme und auf Normalstation
-------------------	---

Schul Ausbildung

08/1998 – 06/2006	Staatliches Gymnasium „J. W. v. Goethe“ Weimar, Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
-------------------	---