

Der Einfluss von Chemotherapeutika mit Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)-modulierendem Potential sowie eines Verlustes des HIF-Regulators von Hippel-Lindau (VHL) auf den Phänotyp und die Funktion dendritischer Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Stefanie Trojandt

Mainz, 2014

Angefertigt in der Klinischen Forschergruppe Allergie an der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| TABELLENVERZEICHNIS | VIII |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | IX |
| 1 EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 HYPOXIE-INDUZIERBARER FAKTOR (HIF)..... | 1 |
| 1.2 HIF ALS ANGRIFFSPUNKT VON CHEMOTHERAPEUTIKA..... | 2 |
| 1.3 VON HIPPEL-LINDAU-PROTEIN, DER PHYSIOLOGISCHE REGULATOR VON HIF | 5 |
| 1.4 VHL-SYNDROM | 7 |
| 1.5 MAUSMODEL FÜR VHL | 8 |
| 1.6 DENDRITISCHE ZELLEN..... | 11 |
| 1.7 DCs UND TUMORTHERAPIE | 14 |
| 1.8 ZIEL DER ARBEIT..... | 17 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 18 |
| 2.1 MATERIAL..... | 18 |
| 2.1.1 Laborgeräte | 18 |
| 2.1.2 Materialien | 20 |
| 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien..... | 21 |
| 2.1.4 Größenstandards..... | 23 |
| 2.1.5 Enzyme..... | 23 |
| 2.1.6 Proteine und Peptide | 23 |
| 2.1.7 Antikörper | 24 |
| 2.1.8 Zytokine und Nukleotide | 29 |
| 2.1.9 Immunmagnetische Partikel zur Zellseparation | 29 |
| 2.1.10 Fertigsysteme | 30 |
| 2.1.11 Oligonukleotide..... | 30 |
| 2.1.12 Medien, Lösungen und Puffer..... | 31 |
| 2.1.13 Buffy Coats | 34 |
| 2.1.14 Mäuse..... | 35 |
| 2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN..... | 36 |
| 2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl..... | 36 |
| 2.2.2 Verwendete Zelllinien | 36 |
| 2.2.3 Kryokonservierung der Zelllinien..... | 36 |
| 2.2.4 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien..... | 37 |
| 2.2.5 Kryokonservierung der humanen Zellen | 37 |
| 2.2.6 Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem peripheren Blut | 38 |
| 2.2.7 Generierung humaner DCs aus Monozyten..... | 38 |
| 2.2.8 Generierung von murinen knochenmarkabgeleiteten DCs | 39 |
| 2.2.9 Präparation von murinen Lymphknotenzellen..... | 40 |
| 2.2.10 Präparation von murinen Milzzellen..... | 40 |
| 2.2.11 Aufreinigung von murinen T-Zellen über Nylonwolle-Säulen | 41 |
| 2.2.12 Proliferationstest..... | 41 |
| 2.2.13 Gemischte Lymphozyten Reaktion | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.14 | Messung von Radioaktivität | 43 |
| 2.2.15 | Zytotoxizitätstest (CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) | 43 |
| 2.3 | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN..... | 44 |
| 2.3.1 | Präparation der DNA aus Zellen | 44 |
| 2.3.2 | Präparation der DNA aus tierischem Gewebe | 44 |
| 2.3.3 | Präparation von RNA..... | 44 |
| 2.3.4 | Reverse Transkription der RNA | 44 |
| 2.3.5 | Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 45 |
| 2.3.6 | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion | 45 |
| 2.3.7 | Genotypisierung der Mäuse..... | 46 |
| 2.3.8 | Agarose Gelelektrophorese | 47 |
| 2.4 | BIOCHEMISCHE METHODEN | 47 |
| 2.4.1 | Extraktion von Proteinen aus Zellen | 47 |
| 2.4.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 47 |
| 2.4.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 48 |
| 2.5 | IMMUNOLOGISCHE METHODEN..... | 48 |
| 2.5.1 | Immunblot..... | 48 |
| 2.5.2 | Immundetektion von Proteinen | 49 |
| 2.5.3 | Magnetische Anreicherung humaner CD4 ⁺ T-Zellen aus PBMCs..... | 49 |
| 2.5.4 | Durchflusszytometrie | 50 |
| 2.5.5 | Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 52 |
| 2.5.6 | Immunglobulin-ELISA | 53 |
| 2.5.7 | Immunfluoreszenz | 53 |
| 2.5.8 | Endozytose-Assay | 54 |
| 2.5.9 | in vitro-Migration | 55 |
| 2.6 | TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN | 55 |
| 2.6.1 | in vivo-Migration..... | 55 |
| 2.6.2 | Immunisierung und Provokation | 55 |
| 2.6.3 | Lungenfunktionsmessung..... | 56 |
| 3 | ERGEBNISSE | 57 |
| 3.1 | PHÄNOTYPISCHE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON HUMANEN DCs NACH BEHANDLUNG MIT DEN ANTITUMOR-AGENZIEEN TPT UND GA..... | 57 |
| 3.1.1 | Behandlung immortalisierter Zelllinien mit TPT und GA | 58 |
| 3.1.2 | Behandlung humaner T-Zellen mit TPT und GA..... | 61 |
| 3.1.3 | Die Antitumor-Agenzien TPT und GA verändern den Phänotyp humaner Mo-DCs..... | 64 |
| 3.1.4 | TPT bzw. GA haben unterschiedliche Effekte auf das Zytokinprofil von Mo-DCs..... | 68 |
| 3.1.5 | TPT und GA beeinflussen die Fascin-Expression sowie das Migrationsverhalten von MO-DCs..... | 70 |
| 3.1.6 | Durch die Behandlung mit TPT und GA wird die Antigenaufnahme seitens der DCs verringert. | 72 |
| 3.1.7 | Die Behandlung von Mo-DCs mit TPT oder GA verändert ihr T-Zell-Aktivierungspotential | 73 |
| 3.1.8 | Behandlung von Mo-DCs mit TPT und GA beeinflusst unterschiedlich das Zytokinprofil von T-Zellen | 75 |
| 3.1.9 | Der Einfluss von TPT bzw. GA auf die Signaltransduktionswege humaner DCs..... | 77 |
| 3.2 | PHÄNOTYPISCHE UND FUNKTIONELLE ANALYSE VON BM-DCs AUS MÄUSEN MIT EINEM PARTIELLEN VHL VERLUST..... | 81 |
| 3.2.1 | Generierung von transgenen Mäusen mit heterozygoten VHL Exon2 ko | 83 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.2 | Phänotyp und Charakterisierung der heterozygoten VHL2 ko Mäuse | 85 |
| 3.2.3 | Analyse der Proliferation von T-Zellen aus heterozygoten VHL2 ko Mäusen | 87 |
| 3.2.4 | Phänotypische Charakterisierung der aus heterozygoten VHL2 ko Mäusen isolierten BM-DCs | 88 |
| 3.2.5 | Die Endozytose-Kapazität von heterozygoten VHL2 ko-DCs | 90 |
| 3.2.6 | Der partielle Verlust von VHL2 führt zu einem verminderten Migrationsverhalten von DCs in vivo .. | 92 |
| 3.2.7 | Das Aktivierungspotential von BM-DCs für allogene T-Zellen wird durch einen heterozygoten Verlust von VHL2 nicht beeinflusst | 93 |
| 3.2.8 | Heterozygote VHL2 ko-DCs verändern das Zytokinprofil von allopathen T-Zellen | 94 |
| 3.2.9 | Die antigenspezifische Proliferation von OT-I T-Zellen bzw. von OT-II T-Zellen wird durch Stimulation mit 1 µg OVA beladenen BM-DCs mit partiellem VHL2 ko moduliert..... | 96 |
| 3.2.10 | Analyse der allergischen Atemwegsentzündung in heterozygoten VHL2 ko Mäusen..... | 98 |
| 3.2.11 | Generierung von Mäusen mit heterozygotem VHL1 ko | 101 |
| 3.2.12 | Phänotypische Analyse von heterozygoten VHL1 ko-DCs | 102 |
| 3.2.13 | Die Migration von heterozygoten VHL1 ko-DCs unterscheidet sich nicht signifikant von Kontroll-DCs | 103 |
| 3.2.14 | Heterozygote VHL1 ko-DCs weisen kein verändertes T-Zellaktivierungspotential auf | 104 |
| 4 | DISKUSSION | 106 |
| 4.1 | CHEMOTHERAPEUTIKA UND IHRE WIRKUNG AUF DCs..... | 106 |
| 4.1.1 | Der Effekt von TPT auf Phänotyp und Funktion von Mo-DCs..... | 108 |
| 4.1.2 | Der Effekt von GA auf Phänotyp und Funktion von Mo-DCs | 111 |
| 4.1.3 | Zusammenfassung der Effekte von Chemotherapeutika | 115 |
| 4.2 | DIE AUSWIRKUNGEN EINES PARTIELLEN VERLUST VON VHL IN BM-DCs | 117 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 123 |
| 6 | ABSTRACT | 125 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 126 |
| 8 | ANHANG | 146 |
| 8.1 | DANKSAGUNG | 146 |
| 8.2 | LEBENS LAUF | 147 |
| 8.3 | VERÖFFENTLICHUNGEN | 149 |
| 8.4 | ERKLÄRUNG..... | 156 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1 VEC-Komplex unter Normoxie und Hypoxie | 6 |
| Abbildung 1.2 Das Resultat einer Cre/lox-Rekombination wird durch die Orientierung und Position der loxP-Sequenzen bestimmt. | 9 |
| Abbildung 1.3 Subpopulationen von DCs | 11 |
| Abbildung 3.1 Die Viabilität von immortalisierten Zelllinien wird durch TPT beeinträchtigt. | 58 |
| Abbildung 3.2 Die Proliferation von HEK293T und IGROV1 wird durch die Behandlung mit TPT vermindert. | 59 |
| Abbildung 3.3 Die Viabilität von immortalisierten Zelllinien wird durch GA beeinträchtigt. | 60 |
| Abbildung 3.4 Die Proliferation von HEK293T und IGROV1 wird durch die Behandlung mit GA vermindert. | 61 |
| Abbildung 3.5 Die Viabilität der T-Zellen wird durch TPT bzw. GA nicht beeinflusst. | 62 |
| Abbildung 3.6 Die Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen wird durch TPT bzw. GA herabgesetzt. | 63 |
| Abbildung 3.7 Zytotoxische Effekte von TPT auf humane DCs. | 64 |
| Abbildung 3.8 Die Maturierung von DCs mit dem Reifungscocktail bedingt eine Erhöhung der Expression distinkter Oberflächenmarker. | 66 |
| Abbildung 3.9 TPT und GA beeinflussen den Phänotyp von Mo-DCs. | 67 |
| Abbildung 3.10 Die Behandlung von Mo-DCs mit TPT hat einen differenziellen Einfluss auf deren Zytokinprofil. | 68 |
| Abbildung 3.11 GA vermindert nicht signifikant die Zytokinproduktion von stimulierten Mo-DCs. | 69 |
| Abbildung 3.12 TPT beeinflusst die Fascin-Expression sowie das Migrationsverhalten Mo-DCs. | 70 |
| Abbildung 3.13 Die Behandlung mit GA reduziert die Fascin-Expression humaner stimulierter DCs, sowie das Migrationsverhalten beider DC-Populationen. | 71 |
| Abbildung 3.14 Die Behandlung mit TPT bzw. GA beeinträchtigt die endozytische Fähigkeit von Mo-DCs. | 73 |
| Abbildung 3.15 TPT erhöht das T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter humaner DCs, aber verringert die stimulierungsabhängige funktionale Aktivierung humaner T-Zellen. | 74 |
| Abbildung 3.16 Eine Behandlung von DCs mit TPT beeinflusst die Polarisierung von CD4 ⁺ T-Zellen. | 75 |
| Abbildung 3.17 Die Behandlung von Mo-DCs mit GA hat keinen signifikanten Einfluss auf die Polarisierung der CD4 ⁺ T-Zellen. | 76 |
| Abbildung 3.18 Der Einfluss von TPT auf die Signaltransduktionskaskaden in Mo-DCs. | 78 |
| Abbildung 3.19 Der Einfluss von TPT auf die Translokation von RelB in den Nukleus. | 79 |
| Abbildung 3.20 Der Einfluss von GA auf Signaltransduktionskaskaden in humanen DCs. | 80 |
| Abbildung 3.21 Schematische Darstellung des VHL2 ^{fl/fl} und VHL2 ^{wt/ko} | 83 |
| Abbildung 3.22 Kreuzungsschema zur Generierung von VHL2 ^{wt/ko} Mäusen. | 84 |
| Abbildung 3.23 Nachweis des VHL2 ^{wt/ko} | 85 |
| Abbildung 3.24 Frequenz von DCs, Makrophagen und B-Zellen. | 85 |
| Abbildung 3.25 Frequenz der verschiedenen T-Zell-Populationen. | 86 |
| Abbildung 3.26 Frequenz der MDSCs und NK-Zellen. | 87 |
| Abbildung 3.27 Proliferation von T-Zellen aus heterozygoten VHL2 ko Mäusen. | 88 |
| Abbildung 3.28 Die Ausreifung von BM-DCs mit LPS bedingt eine Erhöhung der Expression distinkter Oberflächenmarker. | 89 |
| Abbildung 3.29 Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle und MHCII von heterozygoten VHL2 ko-DCs. | 90 |
| Abbildung 3.30 Der partielle Verlust von VHL2 in BM-DCs besitzt keinen distinkten Einfluss auf die Endozytose-Kapazität. | 91 |
| Abbildung 3.31 Der partielle Verlust von VHL2 vermindert die Migration der BM-DCs in vivo. | 93 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3.32 Heterozygote VHL2 ko-DCs zeigen kein verändertes allogenenes T-Zell-Stimulierungspotential im Vergleich zu Kontroll-DCs..... | 94 |
| Abbildung 3.33 BALB/cJ T-Zellen, die mit VHL2 ^{wt/ko} -DCs kokultiviert wurden, sekretieren tendenziell vermehrt IL-5 und IL-10. | 95 |
| Abbildung 3.34 Die antigenspezifische Proliferation von OT-I T-Zellen..... | 97 |
| Abbildung 3.35 Die antigenspezifische Proliferation von OT-II T-Zellen..... | 98 |
| Abbildung 3.36 Messung des Atemwegswiderstandes nach Sensibilisierung und Provokation mit dem Modellantigen OVA..... | 99 |
| Abbildung 3.37 Einfluss des partiellen VHL2 ko auf die OVA-spezifische Ig-Produktion nach Sensibilisierung mit OVA. | 100 |
| Abbildung 3.38 Kreuzungsschema zur Generierung von heterozygoten VHL1 ko Mäusen. | 101 |
| Abbildung 3.39 Nachweis des heterozygoten VHL1 ko..... | 102 |
| Abbildung 3.40 Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle und MHCII von heterozygoten VHL1 ko-DCs. | 103 |
| Abbildung 3.41 Der partielle Verlust von VHL hat keinen signifikanten Einfluss auf die Migration in vivo. | 104 |
| Abbildung 3.42 Der heterozygote ko von VHL Exon 1 beeinflusst das T-Zellaktivierungspotential von BM-DCs bei hohen DC/T-Zell-Verhältnissen. | 105 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1.1 HIF-Inhibitoren..... | 3 |
| Tab. 1.2 Klinische und molekulare Klassifizierung des VHL-Syndroms..... | 8 |
| Tab. 2.1 In der Arbeit verwendete Geräte..... | 18 |
| Tab. 2.2 In der Arbeit verwendete Materialien | 20 |
| Tab. 2.3 In der Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien..... | 21 |
| Tab. 2.4 In der Arbeit verwendete allgemeine Enzyme | 23 |
| Tab. 2.5 In der Arbeit verwendete Proteine und Peptide | 23 |
| Tab. 2.6 Primäre Antikörper, die für die FACS-Färbung der murinen Zellen verwendet wurden. | 24 |
| Tab. 2.7 Primäre Antikörper, die für die FACS-Färbung der humanen Zellen verwendet wurden. | 25 |
| Tab. 2.8 Fluorochrom-konjugierter Sekundäntikörper | 25 |
| Tab. 2.9 Kontrollantikörper zur Überprüfung der unspezifischen Bindung des spezifischen Primäntikörpers | 25 |
| Tab. 2.10 Primäntikörper (<i>Capture</i> -Antikörper) zum „Fangen“ von murinen Zielproteinen..... | 26 |
| Tab. 2.11 Sekundäntikörper zur Detektion von murinen Zielproteinen | 26 |
| Tab. 2.12 Antikörper für Immunglobulin-ELISA | 27 |
| Tab. 2.13 Reagenzien zur Überprüfung der Endozytose-Aktivität | 27 |
| Tab. 2.14 Antikörper, die in Proliferationsexperimenten eingesetzt wurden | 27 |
| Tab. 2.15 Primäntikörper zur Detektion der Zielproteine | 28 |
| Tab. 2.16 Phosphorylierte Primäntikörper zur Detektion der Zielproteine | 28 |
| Tab. 2.17 Ladekontrollen zum Nachweis der aufgetragenen Proteinmengen | 28 |
| Tab. 2.18 Sekundäntikörper zur Detektion der Immunoblot-Primäntikörper..... | 28 |
| Tab. 2.19 Zytokine, die zu den Kulturmedien zugegeben wurden..... | 29 |
| Tab. 2.20 Zytokine, die im ELISA zur Konzentrationsbestimmung als Standard mitgeführt wurden | 29 |
| Tab. 2.21 In der Arbeit verwendete Fertigsysteme | 30 |
| Tab. 2.22 In der Arbeit verwendete Oligonukleotide zur Typisierung der Mäuse..... | 30 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| 17-AAG | 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin |
| 17-DMAG | 17-Dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycin |
| ³ HTdR | ³ H-Thymidin |
| AKT | Proteinkinase B |
| APC | Allophycocyanin |
| APC | <i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle |
| ARNT | aryl hydrocarbon nuclear translocator |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAL | bronchoalveoläre Lavage |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma-2</i> |
| bHLH-PAS | <i>basic helix-loop-helix-Per-ARNT-SIM</i> |
| BM-DCs | <i>bone marrow derived DCs</i> , knochenmarkabgeleitete DCs |
| bp | Basenpaar |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bspw | beispielsweise |
| CARD9 | <i>caspase recruitment domain-containing protein 9</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CDP | <i>common DC progenitor</i> |
| CK | Casein Kinase |
| CLP | <i>common lymphoid progenitors</i> , lymphoide Vorläuferzellen |
| CMP | <i>common myeloid progenitors</i> , myeloide Vorläuferzellen |
| Cre | <i>causes recombination</i> |
| C-TAD | C-terminale Transaktivierungsdomäne |
| CTL | <i>cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxische T-Zelle |
| Cul | Cullin |
| DAMPs | <i>damage-associated molecular pattern</i> |
| DC | <i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate, Nukleotide |
| Dre | <i>DNA recombination</i> |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| EPO | Erythropoetin |
| ERK | <i>extracellular signal-regulated kinases</i> |
| ES | Embryonale Stammzellen |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> |
| Fc | <i>fragment crystallisable</i> |
| FcR | Fc-Rezeptor |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum |
| Fe | Eisen |
| FIH | <i>factor inhibiting HIF</i> |

| | |
|--------|--|
| FITC | Fluoreszin-Isothiocyanat |
| fl | <i>floxed = flanked by loxP</i> |
| FL | Fluoreszenzkanal |
| Flp | Flippase |
| FRT | <i>Flp recognition target</i> |
| g | Erdbeschleunigung |
| GA | Geldanamycin |
| GLUT | Glukosetransporter |
| GM-CSF | <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor |
| GSK3 | Glykogensynthase-Kinase 3 |
| HIF | Hypoxie-induzierbarer Faktor |
| HLA-DR | humanes Leukozyten-Antigen-DR |
| HMGB1 | <i>high mobility group box 1</i> |
| HRE | <i>hypoxia-response elements</i> , Hypoxie-responsive Elemente |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase |
| HSC | <i>haematopoietic stem cells</i> , hämatopoetischen Stammzellen |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IKK | I κ B-Kinase |
| IL | Interleukin |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| k | kilo |
| kDa | Kilodalton |
| ko | <i>knockout</i> |
| Ktr | Kontrolle |
| l | Liter |
| Lck | <i>lymphocyte protein tyrosine kinase</i> |
| loxP | <i>locus over x-ing over P1</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | <i>magnetic activated cell sorting</i> |
| MAPK | <i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MDM2 | <i>mouse double minute 2 homolog</i> |
| MDP | <i>macrophage DC progenitor</i> |
| MDSC | <i>myeloid-derived suppressor cells</i> |
| MEM | <i>Minimum Essential Media</i> |
| Met | Methionin |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex |
| MICA | <i>MHCI-related chain A</i> |
| min | Minute |
| MIP-2 | <i>macrophage inflammatory protein-2</i> |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |

| | |
|----------------|--|
| Mo-DCs | <i>monocyte derived-DCs</i> , monozytenabgeleitete DCs |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form |
| nd | nicht detektierbar |
| NEDD8 | <i>neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8</i> |
| NF- κ B | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B</i> |
| NIK | <i>NF-κB inducing kinase</i> |
| NK | natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| N-TAD | N-terminale Transaktivierungsdomäne |
| ODDD | <i>oxygen dependent degradation domain</i> |
| OVA | Ovalbumin |
| PAC | <i>P1 artificial chromosome</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAMPs | Pathogen-assoziierten molekularen Muster |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleären Blutzellen |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PE-Cy5 | Phycoerythrin-Cyanin 5 |
| Pen | Penicillin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein |
| PGE | Prostaglandin E |
| PGK | Phosphoglyzeratkinase |
| PHD | Prolylhydroxylasen |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-kinase |
| Pro | Prolin |
| PRRs | <i>pattern recognition receptors</i> |
| Rbx | Ring-Box |
| RCC | <i>renal cell carcinoma</i> , Nierenzellkarzinome |
| RIP-1 | receptor-interacting protein 1 |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SAPK | <i>stress activated protein kinase</i> , Stress-aktivierte Proteinkinase |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat |
| Strep | Streptomycin |
| TC | T-Zelle |
| TGF- β | <i>transforming growth factor-β</i> |
| Th | T-Helferzelle |
| TLR | <i>Toll-like-Rezeptor</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Top I | Topoisomerase I |
| TPT | Topotecan |
| TRAIL | <i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i> |

| | |
|------|--|
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |
| UE | Untereinheit |
| UpM | Umdrehung pro Minute |
| UTR | <i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich |
| V | Volt |
| VEC | VHL, Elongin B, Elongin C, Cullin-2 |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| VHL | von Hippel-Lindau |
| wt | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentralnervensystem |

1 Einleitung

1.1 Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)

Sauerstoff ist von größter Bedeutung für fast alle Lebewesen. Aus diesem Grund haben eukaryotische Organismen Mechanismen entwickelt, die ihnen die Möglichkeit geben, sich an unterschiedliche Sauerstoffverhältnisse, wie zum Beispiel Hypoxie anzupassen¹. Bei der Aufrechterhaltung des Sauerstoffgleichgewichtes spielt der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) eine essentielle Rolle. HIF reguliert eine Vielzahl von Genen, die in die Regulierung des Energiemetabolismus, der Angiogenese, der Erythropoese, der pH-Homöostase und des Zellüberlebens involviert sind².

HIF ist ein Heterodimer, das sich aus einer Sauerstoff-abhängig regulierten α -Untereinheit (HIF- α) und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (HIF- β) zusammensetzt^{3,4}. HIF- β ist auch bekannt als *aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT), da es ursprünglich als Bindungspartner des Arylhydrocarbon-Rezeptors identifiziert wurde⁵. Beide Untereinheiten gehören zu der *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-SIM* (bHLH-PAS) Proteinfamilie⁶. Insgesamt drei Gene kodieren für die verschiedenen HIF- α Isoformen: *HIF1A* codiert für HIF-1 α ⁷, *endothelial PAS 1 (EPAS1)* codiert für HIF-2 α ^{8,9} und *HIF3A* codiert für HIF-3 α ¹⁰. Durch alternatives Spleißen können von HIF-3 α sechs verschiedene Varianten auftreten¹⁰. HIF-1 α , HIF-2 α und die Spleißvarianten 1-3 von HIF-3 α besitzen eine *oxygen-dependent degradation domain* (ODDD) und eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (N-TAD)^{3,10-12}. Zusätzlich weisen HIF-1 α und HIF-2 α eine C-terminale TAD (C-TAD) auf⁴. Da HIF- β konstitutiv exprimiert wird, ist die Menge an HIF- β -mRNA und -Protein unabhängig vom Sauerstoffangebot in der Zelle weitgehend konstant¹³. Die Transkription und Protein-Synthese von HIF- α ist ebenfalls konstitutiv, aber im Gegensatz zu HIF- β wird das HIF- α -Protein sauerstoffabhängig reguliert^{6,13}.

Unter Normoxie wird de novo synthetisiertes HIF- α rapide an konservierten Prolinresten (Pro402, Pro564), die innerhalb der ODDD lokalisiert sind, durch Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert¹⁴⁻¹⁶. Neben Fe^{2+} benötigen PHDs Sauerstoff als essentielles Kosubstrat, weshalb sie als Sauerstoffsensoren der Zelle gelten^{16,17}. Hydroxyliertes HIF- α wird durch die β -Untereinheit des von-Hippel-Lindau-(VHL)-Proteins erkannt und durch den VHL/ElonginBC/Cul2-Ubiquitin-Ligase-Komplex ubiquitinyliert^{18,19}. Die Ubiquitinylierung von HIF- α führt zu dessen proteasomalem Abbau durch das 26S-Proteasom^{18,19}. Ein weiterer Mechanismus, über den HIF- α negativ reguliert wird, ist die Modulierung der N-TAD und C-TAD: In Anwesenheit von Sauerstoff wird ein Asparaginrest (Asn803) in der C-TAD durch den *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1) hydroxyliert²⁰. FIH-1 verhindert dadurch die Interaktion von

HIF mit seinen transkriptionalen Koaktivatoren²⁰. FIH-1 ist eine 2-Oxoglutarat-Dioxygenase, die Fe^{2+} , Ascorbat und Sauerstoff als Kosubstrate benötigt²⁰.

Unter Hypoxie entgeht HIF- α der proteasomalen Degradation, transloziert in den Nukleus und dimerisiert mit HIF- β ²¹. Weiterhin wird in Abwesenheit von Sauerstoff die Hydroxylierung des Asparaginrests von HIF- α durch FIH-1 verhindert. Dadurch kann HIF mit den Koaktivatoren *Creb-binding protein* (CBP)/p300 interagieren²². Dieser Transkriptionsfaktor-Komplex bindet an *hypoxia-response elements* (HREs), die die Konsensussequenz 5'-CGTG-3' enthalten und aktiviert so die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen, die die zelluläre Anpassung an die Sauerstoffverhältnisse regulieren²³.

In vielen verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Tumore oft eine erhöhte HIF-Expression aufweisen^{24,25}. Die Überexpression von HIF-1 in Tumorzellen basiert hauptsächlich auf dem geringen Sauerstoffangebot in der Tumorumgebung, hervorgerufen durch eine hohe Proliferationsrate der Tumorzellen, ein unkontrolliertes Tumorstadium, einen gesteigerten Metabolismus und die vergleichsweise große Entfernung zu Blutgefäßen^{26,27}. Neben der HIF-Stabilisierung durch Hypoxie gibt es noch eine Reihe weiterer Mechanismen, die in einer erhöhten HIF-1 Expression in Tumoren resultieren. Dazu gehören reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die die proteasomale Degradation von HIF-1 verhindern^{28,29}. Ebenso führt eine Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)- sowie des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweges in Tumorzellen zu einer Aktivierung von HIF-1^{30,31}. Genetische und epigenetische Veränderungen, die entweder zu einer Hyperaktivierung von Onkogenen oder einem Funktionsverlust von Tumorsuppressoren führen, gelten ebenfalls als Ursachen einer erhöhten HIF-Expression³².

HIF-1 besitzt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression von vielen bekannten Tumoren, dessen Expressionsniveau mit einer erhöhten Expression zellulärer Überlebensfaktoren korreliert. Daher ist HIF ein interessantes Ziel in der Tumorthherapie³⁰.

1.2 HIF als Angriffspunkt von Chemotherapeutika

Hypoxie verstärkt die Chemoresistenz von Tumorzellen und fördert dadurch die Tumorstadium^{33,34}. Der veränderten Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika liegen vielfältige Mechanismen zugrunde. Zum Beispiel benötigen einige Chemotherapeutika Sauerstoff, um Sauerstoffradikale zu bilden, die die Zytotoxizität des Agens erhöhen³⁵. Aufgrund der verminderten bzw. fehlenden Vaskularisierung sind die hypoxischen Bereiche des Tumors schlechter zugänglich für Therapeutika^{33,36}. Außerdem werden durch Hypoxie zahlreiche zelluläre Anpassungen wie zum Beispiel die Umstellung des Stoffwechsels induziert, die den Wirkungsgrad der Agenzien herabsetzen^{35,36}. Die

hypoxieabhängige Resistenz von Tumoren gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie ist mit einer vermehrten HIF-1 Expression assoziiert³⁵. Daher sind HIF-Inhibitoren ein vielversprechender Ansatz, um einerseits den Tumor direkt abzutöten, und um andererseits die Effizienz von Antitumorthérapien zu verbessern. HIF-Inhibitoren unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrem Wirkungsansatz, da sie entweder die mRNA-Expression, die Proteintranslation, Proteindegradation, DNA-Bindung und/oder die Transkriptionsaktivität von HIF modulieren (Tab. 1.1)³⁷.

Tab. 1.1 HIF-Inhibitoren

| Agens | Mechanismus | Referenz |
|---------------------------------------|--|-----------------|
| Hitzeschockprotein (HSP) 90 Inhibitor | | |
| Radiciol | HIF-1 α Proteindegradation | 38,39 |
| KF58333 | | |
| Geldanamycin (GA) | | |
| Topoisomerase Inhibitor | | |
| Topotecan (TPT) | HIF-1 α Proteintranslation | 40,41 |
| GL331 | | |
| Mikrotubuli-interferierend | | |
| Taxol | HIF-1 α Proteintranslation | 42,43 |
| 2-Methoxyöstradiol | | |
| PI3K-Signalweg Inhibitor | | |
| LY294002 | HIF-1 α Proteintranslation | 44,45 |
| Wortmannin | | |
| Rapamycin | | |
| Antibiotika | | |
| Echinomycin | HIF-1 DNA-Bindung | 46,47 |
| Anthracycline | | |
| Proteasom Inhibitor | | |
| Bortezomib | HIF-1 α Transkriptionsaktivität | 48 |

Topotecan (TPT) wurde als eines der ersten Agenzien beschrieben, die die HIF-1 α -Proteintranslation beeinflussen⁴⁹. TPT ist ein Camptothecin-Analogon, das die Topoisomerase I (TopI) inhibiert⁵⁰. TopI nimmt eine wichtige Funktion bei der DNA-Replikation ein. Im physiologischen Zustand liegt die DNA-Helix *supercoiled* vor und ist zusammen mit spezifischen Proteinen in Chromatin organisiert. Die Replikation kann jedoch nur an einer entwundenen DNA erfolgen. Eine Folge der DNA-Entspiralisierung sind Torsionsspannungen. Um den Torsionskräften entgegenzuwirken, verursacht TopI Einzelstrangbrüche, die nach vollendeter Replikation wieder verschlossen werden. TPT

bindet an TopI und stabilisiert den sogenannten TopI-DNA-*cleavable complex*⁵⁰. TPT inhibiert dabei die Religation des Einzelstrangs. Die Kollision der Replikationsgabel mit dem TPT/TopI-DNA *cleavable complex* resultiert in irreversiblen DNA-Doppelstrangbrüchen, die zu einem Stopp der Zellteilung und letztendlich zum Zelltod führen^{50,51}. Rapisarda et al.⁴⁰ konnten zeigen, dass die HIF-1 α Degradation durch die Wirkungsweise von TPT unbeeinflusst bleibt. Stattdessen wird die Translation von HIF-1 α negativ reguliert und somit eine Akkumulation von HIF-1 α -Protein in der Zelle verhindert. Welche Mediatoren dabei eine Rolle spielen, ist bis dato nicht geklärt⁴⁰.

Geldanamycin (GA) war das erste benzochinoide Ansamycin, das aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde⁵². Die Antitumorwirkung von GA besteht in der Inhibierung der Chaperon-Funktion des Hitzeschockproteins (HSP)90. Das ubiquitär exprimierte, hoch konservierte, 90kDa große HSP90 reguliert die Anpassung auf zellulären Stress indem es die Konformation, Stabilität und Funktion seiner Klienten-Proteine aufrecht erhält⁵³. Im Vergleich zu normalen Zellen weisen Tumorzellen eine erhöhte HSP90-Expression auf⁵⁴. Dies korreliert mit einer gesteigerten HIF-Expression. Minet et al.⁵⁵ konnten zeigen, dass unter Normoxie HSP90 an HIF bindet und unter Hypoxie die Aktivierung von HIF positiv reguliert. Die Wirkungsweise von GA besteht darin, dass es an die N-terminale ATPase Domäne von HSP90 bindet⁵⁶. Durch die Interaktion von GA und HSP90 wird die ATP-Aktivität des letzteren gehemmt und es kann kein funktioneller maturer HSP90/Klienten-Protein-Komplex entstehen⁵⁴. Als Konsequenz werden die entlassenen Proteine ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert⁵⁷.

TPT wird in der Tumorthherapie oft als *second line* Chemotherapeutikum eingesetzt, wenn das erste Präparat (*first line*) nicht zu einem entsprechenden Erfolg geführt hat^{58,59}. Neben dem Einsatz als Kombipräparat gibt es mittlerweile einige vielversprechende Phase I- und Phase II-Studien, die TPT auch als *first line* Chemotherapeutikum einsetzen⁶⁰⁻⁶². Aufgrund der Instabilität und der hohen Hepatotoxizität von GA⁶³ wurden GA-Analoga wie zum Beispiel 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) und 17-Dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) entwickelt, die in klinischen Studien getestet werden⁶⁴⁻⁶⁷.

1.3 Von Hippel-Lindau-Protein, der physiologische Regulator von HIF

Der Tumorsuppressor *VHL* ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, das auf dem Chromosom 3p25-26 lokalisiert ist⁶⁸. Die genkodierende Sequenz von *VHL* umfasst 712 bp inklusive des 70 bp langen 5' untranslatierten Bereichs (*untranslated region*, UTR) in Exon 1⁶⁹. Nach der Transkription des *VHL*-Gens können durch alternatives Spleißen der prä-mRNA zwei verschiedene mRNA-Isoformen entstehen. Die mRNA der Isoform 1 beinhaltet alle drei Exone des Genlokus und kodiert für ein 30 kDa großes Protein, das 213 Aminosäuren beinhaltet⁷⁰. Bei der Isoform 2 des *VHL*-Gens fehlt das Exon 2. Auf Proteinebene führt der Exon 2-Verlust zu einer Deletion von 41 Aminosäuren innerhalb des Leserasters⁷¹⁻⁷³. Zusätzlich konnten Iliopoulos et al.⁷⁰ eine weitere Isoform von *VHL* detektieren: Diese dritte Isoform entsteht nicht aufgrund von alternativen Spleißvarianten, sondern ist das Ergebnis eines zweiten AUG-Translationsstartpunktes (Met54) im Exon 1. Der 19 kDa großen Isoform 3 (54-213 Aminosäuren) fehlen somit die ersten 53 Aminosäuren, die für eine charakteristische achtfache Wiederholungssequenz (Gly-X-Glu-Glu-X) mit unbekannter Funktion kodieren^{71,74}. *VHL* kann sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern detektiert werden^{68,75,76}. Der Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma wird von einem Exon 2-kodierten Bereich vermittelt, so dass die Isoform 2 aufgrund ihrer Deletion nur im Zellkern lokalisiert ist⁷⁷.

Das Protein *VHL* besteht aus zwei Untereinheiten. Die α -Untereinheit wird von Bereichen aller drei Exons (1-3) kodiert, die die N-terminalen Aminosäuren 63-154 und die C-terminalen Aminosäuren 193-204 umfassen. Die β -Untereinheit des *VHL*-Proteins (Aminosäure 155-172) wird von Exon 3 kodiert. Während die α -Untereinheit essentiell für die Substraterkennung ist, fungiert die β -Untereinheit als Bindungsdomäne für weitere Proteine⁷⁸⁻⁸⁰. *VHL* formt einen Multiproteinkomplex mit Elongin B, Elongin C, Cullin-2 (Cul-2) und Ring-Box 1 (Rbx 1) (Abbildung 1.1)⁸⁰⁻⁸².

Dieser sogenannte VEC-Komplex besitzt eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität⁸³. Der Ubiquitin-vermittelte Proteinabbau ist an einer Vielzahl von Zellfunktionen einschließlich der Kontrolle des Zellzyklus und der Signaltransduktion beteiligt. Die Ubiquitinierung ist ein mehrstufiger Prozess, der mit der Aktivierung von Ubiquitin beginnt. Ubiquitin wird dabei über eine hochenergetische Thioesterbindung an das E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzym gebunden und ATP-abhängig aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird von E1 auf das E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym übertragen. Anschließend wird Ubiquitin durch die E3-Ubiquitin-Ligase auf das spezifische Substrat übertragen. Die ubiquitinierten Proteine werden durch das 26S-Proteasom abgebaut⁸⁴⁻⁸⁶.

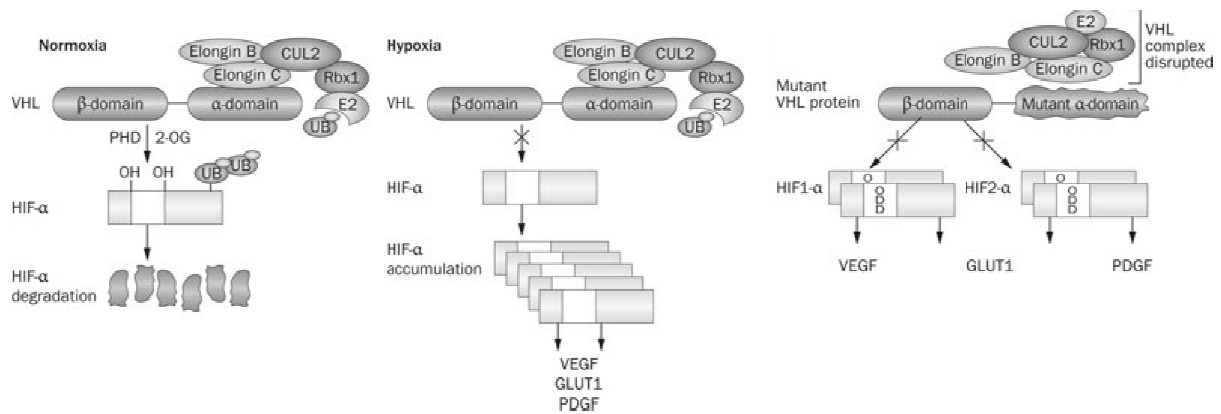


Abbildung 1.1 VEC-Komplex unter Normoxie und Hypoxie

Unter Normoxie formt VHL einen Multiproteinkomplex, bestehend aus Elongin B, Elongin C, Cul2, Rbx1. Dieser sogenannte VEC-Komplex markiert hydroxyliertes HIF- α für die proteasomale Degradation. Unter Hypoxie bzw. wenn VHL mutiert vorliegt, kann HIF- α der Ubiquitinierung durch dem VEC-Komplex und somit dem Abbau durch das Proteasom entgehen. HIF- α kann dann mit HIF-1 β dimerisieren, in den Kern translozieren und die Transkription seiner Zielgene induzieren. Quelle: Linehan et al.⁸⁷.

Innerhalb des VEC-Komplexes bindet VHL zunächst an Elongin C, das wiederum an Elongin B bindet^{81,88,89}. Elongin B und C sind die regulatorischen Untereinheiten des Elongin (SIII)-Komplexes und bewirken zusammen mit der transkriptional aktiven Untereinheit Elongin A eine Steigerung der Elongationseffizienz der RNA-Polymerase II^{89,90}. In Anwesenheit von VHL wird die Interaktion von Elongin A mit Elongin C und B unterbunden und somit der Elongationskomplex inaktiv⁸⁹. Über die Verbindung der Elongine B und C wird VHL mit Cul-2 verbunden. Cul-2 gehört zu der hoch konservierten Cullin-Genfamilie, die an der Regulation des Zellzyklus in *Saccharomyces cerevisiae* und an der Kontrolle des Zellwachstums in *Caenorhabditis elegans* beteiligt ist^{82,91,92}. Cul-2 wird Rbx1-abhängig durch *neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8* (NEDD8) modifiziert^{93,94}. Durch diese Neddylierung wird einerseits die Ligase-Aktivität des VEC-Komplexes gesteigert, und findet andererseits eine verstärkte Rekrutierung des E2-Ubiquitin-Komplexes Ubch5a statt^{93,95}. Die Bindung von Ubch5a an den VEC-Komplex wird durch den neddylierten Cul-2/Rbx1-Komplex vermittelt⁹³.

Das wohl am besten untersuchte Substrat der VHL-vermittelten Ubiquitinierung ist der Transkriptionsfaktor HIF- α . Neben der Vermittlung der HIF-Degradation ist VHL noch an einer Vielzahl weiterer zellulärer Mechanismen beteiligt. Eine dieser Funktionen ist die Beteiligung von VHL an der Regulation der Apoptose. Roe et al.⁹⁶ zeigen in ihrer Arbeit, dass VHL die Aktivität des Tumorsuppressors p53, der bei der Apoptose eine kritische Rolle spielt, hochreguliert. VHL interagiert dabei direkt mit p53 und stabilisiert es durch Suppression der *mouse double minute 2 homolog* (Mdm-2)-vermittelten Ubiquitinierung. Desweiteren begünstigt VHL indirekt die NF- κ B-Aktivität, in dem es die Casein-Kinase 2 bindet und so die Phosphorylierung des NF- κ B-Agonisten Card9 fördert⁹⁷. Durch die Bindung und

Stabilisierung von Mikrotubuli reguliert VHL sowohl die Ausbildung des Zytoskeletts als auch die Ausrichtung der Mitosespindel^{98,99}. VHL ist bspw. auch an der Formation der extrazellulären Matrix beteiligt, in dem es Fibronectin und hydroxyliertes Kollagen IV $\alpha 2$ bindet und so den korrekten Einbau der beiden Moleküle in die extrazelluläre Matrix ermöglicht^{100–102}.

1.4 VHL-Syndrom

Das VHL-Syndrom ist eine autosomal dominant vererbte, systemische Tumorerkrankung⁶⁸. Namensgeber der Erkrankung sind Eugen von Hippel und Arvid Lindau, die Anfang des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal Hämangiome im Auge bzw. im Kleinhirn und Rückenmark beschrieben^{103,104}. Latif et al.⁶⁸ konnten später das krankheitsassoziierte Tumorsuppressorgen *VHL* identifizieren. Die Inzidenz des VHL-Syndroms beträgt 1:36.000 und erreicht im Alter von 60 Jahren eine fast vollständige Penetranz (95%)¹⁰⁵. Die mittlere Lebenserwartung von Patienten mit VHL-Syndrom ist auf 49 Jahre reduziert⁶⁸. VHL-Patienten besitzen eine Prädisposition für Hämangioblastome der Retina und des Zentralnervensystems (ZNS), Phäochromozytome, klarzellige Nierenkarzinome, neuroendokrine Pankreastumore, Tumore des *Saccus endolymphaticus*, benigne Nieren- bzw. Pankreaszysten⁶⁹. Mittels Genotyp-Phänotyp-Korrelationen kann das VHL-Syndrom in zwei verschiedene klinische Subtypen unterteilt werden, basierend auf der Abwesenheit (Typ 1) bzw. Anwesenheit (Typ 2) von Phäochromozytomen¹⁰⁶ (siehe Tab. 1.2). VHL Typ 2 kann noch weiter in drei Subkategorien (2A, 2B, 2C) unterteilt werden¹⁰⁷. VHL Typ 2A ist mit einem geringen Risiko für Nierenzellkarzinome assoziiert. VHL Typ 2B besitzt ein erhöhtes Risiko für Nierenkrebs und VHL Typ 2C ist durch das Auftreten von Phäochromozytome charakterisiert. Für die Entstehung des VHL-Syndroms sind häufig umfangreiche genomische Deletionen, die entweder ein oder mehrere Exone umfassen, oder Mutationen (*nonsense*, *frameshift insertion/deletion*, *missense*) des *VHL*-Gens verantwortlich¹⁰⁶. VHL Typ 1 des VHL-Syndroms ist durch eine vollständige oder partielle Deletion oder durch *nonsense* Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des VHL-Proteins führen, gekennzeichnet¹⁰⁸. Im Gegensatz dazu ist VHL Typ 2 mit *missense* Mutationen assoziiert, die zu einem Protein mit limitierter Aktivität führen¹⁰⁸. Einige *missense* Mutationen können aber auch in einem VHL Typ 1 Phänotyp resultieren, da sie die Proteinfaltung von VHL verändern und somit die Struktur und Funktion des Proteins unterbinden.

Tab. 1.2 Klinische und molekulare Klassifizierung des VHL-Syndroms¹⁰⁹

| VHL Subtyp | Tumorrisiko Nierenzellkarzinom | Tumorrisiko Hämangioblastome des ZNS | Tumorrisiko Phäochromozytome | Mutationstyp | HIF-Aktivierung |
|------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---|-----------------------|
| 1 | hoch | hoch | niedrig | vollständige oder partielle Gendeletion <i>nonsense</i> Mutation | hoch |
| 2A | niedrig | hoch | hoch | missense Mutation | hoch |
| 2B | hoch | hoch | hoch | missense Mutation | hoch |
| 2C | niedrig | niedrig | hoch | missense Mutation | niedrig oder abwesend |

1.5 Mausmodell für VHL

Um die Entstehung, Entwicklung und Physiologie von VHL-assoziierten Erkrankungen besser verstehen zu können, wurden zahlreiche Mausmodelle entwickelt die versuchen, die phänotypischen Eigenschaften dieser Erkrankung zu imitieren^{110,111}. Gnarra et al.¹¹² zeigten in ihrer Arbeit, dass Mäuse mit einem homozygoten VHL-Verlust bereits im Embryonalstadium (E10.5 - E12.5) aufgrund vaskulärer Anomalien der Plazenta sterben. Um dieser embryonalen Letalität zu entgehen, wurden Mausmodelle entwickelt, die entweder eine heterozygote *VHL*-Deletion oder einen gewebespezifischen Verlust von *VHL* aufweisen. Die bedeutendsten Werkzeuge für die Generierung von zell- oder gewebespezifischen *knockouts* (ko) sind sequenzspezifische Rekombinationssysteme: das *Flippase* (Flp)/*Flp recognition target* (Flp/FRT)-System aus *Saccharomyces cerevisiae*^{113–115}, das *DNA recombination* (Dre)/*region of x-over* (rox) aus dem D6-Phagen¹¹⁶ sowie das *causes recombination* (Cre)/*locus of x-ing over P1* (loxP)-System aus dem P1-Phagen^{117,118}. In der vorliegenden Arbeit wurde das Cre/loxP-System verwendet, um einen heterozygoten VHL ko zu erhalten, und dieses soll deshalb näher erläutert werden.

Der Cre/loxP Mechanismus wurde als erstes im P1-Bakteriophagen als Teil des normalen viralen Lebenszyklus entdeckt^{117,119,120}. In diesem Bakteriophagen dient es zur Zirkularisierung des linearen Phagengenoms¹²¹ und zur Auflösung der postreplikativen zirkulären Genomdimere in Monomere für eine korrekte Teilung¹²². Cre ist eine sequenzspezifische Rekombinase der Integrase-Familie¹²³. Das Enzym katalysiert die Rekombination zwischen den 34 bp langen loxP-Erkennungssequenzen (*sites*)¹¹⁷. Die loxP-Sequenz besteht aus einer acht bp langen, nicht-palindromischen Kernregion, die von zwei 13 bp langen palindromischen Sequenzen (*repeats*) flankiert wird (auch als *floxed* = *flanked by loxP* bezeichnet).¹²⁴ Die Orientierung und Position der loxP-Stellen entscheidet darüber, ob Cre-

vermittelt eine Inversion, chromosomale Translokation oder Deletion des loxP-flankierenden genomischen Abschnitts erfolgt (Abbildung 1.2)¹²⁵. In der vorliegenden Arbeit wurde die Strategie der Cre/lox vermittelten Deletion verwendet.

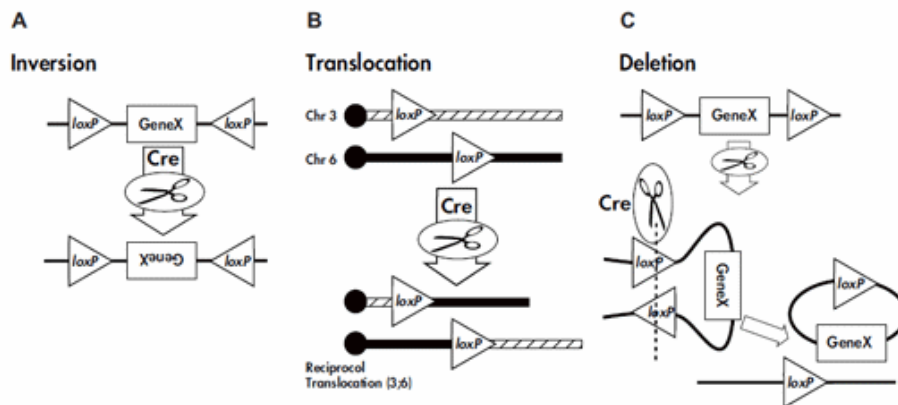


Abbildung 1.2 Das Resultat einer Cre/lox-Rekombination wird durch die Orientierung und Position der loxP-Sequenzen bestimmt.

(A) Liegen die loxP-Stellen in entgegengesetzter Richtung, wird durch die Cre-Rekombination eine Inversion des geflochten Gens herbeigeführt. (B) Wenn die loxP-Stellen auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, kommt es zu einer chromosomalen Translokation. (C) Wenn die loxP-Stellen die gleiche Orientierung auf einem Chromosomenabschnitt besitzen, kommt es zu einer Deletion des geflochten Gens. Modifiziert nach <http://cre.jax.org/introduction.html>

Das grundlegende Prinzip des konditionalen Rekombinationssystems beruht in der Generierung unterschiedlicher Mausstämme, die entweder die Cre- oder die loxP-Sequenzen tragen. Somit sind das Enzym (Cre) und seine Erkennungssequenzen (loxP) strikt voneinander getrennt¹²⁵. Um einen Cre/lox-Stamm zu erzeugen, werden beide Mausstämme miteinander verpaart. Die Cre-exprimierenden Mausstämme, auch Effektorstämme genannt, besitzen meist ein Transgen, das Cre unter der Kontrolle eines entweder ubiquitären oder gewebespezifischen (konditionalen) Promotors exprimiert¹²⁶. Es gibt aber auch induzierbare Cre-Mausstämme, bei denen Cre erst aktiv wird, wenn der Maus ein promotorinduzierendes Agens (bspw. Doxycyclin, Tamoxifen) verabreicht wird^{127–130}. Mit dieser Strategie kann der Zeitpunkt der Rekombination individuell bestimmt werden¹²⁶.

Neben verschiedenen Studien, in denen Mausmodelle charakterisiert wurden, die das Krankheitsbild des VHL-Syndroms widerspiegeln sollen^{131,132}, gibt es auch eine Vielzahl an Untersuchungen, bei denen der VHL-Verlust in einem spezifischen Gewebe oder Zelltyp analysiert wurde^{133–135}. Welche Rolle VHL im Immunsystem spielt, ist jedoch bisher kaum erforscht¹³³. Biju et al.¹³⁶ generierten ein Mausmodell mit einer Thymozyten-spezifischen

Inaktivierung von VHL mittels *lymphocyte protein tyrosine kinase* (Lck)-Cre, die zu einer konstitutiven Transkriptionsaktivität von HIF in Thymozyten führte. Der Thymozyten-spezifische ko von VHL resultierte in einem verkleinerten Thymus aufgrund einer stark reduzierten Anzahl an CD4⁺CD8⁺-Thymozyten, einhergehend mit einer erhöhten Apoptoserate¹³⁶. Während Biju et al. für die Generierung ihres Mausmodells, eine Cre unter der Kontrolle des proximalen *Lck*-Promotors verwendeten, nutzten Doedens et al.¹³⁷ für die Herstellung ihrer VHL-defizienten zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T cells*, CTL) eine Cre, die unter der Kontrolle des distalen Promotors von *Lck* steht. Dadurch wurde eine normale Entwicklung der T-Zellen im Thymus ermöglicht, obgleich die Anzahl der Zellen ebenfalls reduziert war. In ihrer Studie demonstrierten Doedens et al.¹³⁷, dass die Differenzierung von Effektor- und Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen durch den CTL-spezifischen Verlust von VHL modifiziert wurde. Der Verlust von VHL und die damit einhergehende erhöhte HIF-Aktivität modulierte die Expression von entscheidenden Transkriptionsfaktoren (T-bet, TCF-1), Effektormolekülen (Granzyme) und kostimulatorischen Rezeptoren (OX40, GITR), wodurch die terminale CTL-Differenzierung limitiert wurde, was letztendlich in einer gesteigerten CD8⁺ T-Zellimmunität gegenüber persistierenden viralen Infektionen bzw. Tumorstadium resultierte¹³⁷.

Cramer et al.¹³⁸ untersuchten in ihrer Studie neben dem Einfluss einer HIF-1 α -Deletion auf die Funktion von myeloiden Zellen auch den Einfluss eines Verlustes von VHL auf diese Zellen. Für die Herstellung des myeloiden zelltypspezifischen HIF-1 α - und VHL-ko verwendeten die Autoren eine Cre, die unter der Kontrolle des Lysozym M Promotor (*lysMcre*) steht¹³⁸. Der Verlust von VHL in peritonealen Makrophagen führte zu einer gesteigerten mRNA-Expression der HIF-Zielgene *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Phosphoglyzeratkinase (PGK), Glukosetransporter-1 (GLUT-1) sowie einem gesteigerten Laktat-Gehalt im Vergleich zu Kontroll-Makrophagen¹³⁸. Desweiteren konnte in einer Entzündungsreaktion am Modell der Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierten Ohrschwellung gezeigt werden, dass eine Deletion von VHL die Infiltration von Zellen an den Ort der Inflammation fördert, einhergehend mit einer erhöhten Expression des *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) und einer gesteigerten Myeloperoxidase-Aktivität¹³⁸.

1.6 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden vor ca. 40 Jahren von Steinman et al.¹³⁹ zum ersten Mal beschrieben. Bis heute sind DCs Gegenstand vieler Studien und Untersuchungen, um ihre Ontologie und Funktion in der Regulation von Immunantworten zu begreifen.

DCs repräsentieren eine heterogene Immunzell-Population, die anhand von Herkunft, Phänotyp, Lokalisation und Funktion in weitere Subpopulationen unterteilt werden kann (Abbildung 1.3)¹⁴⁰⁻¹⁴². DCs entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark¹⁴³. Nach Verlassen des Knochenmarks wandern DC-Vorläufer in die peripheren Gewebe oder lymphoiden Organe ein oder zirkulieren im Blut¹⁴⁰.

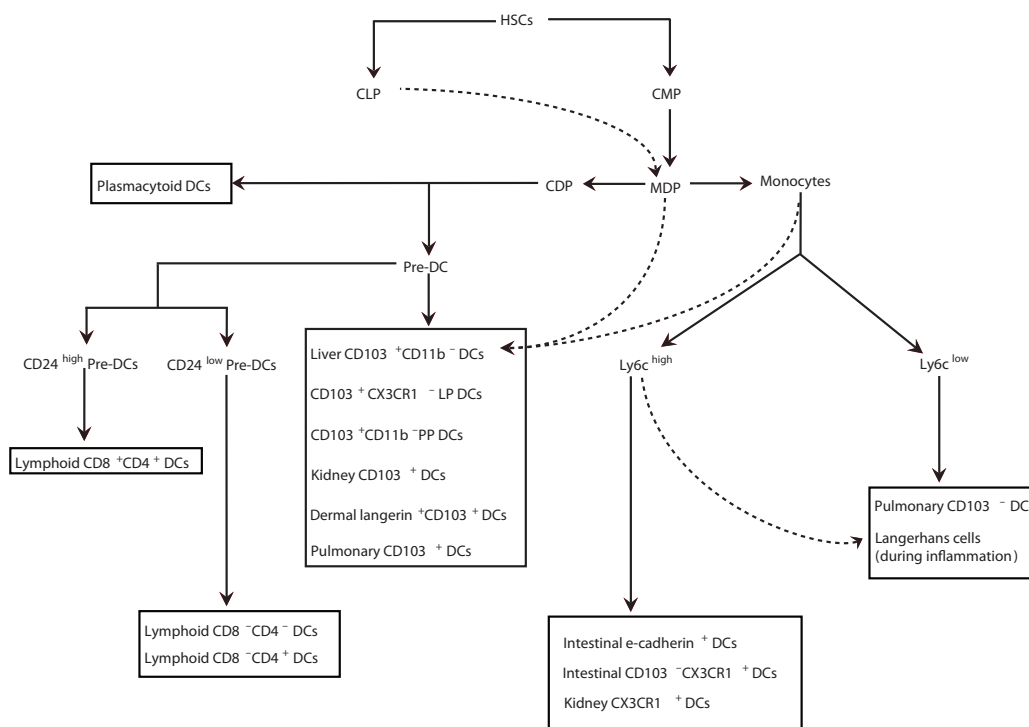


Abbildung 1.3 Subpopulationen von DCs

DCs differenzieren aus hämatopoetischen Stammzellen (*haematopoietic stem cells*, HSCs). HSCs differenzieren weiter zu lymphoiden (*common lymphoid progenitors*, CLP) oder myeloiden (*common myeloid progenitors*, CMP) Vorläuferzellen. CMP entwickeln sich zu Monozyten oder prä-DCs im Knochenmark. Anschließend werden Monozyten und prä-DCs ins Blut entlassen und migrieren zu den lymphoiden Organen bzw. in die peripheren Gewebe ein, wo sie sich zu lymphoiden DCs bzw. gewebe-residenten DCs entwickeln. Zusätzlich können aus CLP ebenso DCs differenzieren. (CDP: *common DC progenitor*, MDP: *macrophage DC progenitor*) Quelle: Modifiziert nach Kushwah et al.¹⁴⁶.

Strategisch im Körper verteilt, fungieren immature DCs als Wächter des Immunsystems, die permanent ihre Umgebung auf die Präsenz von invasiven Pathogenen bzw. auf Schäden des Gewebes überprüfen¹⁴⁴. Pathogene werden von immaturren DCs aufgrund ihrer Pathogen-

assoziierten molekularen Muster (PAMPs) erkannt¹⁴⁵. PAMPs sind Struktur motive die repräsentativ für ein breites Spektrum an Pathogenen sind; dazu gehören beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäure, bakterielle und virale Nukleinsäuren¹⁴⁵. Immature DCs und andere Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen PAMPs mittels Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Zu den wichtigsten und bekanntesten PRRs gehören die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR). TLRs werden von immaturren DCs auf der Oberfläche bzw. endo/lysosomal exprimiert und erkennen rezeptorspezifisch mikrobielle Moleküle, wie zum Beispiel LPS (TLR4), Lipoteichonsäure, Lipoproteine und Peptidoglykane (TLR2), Flagelline (TLR5), bakterielle, unmethylierte CpG DNA (TLR9), doppelsträngige RNA (TLR3), einzelsträngige RNA (TLR7)^{147,148}. Neben Pathogenen sind immature DCs auch in der Lage Gewebeschäden erkennen. Endogene Moleküle, die einen Gewebe- oder Zellschaden signalisieren, werden auch „Alarmine“ oder *damage-associated molecular pattern* (DAMPs) genannt. Dazu gehören zum Beispiel *high mobility group box 1* (HMGB1), S100- und Hitzeschockproteine¹⁴⁵. Nach der Antigen-Aufnahme durch Pinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelter Endozytose kommt es zur Antigen-Prozessierung¹⁴¹. Die entstandenen Peptide werden je nach Herkunft entweder auf Haupthistokompatibilitätskomplexe Klasse I (*major histocompatibility complex*, MHC I) oder Klasse II (MHC II) geladen¹⁴¹. Infolge einer Aktivierung durch die Bindung an PAMPs/DAMPs oder proinflammatorische Mediatoren migrieren DCs zu den sekundären lymphoiden Organen. Dabei durchlaufen DCs einen komplexen Reifungsprozess¹⁴⁹. Zur Metamorphose von einer Antigen-bindenden zu einer Antigen-präsentierenden Zelle (*antigen presenting cell*, APC) gehören die Herunterregulation der Expression von Molekülen für die Antigenerkennung, -aufnahme und -prozessierung, die Aufregulation der Expression der MHC- und kostimulatorischen Moleküle (CD40, CD80, CD86, OX40-Ligand) auf der Zelloberfläche sowie die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen¹⁴². In den sekundären Organen wie Lymphknoten oder Milz präsentieren DCs das prozessierte Antigen T-Zellen, wodurch Antigen-spezifische T-Zellen angesprochen werden^{142,150,151}. Exogene Antigene, die hauptsächlich mikrobiellen Ursprungs sind, werden extrazellulär von DCs aufgenommen und auf MHC II-Moleküle geladen. Wird das extrazelluläre Antigen im Kontext von MHC II-Molekülen präsentiert, kommt es zu einer Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen¹⁵². Endogene Antigene sind entweder körpereigene Proteine oder stammen von virusinfizierten Zellen bzw. Tumorzellen ab. Endogene Antigene werden im Kontext von MHC I-Molekülen präsentiert, die von allen nukleären Körperzellen exprimiert werden, und von CD8⁺ T-Zellen erkannt^{151,153}. Exogene Antigene können auch im Rahmen der Kreuzpräsentation auf MHC I-Molekülen präsentiert werden, was bei der Aktivierung von spezifischen CTL gegen virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen eine zentrale Rolle spielt^{154,155}. Darüber hinaus hat die Kreuzpräsentation bei der Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen eine

große Bedeutung¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Neben der Erkennung des spezifischen Antigen-MHC-Komplexes mittels des T-Zell-Rezeptors (TZR) benötigen T-Zellen noch weitere Signale für eine T-Zell-Aktivierung¹⁴⁰. Diese Signale werden über die Bindung der von DCs exprimierten kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD86, CD40) mit CD28 bzw. CD40-Liganden auf T-Zellen vermittelt¹⁵⁹. Diese Interaktion von DCs mit Antigen-spezifischen T-Zellen führt zur terminalen Ausreifung der DCs, die letztendlich zur Expansion und weiteren Differenzierung von T-Zellen zu T-Effektorzellen, wie zum Beispiel T-Helferzellen (Th-Zellen) oder CTLs führt. Auf diese Weise wird eine adaptive Immunantwort induziert. Darüber hinaus sind DCs in der Lage, durch die Sekretion spezifischer Zytokine (IL-12, IFN- γ) die Differenzierung und Polarisierung von Th-Zellen zu beeinflussen und so die Immunantwort zu modulieren¹⁶⁰.

Murine DCs können *in vitro* aus Knochenmarkszellen differenziert werden (Knochenmark abgeleitete-DCs, *bone marrow derived-DCs*, BM-DCs). Scheicher et al.¹⁶¹ zeigten, dass durch Zugabe des Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF) die Anzahl differenzierter immaturer BM-DCs stark zunimmt. Aus diesem Grund wird zur Generierung von immaturren BM-DCs GM-CSF zu DC-Differenzierungskulturen hinzugefügt. Die Maturierung von DCs kann auf verschiedenste Arten erfolgen, entweder mittels TLR-Liganden (LPS, CpG-Oligonukleotide) oder proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α). In dieser Arbeit wurden immature BM-DCs mittels LPS, einem TLR4-Ligand ausgereift. Humane DCs können *in vitro* aus peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) generiert werden. Die Differenzierung von immaturren DCs aus Monozyten erfolgt durch Zugabe von humanem GM-CSF¹⁶². Zusätzlich wird IL-4 zur humanen DC-Differenzierungskultur zugegeben, um eine Differenzierung zu Makrophagen zu unterbinden¹⁶³. Für die Maturierung der immaturren humanen DCs kann neben den erwähnten TLR-Liganden auch ein Reifungscocktail, bestehend aus IL-1 β , TNF- α und PGE₂ verwendet werden^{164,165}.

1.7 DCs und Tumorthherapie

Während der Tumorentwicklung verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen dem wachsenden Tumor und dem Immunsystem. Dieser Prozess wird *cancer immunoediting* genannt¹⁶⁶. Am Beginn, in der sogenannten Eliminierungsphase (*elimination*), ist das Immunsystem noch imstande, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren¹⁶⁷. Dieser Prozess involviert sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem. Seitens der angeborenen Immunantwort werden verschiedene Effektorzelltypen, wie zum Beispiel natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und NK-T-Zellen durch inflammatorische Zytokine aktiviert, die von wachsenden Tumorzellen, tumorassoziierten Makrophagen und Tumor-umgebenden Stromazellen sekretiert werden¹⁶⁷. Durch die Sekretion der Zytokine werden sowohl weitere NK- und NK-T-Zellen, als auch Makrophagen und DCs rekrutiert, die ihrerseits proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-12 und Interferon (IFN)- γ freisetzen^{168,169}. Durch die Freisetzung von Perforin, Fas-Ligand bzw. *TNF related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) durch NK-Zellen werden Tumorzellen eliminiert und Tumorantigene freigesetzt. Tumorantigene können entweder tumorspezifisch oder tumorassoziiert sein. Tumorspezifische Antigene entstehen durch eine veränderte Genexpression und werden spezifisch nur vom Tumor exprimiert (Neoantigene)^{170,171}. Tumorassoziierte Antigene sind körpereigene Proteine, die jedoch von Tumorzellen überexprimiert werden¹⁷². Tumorantigene und nekrotische bzw. apoptotische Tumorzellen werden von DCs aufgenommen¹⁷³. Durch freigesetzte DAMPs, proinflammatorische Zytokine im Mikromilieu und die Interaktion mit NK-Zellen kommt es zur Aktivierung und Migration der DCs zu den Tumor-drainierenden Lymphknoten^{174,175}. Im Lymphknoten präsentieren DCs prozessierte Tumorantigene naiven CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen, was zu einer Differenzierung und klonalen Expansion von antigenspezifischen Th-Zellen bzw. CTLs führt¹⁶⁷. Anschließend wandern die Tumorantigen-spezifischen T-Effektorzellen zum Tumorareal, wo sie Tumorantigen-exprimierende Tumorzellen eliminieren¹⁷⁶.

Der nächste Schritt im *cancer immunoediting* ist die Phase des Gleichgewichts (*equilibrium*)¹⁶⁶. In dieser Phase kommt es zu einer kontinuierlichen Modellierung der Tumorzellen¹⁶⁷. Das Ergebnis sind Tumorzellen die gegenüber immunologischen Effektorzellen resistent sind. Dieser Prozess führt zu einer Selektion von Tumorzellen, die eine geringere Immunogenität aufweisen und dadurch in ihrer Umgebung überleben und wachsen¹⁶⁶. Somit stellt sich eine immunvermittelte Latenz ein¹⁶⁶. Die Gleichgewichtsphase ist die längste der drei Phasen und kann für Jahre andauern¹⁷⁷.

In der letzten Phase (*escape*) werden aufgrund von Veränderungen der Signaltransduktionsmoleküle der Effektorzellen wie zum Beispiel der Verlust der CD3- ζ Kette aufgrund von erhöhter Ubiquitinierungsaktivität und der damit einhergehenden Degradation in Lysosomen,

und somit letztendlich auch der Verlust des TZR Tumorantigene nicht mehr erkannt¹⁷⁸. Der Verlust der CD3- ζ Kette ist mit einer erhöhten Expression von IL-10 und *transforming growth factor*- β (TGF- β) und einer Herunterregulation der IFN- γ -Expression assoziiert, was die Immunevasion zusätzlich begünstigt¹⁶⁷. Darüber hinaus haben Tumorzellen weitere Strategien entwickelt, um der Immunüberwachung zu entkommen¹⁷⁷. Eine Vielzahl an tumorabgeleiteten Faktoren trägt zu der Ausbildung eines komplexen lokalen und regionalen immunsuppressiven Netzwerks bei. Zu diesen Faktoren gehören beispielsweise *vascular endothelial growth factor* (VEGF), IL-10, TGF- β , Prostaglandin E₂ (PGE₂), lösliches Fas und Fas-Ligand und lösliches *MHCI-related chain A* (MICA)¹⁷⁹. Obwohl diese Faktoren primär in der Tumorregion wirken, können sich ihre immunsuppressiven Effekte bis zu den lokalen Lymphknoten und der Milz ausbreiten und dadurch die Metastasierung der Tumorzellen begünstigen¹⁷⁹. Die Sekretion von Faktoren durch Tumorzellen bewirkt eine Inhibition der DC-Differenzierung und -Maturierung und hat eine Ausbildung von *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs) zur Folge^{180,181}. MDSCs können direkt die Tumorgenese, das Tumorstadium und die Metastasierung fördern, indem sie die Angiogenese steigern und die Aktivität von T-Zellen hemmen¹⁸². Darüber hinaus können tumorabgeleitete Faktoren auch bereits differenzierte DCs beeinflussen, die dadurch in einem protolerogenen Status arrestieren^{180,183}. Insgesamt können diese verschiedenen Zellpopulationen (semi-mature, protolerogene DCs/MDSCs) einerseits die Aktivierung von T-Zellen inhibieren, aber auch die Ausreifung anderer DCs¹⁸⁴. Desweiteren können immature DCs durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β regulatorische T-Zellen (Tregs) induzieren, die wiederum zusätzlich die T-Zell-Aktivierung hemmen¹⁸⁵. Diese immunsupprimierenden Effekte führen letztendlich zur Ausbildung einer Tumortoleranz. Die durch den Tumor hervorgerufene Immuntoleranz verhindert eine Abstoßung des Tumors durch das Immunsystem und die Effizienz einer Immuntherapie¹⁸⁶. Metastasierende Tumore werden radio- und chemotherapeutisch behandelt¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Chemotherapeutika können durch ihre zytotoxische Wirkung und antiproliferativen Effekte Tumorzellen direkt eliminieren und somit eine Regression des Tumors bewirken¹⁸⁸. Aufgrund ihrer Wirkungsweise auf hämatopoetische Zellen werden Antitumor-Agenzien traditionell oft als Immunsuppressoren beschrieben¹⁹⁰. Beispielsweise führte eine Behandlung von DCs mit dem Antitumor-Agens Sorafenib, einem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, der bei der Behandlung gegen Nierenzellkarzinome eingesetzt wird, sowohl zu einer Inhibition der DC-Maturierung, als auch zu einer verminderten DC-Funktion. Demgegenüber besaß der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib keinerlei Einfluss auf DCs. Ebenso konnten Shurin et al.¹⁹¹ zeigen, dass verschiedene Chemotherapeutika verschiedene Effekte auf die Differenzierung, Maturierung und Funktion von DCs haben. Während Bleomycin keinen Effekt auf DCs aufwies, konnten die Autoren für Paclitaxel, Methotrexat und Doxorubicin eine aufregulierte APC-Aktivität der DCs beobachten¹⁹¹.

Mittlerweile gibt es immer mehr Hinweise, dass bestimmte Chemotherapeutika immunmodulatorische Effekte aufweisen und eine Antitumor-Immunantwort induzieren können^{192,193}. Diese Chemotherapeutika weisen immunogene Effekte auf, da sie die Freisetzung immunstimulatorischer Gefahrensignale (z.B. HMGB1) seitens nekrotischer Tumorzellen induzieren^{193,194}. Somit besitzen Chemotherapeutika neben dem zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen unter Umständen eine differentielle immunmodulatorische Rolle in der Tumorthherapie.

1.8 Ziel der Arbeit

Es ist bekannt, dass Chemotherapeutika einen erheblichen Einfluss auf den Organismus und damit auch auf das Immunsystem haben. Da für einen nachhaltigen Erfolg in der Tumorthherapie ein funktionelles Immunsystem von entscheidender Bedeutung ist, sind die Effekte von Chemotherapeutika auf Zellen des Immunsystems von großem Interesse. Im ersten Abschnitt der Arbeit sollte deshalb am Beispiel zweier Chemotherapeutika (Topotecan und Geldanamycin), für die auch insbesondere HIF-inhibierende Effekte gezeigt worden sind, untersucht werden, inwieweit diese intrazelluläre Signalwege, den Immun-Phänotyp sowie die Funktion humaner Mo-DCs beeinflussen. Desweiteren sollte untersucht werden, wie sich eine Behandlung der Mo-DCs mit die Antitumor-Agenzien auf deren T-Zell-Stimulierungs- und -Polarisierungspotential auswirkt.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollten die Auswirkung eines partiellen Verlustes von VHL als wesentlicher HIF-Negativregulator auf DCs untersucht werden. Walmsley et al.¹⁹⁵ zeigten in ihrer Studie, dass der PHD/HIF/VHL-Signalweg die Immunantworten des angeborenen Immunsystems beeinflussen kann. Neutrophile aus Patienten mit VHL-Syndrom (heterozygote Keimbahnmutation im *VHL*-Gen) wiesen eine gegenüber Neutrophilen gesunder Probanden verzögerte Apoptose und eine erhöhte Phagozytosekapazität auf¹⁹⁵. DCs bilden die Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Aus diesem Grund ist es interessant zu untersuchen welchen Einfluss ein heterozygoter Verlust von VHL auf den Phänotyp und die Funktion von DCs und somit auf die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort hat. Dafür sollte mittels Cre/lox-Technologie ein Mausmodell generiert werden, das nur ein Allel des *VHL*-Gens exprimiert. Aus diesen Mäusen sollte Knochenmark isoliert und daraus BM-DCs generiert werden. Die BM-DCs sollten phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Im Hinblick auf Sekundärerkrankungen bei Patienten mit VHL-Syndrom sollte im in vivo Modell analysiert werden, welchen Einfluss der heterozygote Verlust von VHL auf die Ausprägung von allergischen Atemwegsentzündungen hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tab. 2.1 In der Arbeit verwendete Geräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|------------------------|--|------------------------------------|
| Analysenwaage | Mettler HS4 | Mettler, Gießen |
| | Precisa 120V | Otto Mild Waagen, Karlsruhe |
| Autoklav | V-150 | Systemec GmbH, Wetzlar |
| Bestrahlungsgerät | Gammacell 2000 | Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark |
| Brutschrank | CB 150, CB 210 | Binder, Tuttingen |
| Digitalwaage | Basic Typ 1202 | Sartorius, München |
| Dispenser | Polytron PT 2100 | Kinematica AG, Littau, Schweiz |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur | Becton Dickinson, USA |
| Elektrophoresekammer | VARIA 1 | Roth, Karlsruhe |
| | Mini Trans-Blot | Bio-Rad, München |
| | Electrophoretic Transfer Cell | |
| ELISA-Washer | Ultrawash plus | Dynex, Chantilly, USA |
| Geldokumentationsgerät | Fusion SL-4.2 MP | PeqLab, Erlangen |
| Hämocytometer | Neubauer Improved Bright Line, 0,1 mm | AO Spencer, Buffalo, USA |
| MACS-Magnetständer | Quadro MACS | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Magnetrührer | IKAMAG [®] REO | Janke & Kunkel, Staufen |
| Mehrkanalpipette | m300: 30 – 300 µl | Biohit, Rosbach |
| | Finnpipette, 8-Kanalpipette | Thermo Fisher Scientific, |
| | 30 – 300 µl | Waltham, USA |
| Mikroskop | Labormikroskop CH2 (4-40x) | Olympus, Hamburg |
| | Inverses Routinemikroskop | |
| | CK2 (4-20x) | |
| | LSM SP5 STED Leica Laser | Leica, Wetzlar |
| | Scanning Confocal | |
| Mikroskop (CLSM) | Mikroskop (CLSM) | Olympus |
| | Olympus BX61, UAPO Linse | |
| | (20x/340, NA 0,75) | |
| Mikrowelle | EM-120S | Sanyo, San Diego, USA |
| Multicycler | PTC 200 | Bio-Rad |

| | | |
|-------------------------------|--|--|
| pH-Meter | CG 840 mit Einstabmesskette N2042 | Schott, Hofheim am Taunus |
| Photometer | GeneQuant II | Pharmacia Biotech, Cambridge, England |
| Pipetten | Finnpipetten: 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 200 – 1000 µl | Thermo Fisher Scientific |
| Pipettierhilfe | Pipetus [®] - akku Pipetboy plus | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt Tecnomara, Zürich, Schweiz |
| Präparierbesteck | – | Hammacher, Solingen |
| Präzisions-Mikroplatten-Leser | Modell 450 | Bio-Rad |
| Proteinblotting-Apparatur | Mini Trans-Blot Module | Bio-Rad |
| Spannungsgerät | Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 | Pharmacia Biotech |
| Spektralphotometer | Ultrospec 1100 rp MRX ^{TC} Revelation NanoDrop 1000 | Pharmacia Biotech Dynex Technologies, Thermo Fisher Scientific |
| Steril-Werkbank | Heraeus Air [®] | Heraeus, Hanau |
| Stickstofftank | BT 40 | L'air liquid, Wiesbaden |
| Szintillationszähler | 1205 Betaplate | LKB Wallac, Freiburg |
| Thermocycler | ABI 7300 Real-Time PCR System | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Vortexer | Vortex Genie 2 [™] | Bender & Hobein, Zürich, Schweiz |
| Wasserbad | GFL Typ 1012 | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Wasserdeionierungsanlage | Aktivkohlepatrone, 2 x Reistharz-Patrone, Membranfilterkerze 0,2 µm | Milipore, Bergisch-Gladbach |
| Zählhilfe | Laboratory Counter | Becton Dickinson |
| Zellerntegerät | 1295-001 Cell Harvester | LKB Wallac |
| Zentrifuge | Sorvall RT 6000D Multifuge 1 L-R Mikrozentrifuge SIGMA 1-14 Galaxy Mini | Du Pont, Bad Homburg Heraeus Sigma, Osterode VWR, Darmstadt |

2.1.2 Materialien

Tab. 2.2 In der Arbeit verwendete Materialien

| Material | Modell | Hersteller |
|--------------------------------------|--|--|
| Abdeckfolie für Realtime-PCR-Platten | – | Thermo Abgene, England |
| Bakteriologische Petrischalen | Ø 94 mm, Höhe 16 mm (no 633161) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Dispensiergerät-Aufsatz | PD-Tips 2,5 ml; 5 ml | Brand, Wertheim/Main |
| ELISA-Platten | 96-Loch-Flachbodenplatten, high binding | Greiner Bio-One |
| FACS-Röhrchen | 5 ml Rundbodenröhrchen BD Falcon; 352054 | BD Biosciences, Bedford, USA |
| Gewebekulturschalen | Cellstar 100 mm, Höhe 20 mm | Greiner Bio-One |
| Glasfaserfilter | 102 x 258 mm | LKB Wallac |
| Handschuhe | Sempercare® | Semperit, Wien , Österreich |
| Kanülen | 0,7 x 30 mm 0,4 x 12 mm | BD Biosciences B. Braun, Melsungen |
| Kryoröhrchen | Cryo.s | Greiner Bio-One |
| Kulturflaschen | 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² | Greiner Bio-One |
| Kulturplatten | Cellstar Gewebe-Kultur 6-Loch, Flachboden Cellstar Gewebe-Kultur 12-Loch, Flachboden Cellstar Gewebe-Kultur 24-Loch, Flachboden Cellstar Gewebe-Kultur 48-Loch, Flachboden Cellstar Gewebe-Kultur 96-Loch, Flachboden | Greiner Bio-One STARLAB GmbH, Hamburg |
| Küvetten | Einmal-Küvetten, 1,5 ml | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim |
| MACS Säulen | MidiMACS ,Säulen für positive Selektion Typ LS ⁺ /VS ⁺ | Miltenyi Biotec |
| Mattrandobjekträger | 76 x 26 cm | Diagonal GmbH & Co. KG, Münster |
| Membran zum Blotten | Hybond ECL | GE Healthcare Life Science, Freiburg |
| Nylonwolle | MKN-100 Nylon Wool Fiber | Kisker Biotech, Steinfurt |
| Objekträger | Superfrost® | Thermo Fisher Scientific |
| Parafilm | Parafilm N | Nationalcan™, Chicago, USA |
| Pasteurpipetten | 150 mm | VWR GmbH |

| | | |
|----------------------------|---|-----------------------------------|
| PCR-Reaktionsgefäße | – | Greiner Bio-One |
| Pipettenspitzen | TipOne | STARLAB GmbH |
| Plastikpipetten | 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml | Greiner Bio-One |
| | 10 ml | STARLAB GmbH |
| Reaktionsgefäße | 15 ml, 50 ml | Greiner Bio-One |
| | 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml | Sarstedt AG, Nürnberg |
| Real-Time-PCR Platten | 96-Loch-Mikrotestplatte Thermowell® GOLD | Corning, New York, USA |
| Sicherheitsreaktionsgefäße | 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Spritzen | Omnifix® 1 ml | B. Braun |
| | 10 ml Discardit™ II | Becton Dickinson GmbH |
| Sterilfilter | 0,2 µm Celluloseacetat | Sarstedt AG |
| | 0,45 µm Celluloseacetat | Schleicher & Schuell GmbH, Dassel |
| Whatman Filterpapier | 20 x 20 cm | Roth |
| Zellschaber | CytoOne® | STARLAB GmbH |
| Zellsieb | Ø 40 µm | Becton Dickinson GmbH |

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.3 In der Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien

| Substanz | Hersteller |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Aceton | Riedel-de Haen, Seelze |
| Agarose | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| Alkopharm 70 (70%iger (v/v) Alkohol) | Brüggemann, Heilbronn |
| Aluminiumhydroxid (Injekt® Alum) | Perbio, Wien |
| Ammoniumchlorid | Roth |
| Ammoniumsulfat | Roth |
| Aprotinin | Sigma-Aldrich, München |
| Blue Loading Buffer Reagent | NEB, Ipswich, USA |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | PAA Laboratories, Cölbe |
| Bromphenolblau, Na-Salz | Roth |
| Calciumchlorid | Roth |
| Chemilumineszenz ECL plus | PerkinElmer, Waltham, USA |
| 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Merck, Darmstadt |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma-Aldrich |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth |
| Dikaliumhydrogenphosphat | Merck |
| Di-n-butylphthalat (DBP) | Sigma-Aldrich |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich |
| Essigsäure | Roth |

| | |
|---|-------------------------------------|
| Ethanol (96%ig) | Roth |
| Ethyldiamintetraessigsäure, Na ₂ -Salz x 2 H ₂ O (EDTA) | Roth |
| ExtrAvidin | Sigma-Aldrich |
| Ficoll (LSM Separation Medium) | PAA, Pasching |
| Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC) | Sigma-Aldrich |
| Forene® (Wirkstoff: Isofluran) | Abbot, Wiesbaden |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Gibco, Houston, USA |
| Geldanamycin | Alexis Biochemicals, Lörrach |
| Gelladepuffer (SDS Blue Loading Buffer) | NEB |
| GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain | Biotium, Hayward, USA |
| L(+)-Glutamin | Roth |
| Glycerol | Roth |
| ³ H-Thymidin (³ HTdR) | Amersham Biosciences GmbH, Freiburg |
| Isopropanol (2-Propanol) | Roth |
| Kaliumacetat | Merck |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck |
| Kaliumhydrogencarbonat | Riedel-de Haën |
| Lipopolysaccharid (LPS) | Sigma-Aldrich |
| Methanol | Roth |
| 2-Mercaptoethanol | Roth |
| Minimum Essential Media (MEM) | Gibco |
| Milchpulver | Roth |
| Natrium-Acetat | Roth |
| Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) | Roth |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdesoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄) | Sigma-Aldrich |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth |
| Natriumfluorid (NaF) | Roth |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck |
| Natriumhydroxid | Roth |
| Natriumphosphat (Na ₃ PO ₄) | Sigma-Aldrich |
| Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄) | Sigma-Aldrich |
| Nukleotide (dNTPs) | Thermo Fisher Scientific |
| Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochloride (OPD) | Sigma-Aldrich |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck |
| Penicillin/Streptomycin | Cambrex, Charles City, USA |
| Phenobarbital | Sigma Aldrich |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma Aldrich |
| Protease Inhibitor Cocktail | Roche, Mannheim |

| | |
|---|--------------------------------------|
| PureCol [®] | Advanced BioMatrix, Poway, USA |
| Roti [®] -Quant | Roth |
| Salzsäure, 37 %ig | Roth |
| Schwefelsäure, 95 %ig | Roth |
| SYBR Green 490 Q-PCR Mastermix | Thermo Abgene |
| Szintillationsflüssigkeit | Perkin Elmer |
| Topotecan | Alexis Biochemicals, Lörrach |
| Tri-Natriumcitrat | Roth |
| Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) | Sigma-Aldrich |
| Tris/HCl | Roth |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich |
| Tween [®] -20 | Sigma-Aldrich |
| Vectashield [®] Eindeckmedium | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Wasser (steril, pyrogenfrei) | B. Braun |
| Wasserstoffperoxid 30%ig | Merck |

2.1.4 Größenstandards

DNA

GeneRuler[™] 100bp Plus DNA Ladder Thermo Fisher Scientific

Protein

PageRuler[™] Prestained Protein Ladder Thermo Fisher Scientific

2.1.5 Enzyme

Tab. 2.4 In der Arbeit verwendete allgemeine Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|--|--------------------------|
| Benzonase [®] | Merck |
| Extravidin, Streptavidin-Peroxidase Konjugat | Sigma-Aldrich |
| GoTaq DNA-Polymerase | Promega, Heidelberg |
| MyTaq DNA-Polymerase | Bioline, Luckenwalde |
| Proteinase K | Thermo Fisher Scientific |

2.1.6 Proteine und Peptide

Tab. 2.5 In der Arbeit verwendete Proteine und Peptide

| Protein/Peptid | Hersteller |
|--|----------------------------------|
| Ovalbumin | Calbiochem-Novachem, Läfelfingen |
| OVA ₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) | JPT Peptide Technologies, Berlin |
| OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) | JPT Peptide Technologies |

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Antikörper zum Absättigen von Fc-Rezeptoren

Zum Absättigen von Maus-Fc-Rezeptoren wurde der Antikörper 2.4G2 verwendet, der aus dem Kulturüberstand des B-Zell-Hybridoms 2.4G2 gewonnen wurde. Der Antikörper ist spezifisch für FcγRII/III (CD16/32) und hat den Isotyp Ratte-IgG2b¹⁹⁶. Der Antikörper wurde 1:100 in FACS-Medium verdünnt eingesetzt. Zum Absättigen humaner Fc-Rezeptoren wurde das *FcR Blocking Reagent* der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Das Reagenz wurde vor Verwendung 1:10 mit FACS-Medium verdünnt.

2.1.7.2 Antikörper für FACS-Färbungen

Tab. 2.6 Primäre Antikörper, die für die FACS-Färbung der murinen Zellen verwendet wurden.

| Antikörper- spezifität | Isotyp | Klon | Fluorochrom | Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------|----------------|-------------|-------------|------------|-------------------------------|
| B220 | Ratte-IgG2a | RA3-6B2 | PE-Cy5 | 1:80 | eBioscience San Diego, USA |
| CD3 | Hamster-IgG1 | 145-2C11 | PE-Cy5 | 1:80 | BD Bioscience |
| CD4 | Ratte-IgG2b | GK1.5 | APC | 1:80 | eBioscience |
| CD8 | Ratte-IgG2a | 83-6.72 | PE | 1:25 | Miltenyi Biotec |
| CD11b | Ratte-IgG2b | M1/70 | FITC | 1:100 | eBioscience |
| CD11c | Hamster-IgG | N418 | APC | 1:100 | eBioscience |
| CD25 | Ratte-IgG1 | 7D4 | FITC | 1:50 | BD Bioscience |
| CD49b | Ratte-IgM | DX5 | APC | 1:50 | eBioscience |
| CD80 | Hamster-IgG | 16-10A1 | FITC | 1:100 | eBioscience San Diego, USA |
| CD86 | Ratte-IgG2a, κ | GL1 | PE | 1:100 | eBioscience |
| F4-80 | Ratte-IgG2a | BM8 | FITC | 1:50 | BioLegend, San Diego, USA |
| MHC II | Ratte-IgG2b, κ | MS/114.15.2 | PE-Cy5 | 1:2000 | eBioscience |

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit FACS-Puffer.

Tab. 2.7 Primäre Antikörper, die für die FACS-Färbung der humanen Zellen verwendet wurden.

| Antikörper-spezifität | Isotyp | Klon | Fluorochrom | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------|----------------|--------|-------------|------------|----------------------------|
| CD11c | Maus-IgG1, κ | B-ly6 | APC | 1:100 | BD Pharmingen™, Heidelberg |
| CD14 | Maus-IgG2b, κ | M5E2 | PerCP/Cy5.5 | 1:200 | BioLegend |
| CD80 | Maus-IgG1, κ | 2D10.4 | PE-Cy5 | 1:100 | eBioscience |
| CD83 | Maus-IgG1, κ | HB15e | PE | 1:50 | eBioscience |
| CD86 | Maus-IgG2b, κ | IT2.2 | APC | 1:200 | Biolegend |
| CD207 | Maus- IgG2a, κ | 4C7 | PE | 1:200 | Biolegend |
| Fascin | Maus-IgG1 | 55K-2 | unmarkiert | 1:50 | DAKO, Glostrup, Dänemark |
| HLA-DR | Maus-IgG2a, κ | L243 | FITC | 1:100 | BioLegend |

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit FACS-Puffer.

Tab. 2.8 Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper

| Antikörperspezifität | Fluorochrom | Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------------------|-------------|------------|----------------------------------|
| Ziege-anti-Maus-IgG1 (human absorbed) | FITC | 1:50 | Southern Biotech Birmingham, USA |

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit FACS-Puffer.

Tab. 2.9 Kontrollantikörper zur Überprüfung der unspezifischen Bindung des spezifischen Primärantikörpers

| Antikörper-spezifität | Klon | Fluorochrom | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------|-----------|-------------|------------|----------------------------|
| Hamster-IgG1 | G235-2356 | FITC | 1:100 | BD Pharmingen™ |
| Maus-IgG1 | X40 | unmarkiert | 1:50 | BD Pharmingen™ |
| Maus-IgG, κ | MOPC-21 | PE-Cy5 | 1:100 | BioLegend |
| Maus-IgG2a, κ | MOPC-173 | FITC | 1:100 | BioLegend |
| Maus-IgG2b | MPC-11 | PerCP/Cy5.5 | 1:200 | BioLegend |
| Maus-IgG2b, κ | PLRV219 | APC | 1:200 | ImmunoTools, Friesoythe |
| Ratte-IgG2a | R35-95 | PE | 1:100 | BD Pharmingen™, Heidelberg |
| Ratte-IgG2b, κ | MPC-11 | PE-Cy5 | 1:2000 | BioLegend San Diego, USA |
| Ratte-IgM | R4-22 | APC | 1:50 | BioLegend |

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit FACS-Puffer.

2.1.7.3 Antikörper für ELISA

Tab. 2.10 Primärantikörper (Capture-Antikörper) zum „Fangen“ von murinen Zielproteinen

| Primär-antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration (Einsatzkonzentration) | Hersteller |
|-------------------------|-----------------------|----------|--|---|
| Anti-Maus IFN- γ | Ratte-IgG1 | R46A2 | (1:1000 verdünnt in 0,1 M NaHCO ₃) | Eigenproduktion der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Reske-Kunz |
| Anti-Maus IL-5 | Ratte-IgG1 | TRFK5 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml in 0,1 M NaHCO ₃) | BD Pharmingen™ |
| Anti-Maus IL-10 | Ratte-IgG2b, κ | JES052A5 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml in 1x PBS) | eBioscience |
| Anti-Maus IL-17 | Ratte-IgG2a | 50101 | 0,5 mg/ml (5 μ g/ml in 1x PBS) | R&D Systems, Minneapolis, USA |

Tab. 2.11 Sekundärantikörper zur Detektion von murinen Zielproteinen

| Detektions-antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration (Einsatzkonzentration) Inkubation | Hersteller |
|---|----------------------|------------|---|---|
| Anti-Maus IFN- γ , biotinyliert | Ratte-IgG1 | AN18.17.24 | (1:5000 verdünnt) 60 min, 37°C | Eigenproduktion der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Reske-Kunz |
| Anti-Maus IL-5, biotinyliert | Ratte-IgG2a | TRFK4 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml) 60 min, 37°C | BD Pharmingen™, Heidelberg |
| Anti-Maus IL-10, biotinyliert | Ratte-IgG1, κ | Polyklonal | 0,5 mg/ml (0,5 μ g/ml) 60 min, RT | eBioscience, San Diego, USA |
| Anti-Maus IL-17, biotinyliert | Ziege-IgG | – | 50 μ g/ml (0,5 μ g/ml) 2 h, RT | R&D Systems, Minneapolis, USA |

Alle Sekundärantikörper wurden in 1x PBS/1% BSA (w/v) verdünnt.

Tab. 2.12 Antikörper für Immunglobulin-ELISA

| Antikörperspezifität | Isotyp | Klon | Verdünnung |
|----------------------------------|-----------|---------|------------|
| Anti-Maus IgG1, biotinyliert | Ratte-IgG | A85-1 | 1:250 |
| Anti-Maus IgG2a, biotinyliert | Ratte-IgG | R19-15 | 1:250 |
| Anti-Maus IgG2b, biotinyliert | Ratte-IgG | R13-3 | 1:250 |
| Anti-Maus IgE, biotinyliert | Ratte-IgG | R35-118 | 1:250 |

Die Verdünnung erfolgte in 1x Assay Diluent. Alle Antikörper wurden von der Fa. BD Pharmingen bezogen.

2.1.7.4 Reagenzien für Endozytose- und Antigenprozessierungs-Assays

Tab. 2.13 Reagenzien zur Überprüfung der Endozytose-Aktivität

| Reagenz | Fluorochrom | Verdünnung | Hersteller |
|--|------------------------|------------|--------------------------------|
| Dextran | FITC | 1:10 | Sigma-Aldrich |
| Alexa Flour [®] 488 Ovalbumin (AF-OVA) | Alexa488 | 1:20 | Molecular Probes, Darmstadt |
| DQ [™] Ovalbumin (DQ-OVA) | BODIPY [®] FL | 1:20 | Molecular Probes |

2.1.7.5 Antikörper für Proliferationsexperimente

Tab. 2.14 Antikörper, die in Proliferationsexperimenten eingesetzt wurden

| Antikörperspezifität | Klon | Konzentration | Hersteller |
|----------------------|--------|---------------|------------|
| Anti-human CD3 | OKT3 | 1 µg/ml | BioLegend |
| Anti-human CD28 | CD28.2 | 0,5 µg/ml | BioLegend |

2.1.7.6 Antikörper für Immunoblots

Tab. 2.15 Primärantikörper zur Detektion der Zielproteine

| Antikörper- spezifität | Isotyp | Klon | Verdünnung | Molekulargewicht | Hersteller |
|---------------------------|---------------|-------|------------|------------------|---------------------------------|
| AKT | Kaninchen-IgG | C67E7 | 1:1000 | 60 kDa | Cell Signaling, Danvers, USA |
| ERK1/2 | Kaninchen-IgG | 137F5 | 1:1000 | 42, 44 kDa | Cell Signaling |
| IκBα | Maus-IgG1 | L35A5 | 1:1000 | 39 kDa | Cell Signaling |
| NF-κB | Kaninchen-IgG | C22B4 | 1:1000 | 65 kDa | Cell Signaling |
| p38 | Kaninchen-IgG | D3F9 | 1:1000 | 43 kDa | Cell Signaling |
| RelB | Kaninchen-IgG | C-19 | 1:1000 | 68 kDa | Santa Cruz, Heidelberg |
| SAPK/JNK | Kaninchen-IgG | 56G8 | 1:1000 | 46, 54 kDa | Cell Signaling |

Tab. 2.16 Phosphorylierte Primärantikörper zur Detektion der Zielproteine

| Antikörper | Isotyp | Klon | Verdünnung | Molekulargewicht |
|------------------|---------------|-------|------------|------------------|
| phospho-AKT | Kaninchen-IgG | D9E | 1:1000 | 60 kDa |
| phospho-ERK1/2 | Kaninchen-IgG | 137F5 | 1:1000 | 42, 44 kDa |
| phospho-NF-κB | Kaninchen-IgG | 93H1 | 1:1000 | 65, 90 kDa |
| phospho-p38 | Kaninchen-IgG | D3F9 | 1:1000 | 40 kDa |
| phospho-SAPK/JNK | Kaninchen-IgG | 81E11 | 1:1000 | 46, 54 kDa |

Alle Antikörper wurden von der Fa. Cell Signaling bezogen.

Tab. 2.17 Ladekontrollen zum Nachweis der aufgetragenen Proteinmengen

| Antikörperspezifität | Isotyp | Verdünnung | Molekulargewicht |
|----------------------|---------------|------------|------------------|
| β-Actin | Kaninchen-IgG | 1:1000 | 45 kDa |
| β-Tubulin | Kaninchen-IgG | 1:1000 | 50 kDa |

Klon wird vom Hersteller nicht angegeben. Beide Antikörper wurden von der Fa. Abcam, Cambridge, UK bezogen.

Tab. 2.18 Sekundärantikörper zur Detektion der Immunoblot-Primärantikörper.

| Antikörperspezifität | Konjugation | Isotyp | Verdünnung | Hersteller |
|-------------------------|-------------|-------------------|------------------|--------------------------------------|
| Kaninchen-Anti-Maus-IgG | HRP | Kaninchen- IgG | 1:5000 | Novus Biologicals, Littleton, USA |
| Ziege-Anti-Hase-IgG | HRP | Kaninchen- IgG | 1:2000 1:3000 | Cell Signaling |

2.1.8 Zytokine und Nukleotide

Tab. 2.19 Zytokine, die zu den Kulturmedien zugegeben wurden

| Zytokin | Konzentration | Hersteller |
|------------------|---------------|---|
| mGM-CSF | 5% (v/v) | Kulturüberstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie X63/GM-CSF ¹⁹⁷ . Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. B. Stockinger (National Institute for Medical Research, London) zur Verfügung gestellt. |
| rh GM-CSF | 200 U/ml | Berlex, Montville, USA |
| rh IL-1 β | 10 ng/ml | ImmunoTools |
| rh IL-4 | 10 ng/ml | ImmunoTools |
| PGE ₂ | 1 μ g/ml | Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz |
| rh TNF- α | 10 ng/ml | ImmunoTools |

Tab. 2.20 Zytokine, die im ELISA zur Konzentrationsbestimmung als Standard mitgeführt wurden

| Zytokine | Konzentration | Einsatzkonzentration | Hersteller |
|------------------|---------------|----------------------|-----------------------------|
| rh IFN- γ | 1 μ g/ml | 15, 6 - 500 pg/ml | eBioscience |
| rm IFN- γ | 2 μ g/ml | 0,156 - 5 ng/ml | BD Pharmingen TM |
| rh IL-5 | 1 μ g/ml | 15,6 - 500 pg/ml | eBioscience |
| rm IL-5 | 10 μ g/ml | 0,031 - 2 ng/ml | eBioscience |
| rh IL-6 | 130 ng/ml | 15,6 - 500 pg/ml | BioLegend |
| rh IL-10 | 1 μ g/ml | 4,69 - 300 pg/ml | eBioscience |
| rm IL-.10 | 10 μ g/ml | 0,063 - 4 ng/ml | eBioscience |
| rh IL-12p40 | 75 ng/ml | 0,063 - 4 ng/ml | BioLegend |
| rm IL-17 | 10 μ g/ml | 0,031 - 2 ng/ml | BD Pharmingen TM |

2.1.9 Immunmagnetische Partikel zur Zellseparation

Für die Zellseparation von humanen T-Zellen wurden anti-human CD4-MicroBeads der Fa. Miltenyi Biotec bezogen.

2.1.10 Fertigsysteme

Tab. 2.21 In der Arbeit verwendete Fertigsysteme

| Fertigsystem | Hersteller |
|--|-----------------------|
| ABsolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix | Thermo Scientific |
| Caspase--Glo® 3/7 Assay | Bio-Rad |
| CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay | Promega, Madison, USA |
| DNeasy® Blood & Tissue Kit | Qiagen, Hilden |
| Fertiggelsysteme (SDS-PAGE) | Bio-Rad |
| Humanes IFN-γ ELISA Kit | eBioscience |
| Humanes IL-5 ELISA Kit | eBioscience |
| Humanes IL-6 ELISA Kit | BioLegend |
| Humanes IL-10 ELISA Kit | eBioscience |
| Humanes IL-12p40/IL23 Kit | BioLegend |
| iScript™ cDNA Synthesis Kit | Bio-Rad |
| RNeasy® Mini Kit & QIAshredder® | Qiagen |

2.1.11 Oligonukleotide

Tab. 2.22 In der Arbeit verwendete Oligonukleotide zur Typisierung der Mäuse

| Gen | Oligonukleotidsequenz | |
|------------|-----------------------|--|
| ActinCre | Cre-R | sense: 5'-TCC AAT TTA CTG ACC GTA CAC C-3' |
| | Cre-B | antisense: 5'-TAC GCG TTA ATG GCT AAT CGC C-3' |
| HIF-1α | HIF-1α H1 | sense: 5'-CTG TCT TCC CTG CTT AGG TCT TTC TAA C-3' |
| | HIF-1α H2 | sense: 5'-GAG ATG GAG AAG GAG GTT AGT GTA TCC-3' |
| | HIF-1α H3 | antisense: 5'-ACG TTG GCT CAT GGT GTA CTT TG-3' |
| VHL Exon 1 | VHL1 F1 | sense: 5'-TCA GGT ATG TGT GTG CGC AA-3' |
| | VHL1 F2 | sense: 5'-CCT GCC TTG GTG ATG ACA AC-3' |
| | VHL1 R1 | antisense: 5'-ACC TGA GAG CGG CTT CAC TT-3' |
| VHL Exon2 | VHL2 F1 | sense: 5'-CTC TTG ACC TAG CTG CAC TT-3' |
| | VHL2 F2 | sense: 5'-CCA ACA TCA CAT TGC CAG GT-3' |
| | VHL2 R1 | antisense: 5'-GTA CGT CTG AGG CAC ATC TT-3' |

2.1.12 Medien, Lösungen und Puffer

Für die Herstellung der Lösungen und Puffer wurde deionisiertes Wasser aus der hauseigenen Entsalzungsanlage (Milipore) bzw. *aqua injectabilis* (= pyrogenfrei) der Firma Braun verwendet.

Medien

Medienzusätze in der Zellkultur (Stammlösung)

| | |
|-------------------|---|
| β-Mercaptoethanol | 40 µl β-Mercaptoethanol in 114 ml IMDM, steril filtriert, 4°C |
| Glutamin | 200 mM L(+)-Glutamin in 1x PBS, steril filtriert, 4°C |
| Pen/Strep | 10 ⁴ <i>International Units</i> (IU)/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 4°C |

Kulturmedium für HEK293T

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Lonza, versetzt mit

| | |
|-----------|-------------------|
| 10% (v/v) | FCS (Gibco) |
| 2 mM | L-Glutamin |
| 50 µM | β-Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |

Kulturmedium für IGROV1

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, Lonza, versetzt mit

| | |
|-----------|-------------------|
| 10% (v/v) | FCS (Gibco) |
| 2 mM | L-Glutamin |
| 50 µM | β-Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |

Waschmedium

Eagle's Minimum Essentiell Medium (EMEM), Bio Whittaker/Cambrex, versetzt mit

| | |
|-----------|-------------------|
| 2% (v/v) | FCS (PAN-Biotech) |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |

Kulturmedium für BM-DCs

Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM), Gibco/Invitrogen, versetzt mit

| | |
|-----------|-------------------|
| 10% (v/v) | FCS |
| 2 mM | L-Glutamin |
| 50 µM | β-Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 5% (v/v) | GM-CSF |

Medium für mature BM-DCs: zusätzlich LPS (1 µg/ml)

Testmedium

IMDM, versetzt mit

| | |
|-----------|-------------------|
| 10% (v/v) | FCS |
| 2 mM | L-Glutamin |
| 50 µM | β-Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |

Kulturmedium für Mo-DCs

IMDM, versetzt mit

| | |
|-----------|-------------------|
| 50 µM | β-Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 2% (v/v) | Serum |
| 10 ng/ml | rh IL-4 |
| 200 U/ml | rh GM-CSF |

Einfriermedium für humane Zellen

IMDM, versetzt mit

| | |
|-----------|-------------------|
| 50 µM | β-Mercaptoethanol |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 10% (v/v) | DMSO |
| 45% (v/v) | Serum |

Einfriermedium für Zelllinien

| | |
|---------|---|
| HEK293T | 70% (v/v) DMEM, 20% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO |
| IGROV1 | 70% (v/v) RPMI, 20% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO |

Puffer und LösungenAgarose-Gelelektrophorese

| | |
|----------------|---|
| 50x TAE-Puffer | 2 M TRIS, 1 M Eisessig, 0,5 mM Na ₂ EDTA, pH 8,5 |
|----------------|---|

Allgemeiner Puffer

| | |
|--------|---|
| 1x PBS | 0,14 M NaCl, 0,01 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4 |
|--------|---|

ELISA

| | |
|---------------------|--|
| Blockierungspuffer | 1% BSA (w/v) in 1x PBS, 4°C |
| Beschichtungspuffer | 0,1 M NaHCO ₃ in H ₂ O, pH 8,2 |
| OPD-Substratpuffer | 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, 0,1 M Na-Citrat x H ₂ O, 1 mg/ml OPD, 1 µl/ml H ₂ O ₂ |
| Stopplösung | 1 M H ₂ SO ₄ |
| Waschpuffer | 0,1% (v/v) Tween®-20 in 1x PBS |

Erythrozyten-Lyse

Gey'scher Lysepuffer 10 mM KHCO₃, 155 mM Ammoniumchlorid, 100 µM EDTA, pH 7,5, steril filtriert, 4°C

FACS

| | |
|--------------|---|
| FACS-Puffer | 2% (v/v) FCS, steril filtriert in 1x PBS, 4°C |
| Fixierlösung | 0,7% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS, 4°C |

Immunblot

| | |
|--------------------|--|
| 1x TBS | 20 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6 |
| 1x Laufpuffer | 25mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS |
| Blockierungslösung | 5% (w/v) Milchpulver in Waschlösung |
| Transferpuffer | 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, |
| 20% (v/v) Methanol | |
| Waschpuffer | 0,1% (v/v) Tween®-20 in 1x TBS |

Immunfluoreszenz

| | |
|--------------------|---|
| Blockierungslösung | 5 % Eseserum (Sigma Aldrich) in 1x PBS |
| Waschpuffer | 0,1% (v/v) Tween [®] -20 in 1x PBS |

in vivo-Migration

| | |
|------------------|---|
| FITC-Stammlösung | Di-n-butylphthalat:Aceton (1:1), 5% (v/v) DMSO, 500 µg FITC |
|------------------|---|

Lösung zum Ablösen von IGROV1-Zellen

| | |
|---------------------|--|
| Trypsin-Stammlösung | 10% (w/v) Trypsin, 2 mM Na ₂ -EDTA in 1x PBS, steril filtriert, -20°C |
| Trypsin-Lösung | 0,05 % (v/v) Trypsin-Stammlösung in 1x PBS |

Proteinlysepuffer

| | |
|------|--|
| RIPA | 1% (w/v) C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄ , 0,15 M NaCl, 0,01 M Na ₃ PO ₄ , 2mM EDTA; 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) NP-40, pH 7,4 folgende Zusätze frisch hinzufügen: 1 mM DTT, 5 U/ml Benzonase, 2% Protease-Inhibitor (Roche), 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 0,2 mM Na ₃ VO ₄ , 100 U/ml Aprotinin |
|------|--|

Typisierung der Mausstämme

| | |
|--------------------|---|
| Schwanz-Lysepuffer | 50 mM TRIS HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (w/v) SDS, pH 7,4 |
|--------------------|---|

Zellzahlbestimmung

| | |
|------------|--|
| Trypanblau | 0,01% (w/v) Trypanblau, 0,001% (w/v) Na-Azid in 1x PBS |
|------------|--|

2.1.13 Buffy Coats

Buffy Coats sind Leukozytenkonzentrate, die bei der Herstellung von Erythrozyten- und Blutplasmakonzentraten als Nebenprodukte entstehen. Für die Versuche wurden die verwendeten humanen Zellen aus Buffy Coats gewonnen, die von der Transfusionszentrale Mainz bezogen wurden. Buffy Coats weisen im Vergleich zu Vollblut eine höhere Konzentration an Leukozyten und Thrombozyten auf, da im Rahmen ihrer Herstellung der größte Teil der Erythrozyten und des Plasmas durch Zentrifugation entfernt wurde.

2.1.14 Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Inzuchtmaus-Stämme verwendet:

T-Zellspender

BALB/cJ (Haplotyp H-2^d)

OT-II (Haplotyp H-2^b)

OT-I (Haplotyp H-2^b),

Responderstämme

VHL Exon 1 (VHL1^{fl/fl}) (Haplotyp unbekannt),

VHL Exon 2 (VHL2^{fl/fl}) (wahrscheinlich H-2^b)

Effektorstamm

Actin-Cre (AcCre) (Haplotyp H-2^q)

Für protein-antigenspezifische Kokulturen wurden OT-I bzw. OT-II Mäuse, die einen transgenen TCR besitzen, verwendet. T-Zellen aus diesen Mäusen exprimieren selektiv die vorarrangierten α - und β -Ketten jeweils eines TCR, der spezifisch ein Ovalbumin-Epitop gebunden an MHC I (OT-I) oder MHC II (OT-II) erkennt^{198,199}. Der genetische Hintergrund der Mäuse ist C57BL/6. Bei den Responderstämmen VHL1^{fl/fl} und VHL2^{fl/fl} wurden das Exon 1 (VHL1^{fl/fl}) bzw. Exon 2 (VHL2^{fl/fl}) des murinen *VHL*-Gens mit zwei *loxP*-Rekombinationsstellen versehen. Der genetische Hintergrund ist nicht standardisiert und stellt einen Mix aus BALB/cJ und SV129 für VHL1^{fl/fl} und aus SV129 und C57BL/6 für VHL2^{fl/fl} dar. Die Generierung des Mausstammes VHL1^{fl/fl} wurde in der Publikation¹³¹ beschrieben. Der Mausstamm VHL2^{fl/fl} wurde von der AG Zabel generiert und ist noch nicht publiziert. Der transgene Effektorstamm AcCre exprimiert *Cre*-Rekombinase unter der transkriptionellen Kontrolle des humanen β -Actin-Promotors²⁰⁰. Der genetische Hintergrund von AcCre ist FVB. Die Mausstämme VHL1^{fl/fl}, VHL2^{fl/fl} und AcCre wurden freundlicherweise von der AG Zabel, Universitätskinderklinik Freiburg, zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz gezüchtet. Alle Versuchstiere wurden unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen gehalten. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach den Richtlinien der Tierversuchsordnung und des Deutschen Tierschutzgesetzes

2.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche zellbiologischen Arbeiten, wie zum Beispiel die Kultivierung und Aufreinigung von Zellen, wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Gebrauchsmaterialien wurden entweder autoklaviert oder direkt von der Firma steril und endotoxinfrei erworben. Die für die Zellkultur verwendeten Lösungen wurden entweder steril filtriert (0,2 µM) oder autoklaviert.

2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau bestimmt. Trypanblau ist ein negativ geladener Farbstoff, der durch die permeabilisierte Membran toter Zellen eindringt und deren Zytoplasma anfärbt. Tote Zellen erscheinen blau und können somit von den viablen Zellen unterschieden werden. Bei der Bestimmung der Zellzahl werden tote Zellen nicht berücksichtigt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Zellsuspension, je nach Größe der Zellsedimente, 1:10, 1:20 oder 1:100 mit Trypanblau verdünnt. Für die Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet: Zellzahl/ml = Ermittelte Zellzahl in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor (10⁴/ml).

2.2.2 Verwendete Zelllinien

Im Rahmen der Arbeit wurden die beiden Zelllinien *human embryonic kidney* (HEK) 293T und IGROV1 verwendet. HEK293T wurde durch Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen mit DNA-Fragmenten vom Adenovirus Typ 5 generiert²⁰¹. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem „SV40-T-Antigen“ stabil transfiziert, was eine episomale Replikation von Plasmiden mit dem SV40-Replikationsursprung erlaubt²⁰⁰. Die Zelllinie IGROV1 wurde ursprünglich aus einem humanen Ovarialkarzinom generiert²⁰² und uns freundlicherweise von der AG Prawitt, Kinder- und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Kryokonservierung der Zelllinien

Die Kryokonservierung der Zelllinien erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff in kleinen Aliquoten. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und mit 4°C gekühltem Medium. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst geerntet, im Fall von IGROV1 mittels Trypsinierung der Zellen (Punkt 2.2.4), sedimentiert, resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in einer Zellzahl von 0,5-5 x 10⁶ pro ml eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Das in dem Einfriermedium vorhandene DMSO schützt die Zellen vor einer Eiskristallbildung

während des Einfrierens. Nach der Überführung der Zellsuspension in eisgekühlte Kryoröhrchen wurden diese in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter eingefroren. Für Experimente wurden kryokonservierte Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein mit 20 ml kaltem Waschmedium gefülltes 50 ml-Röhrchen überführt. Zu der Zellsuspension wurden weitere 10 ml Waschmedium zugeführt und die Zellen für 10 min bei 4°C und 300 x g sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und das Zellsediment in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt. Durch mehrmaliges Wechseln des Kulturmediums in den ersten 8 h wurden tote Zellen aus der Kultur entfernt.

2.2.4 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien

Die Kultivierung der HEK293T-Zellen und der IGROV1-Zellen erfolgte in 175 cm²-Kulturflaschen in 35 ml des jeweiligen Kulturmediums bei 37°C, 5% CO₂ und einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre. Das Kulturmedium wurde stets im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Das Passagieren der HEK293T-Zellen erfolgte alle vier bis sechs Tage, indem mit Hilfe einer Plastikpipette die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgespült und ein Teil der Zellen (Verdünnung 1:100 bis 1:200) in eine neue 175 cm²-Kulturflasche mit 35 ml Kulturmedium überführt wurden. Die HEK293T-Zellen wurden über ca. 20 Passagen gehalten. Das Passagieren der IGROV1-Zellen erfolgte alle drei bis fünf Tage. Dafür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 0,05% Trypsin-EDTA für 5 min trypsinisiert. Die Reaktion wurde mit 8 ml Kulturmedium gestoppt, und die IGROV1-Zellen wurden im Verhältnis 1:10 in eine neue 175 cm²-Zellkulturflasche mit Kulturmedium überführt. Die IGROV1-Zellen wurden über ca. 25 Passagen gehalten.

2.2.5 Kryokonservierung der humanen Zellen

Die Kryokonservierung von PBMCs, T-Zellen und Monozyten erfolgte bei -80°C. Die Zellen wurden dazu sedimentiert (400 x g; 5 min; 4°C) und anschließend in der entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen. Die Suspension wurde gut gemischt und unverzüglich eingefroren.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO auszuwaschen, wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit 20 ml 1x PBS versetzt und zentrifugiert (400 x g; 5 min, 4°C). Das Zellsediment wurde je nach folgendem Schritt anschließend in IMDM-Medium oder MACS-Puffer aufgenommen.

2.2.6 Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem peripheren Blut

Das für die Präparation von PBMCs verwendete Blut wurde gesunden Spendern in der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz entnommen. Die Isolierung der PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das Blutkonzentrat der Buffy Coats wurde auf drei 50 ml-Röhrchen verteilt und anschließend mit 15 ml Ficoll unterschichtet und die Proben für 20 min bei 700 x g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren bei der Zentrifugation, während sich die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) oberhalb der Ficoll-Lösung sammeln und die Interphase bilden. Die obere Phase stellt das Plasma dar, in der auch zum größten Teil die Thrombozyten verbleiben. Von dem Plasma wurden 15 ml abgenommen und für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 1500 x g für 5 min sedimentiert, das Serum bei 4° C gelagert und für die anschließende Zellkultur verwendet. Um die mononukleären Zellen zu erhalten, wurde die Interphase abpipettiert und in neue 50 ml-Plastikröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 600 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellsedimente zweimal mit je 50 ml 1x PBS gewaschen, um Reste an Thrombozyten und Ficoll zu entfernen (Sedimentation bei 400 x g; 5 min; 4° C). Die Zellen wurden in IMDM-Medium aufgenommen und eingefroren (Abschnitt 2.2.5).

2.2.7 Generierung humaner DCs aus Monozyten

Die Isolierung von Monozyten erfolgte aus PBMCs mittels Plastikadhärenz. Im Gegensatz zu Lymphozyten und NK-Zellen adhären Monozyten an Kunststoffoberflächen und können somit leicht von den anderen Zellen separiert werden. Zunächst wurden die PBMCs wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben aufgetaut, mit 1x PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Für die Adhärenzphase wurden in eine 6-Loch-Platte pro Vertiefung 2 ml IMDM-Medium und 90 µl Plasma vorgelegt. Danach wurden $1,3 \times 10^7$ Zellen pro Vertiefung zugegeben und die Platten für 45 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden alle nicht adhären Zellen abgespült und die Vertiefungen mehrmals mit 1x PBS gewaschen, um leicht adhären Zellen abzutrennen. Für die Kultivierung der adhären Monozyten wurden pro Loch 3 ml Kulturmedium für humane Mo-DCs zugegeben. Durch die darin enthaltenen Zytokine (GM-CSF, IL-4) wird gewährleistet, dass Monozyten zu DCs differenzieren. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von insgesamt acht Tagen im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. An Tag drei wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versorgt. Dafür wurden 800 µl des Mediums abgenommen und durch 1 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Die Ausreifung der Mo-DCs erfolgte an Tag sechs. Hierzu wurde wie zuvor beschrieben das Medium ausgetauscht. Anschließend wurden die unreifen MO-DCs mit einer Kombination proinflammatorischer Mediatoren als Reifungs-Cocktail, IL-1 β (1000 IU/ml), TNF- α (10 ng/ml) sowie PGE₂ (1 μ g/ml) stimuliert. An Tag acht wurden die Mo-DCs geerntet, indem das Medium inklusive der Mo-DCs abgenommen und in ein 50 ml-Röhrchen überführt wurden. In die Vertiefungen der Platten wurden jeweils 1 ml 1x PBS pipettiert und schwach adhärenente Mo-DCs durch mehrfaches Spülen abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (400 x g, 4°C, 5 min) und nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS in 1 ml IMDM-Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

In verschiedenen Versuchsansätzen erfolgte eine Behandlung der Mo-DCs mit Chemotherapeutika. Hierfür wurden die pharmakologischen Substanzen TPT und GA am sechsten Tag in den entsprechenden Konzentrationen zu den unreifen Mo-DCs zugegeben.

2.2.8 Generierung von murinen knochenmarkabgeleiteten DCs

Die Generierung von murinen knochenmarkabgeleiteten DCs (*bone marrow derived DCs*, BM-DCs) erfolgte entsprechend der Etablierung von Scheicher¹⁶¹, modifiziert von Lutz²⁰³ ausgehend von Knochenmarkzellen aus Femur und Tibia beider Hinterläufe von Mäusen. Zunächst wurden die Mäuse getötet, die Knochen steril präpariert und verbleibende Muskelreste mit einem in 70%igem Ethanol getränkten Papiertuch abgerieben. Die Gelenkköpfe wurden mit einer Schere entfernt, um die Knochenkanäle freizulegen. Anschließend wurde mit einer Spritze (Kanüldurchmesser 0,45 mm) das Knochenmark aus dem Knochen gespült und in 20 ml kaltem Waschmedium durch wiederholtes Aufziehen der Spritze vereinzelt. Die erhaltene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen transferiert und sedimentiert (300 x g, 4°C, 8 min). Danach wurden die in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten lysiert. Dazu wurde zu dem Zellsediment 1ml Gey'scher Lysepuffer pro präparierter Maus gegeben. Nach einer Minute wurde die Lyse durch Zugabe von 50 ml kaltem Waschmediums gestoppt, die Zellen zwei weitere Male gewaschen und im Anschluss in warmem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Die Knochenmarkzellen wurden in einer Dichte von 2×10^6 Zellen in 10 ml Kulturmedium in bakteriologische Petrischalen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von neun Tagen im Brutschrank bei 37°C, 10 % CO₂ unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre, wobei an Tag drei und sechs jeweils 5 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben wurde. An Tag acht erfolgte die Ausreifung der immaturren BM-DCs. Hierfür wurden die nicht-adhärenenten Zellen einer Kultur geerntet und sedimentiert (300 x g, RT, 8 min).

Anschließend wurde das Zellpellet in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in Gewebe-Kulturschalen überführt. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml LPS stimuliert und für weitere 24 h bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach neun Kulturtagen wurden die BM-DCs geerntet. Hierzu wurden die nicht-adhärenenten Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 8 min bei 300 x g und RT sedimentiert. Nach einem Waschschrift wurde das Zellsediment in 10 ml auf 37°C vorgewärmt es Testmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.9 Präparation von murinen Lymphknotenzellen

Für den Migrationsassay (Punkt 2.6.1) wurden 24 h nach dem Auftragen der FITC-Lösung die Versuchstiere getötet und die drainierenden Lymphknoten präpariert. Mandibulare, zervikale, mediastinale und axiale Lymphknoten wurden steril entnommen und in eine mit 5 ml kaltem Waschmedium gefüllte Petrischale überführt. Die Lymphknoten wurden zwischen den rauen Seiten zweier abgeflammter Mattrand-Objektträger zerrieben. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen überführt, sedimentiert (300 x g, RT, 8 min) und einmal mit Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Testmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.2.10 Präparation von murinen Milzzellen

Für die Präparation der Milz wurde die Maus zunächst getötet und die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Milz wurde in eine Petrischale mit 20 ml kaltem Waschmedium überführt und zwischen den rauen Enden zweier abgeflammter Mattrand-Objektträger zerrieben. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen überführt und sedimentiert. Die in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten wurden durch die Zugabe von 1 ml Gey'schem Lysepuffer pro Milz lysiert. Nach der Inkubationszeit von einer Minute wurde die Lyse durch Zugabe von 50 ml kaltem Waschmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und nach zwei weiteren Waschschriften in 10 ml warmem Waschmedium resuspendiert.

2.2.11 Aufreinigung von murinen T-Zellen über Nylonwolle-Säulen

Die Aufreinigung muriner T-Zellen erfolgte aus einer Milzzellsuspension über Nylonwolle-Säulen. Im Gegensatz zu B-Zellen, Makrophagen und DCs adhären T-Zellen nicht an Nylonwolle und können somit aus einer heterogenen Zellpopulation isoliert werden²⁰⁴. Für die Herstellung der Säulen wurden 0,6 g Nylonwolle mit zwei gezähnten Pinzetten fein gepulvert und in eine 10 ml Spritze transferiert. Die mit Nylonwolle gefüllte Spritze wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und anschließend autoklaviert. Die sterilen Nylonwolle-Säulen wurden mit 20 ml warmem Waschmedium äquilibriert, Luftblasen mit einer abgeflamten Pinzette entfernt und das Volumen der Nylonwolle auf 6 ml reduziert. Die Säulen wurden anschließend für 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Säulen in neue 50 ml-Röhrchen überführt und erneut mit 10 ml warmem Waschmedium äquilibriert. Danach wurde die Zellsuspension von maximal zwei Milzen in 1 ml auf die Säule geladen. Abschließend wurde 1 ml warmes Waschmedium auf die beladene Säule gegeben, damit alle Zellen in die Nylonwolle einsickern. Nach der Inkubation der Säulen im Wasserbad für 45 min bei 37°C folgte die Elution der T-Zellen. Hierzu wurde der Deckel eines neuen 50 ml-Röhrchen mit 70%igem Ethanol gesäubert und mit einer Kanüle (0,7 x 30 mm) durchstoßen. Durch das Loch wurde eine neue Kanüle geführt, auf die die Spritze mit der zellbeladenen Nylonwolle gesteckt wurde. Die T-Zellen wurden mit 20 ml warmem Waschmedium und einer Fließgeschwindigkeit von ungefähr einem Tropfen pro Sekunde eluiert. Zum Abschluss wurde die T-Zell-reiche Suspension sedimentiert (300 x g, RT, 8 min), in warmem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.2.12 Proliferationstest

Mit Hilfe dieses Tests wurde der Einfluss von TPT und GA auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien HEK293T und IGROV1 sowie humaner T-Zellen untersucht. Die Proliferation wurde über den Einbau Tritium-markierten Thymidins (³HTdR) in die DNA sich teilender Zellen gemessen. Für den Proliferationstest wurden in Triplikatanalysen 2 x 10⁴ HEK293T- bzw. IGROV1-Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte eingesät. Die Zellen wurden über eine Reihe seriell 1:2 verdünnt. Die T-Zellen wurden in einer Zelldichte von 1 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte in Triplikatanalysen eingesät. Zusätzlich wurden zu den T-Zellen 5% Serum und IL-2 (10 U/ml) gegeben und Aliquots der T-Zellen wurden polyklonal mit anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (0,5 µg/ml) stimuliert. Zu den verschiedenen Zelltypen wurden TPT bzw. GA in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Ansätze bei 37°C und 5% CO₂ (Zelllinien) bzw. 10% CO₂ (T-Zellen) inkubiert. Nach 48 h wurden zu den Zellen 0,25 µCi ³HTdR zugegeben und die Ansätze für weitere 16 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.13 Gemischte Lymphozyten Reaktion

Bei einer primären gemischten Lymphozyten Reaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) werden APC und allogene T-Zellen kokultiviert, um die Fähigkeit der APC, T-Zellen zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen, zu analysieren. Als APC wurden entweder humane DCs, die aus PBMCs generiert wurden, oder murine BM-DCs, die aus Knochenmark-Vorläuferzellen generiert wurden, verwendet. Die DC-Populationen wurden auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die humanen T-Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, die murinen T-Zellen, die mittels Nylonwollsäulen isoliert wurden (Punkt 2.2.11), wurden auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Versuche wurden in 96-Loch-Platten durchgeführt. Die DCs wurden in Triplikatansätzen über eine oder zwei Reihen der 96-Loch-Platte seriell 1:2 verdünnt. Begonnen wurde mit einer DC-Zahl von 2×10^4 Zellen/Loch. Von der T-Zellsuspension wurden jeweils 100 μ l, also 1×10^5 Zellen/Loch (human) oder 3×10^5 Zellen/Loch (murin) zu den DCs pipettiert. Zu der humanen T-Zell-Suspension wurde zusätzlich 5% (v/v) Plasma gegeben. Das Gesamtvolumen pro Vertiefung betrug 200 μ l.

Für die Bestimmung der proteinspezifischen Proliferation von T-Zellen wurden BM-DCs am Tag acht mit OVA-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen beladen. Dazu wurde in die Zellkultur die entsprechende Menge OVA zugegeben und für weitere 24 h im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Am Tag neun wurden die Zellen, wie unter Punkt 2.2.8 beschrieben, geerntet. T-Zellen wurden aus OT-I bzw. OT-II Mäusen isoliert und die Zellzahl auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Diese Mäuse besitzen einen transgenen OVA-spezifischen TCR, wodurch eine OVA-spezifische Proliferation gemessen werden kann. Die OVA beladenen BM-DCs wurden ebenfalls in Triplikatansätzen über eine Reihe der 96-Loch-Platte seriell 1:2 verdünnt. Dabei wurde mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/Loch begonnen. Von der T-Zellsuspension wurden jeweils 100 μ l (5×10^4 Zellen/Loch) zu den DCs pipettiert. Als Negativkontrollen dienten Triplikatansätze der verwendeten APC ohne T-Zellen und T-Zellen ohne APC. Die Kokultivierung der APC und T-Zellen erfolgte bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank über einen Zeitraum von drei Tagen (murin) bzw. vier Tage (human). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde zu den Zellen 0,25 μ Ci ³HTdR pro Loch zugegeben und für weitere 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Platten bis zur Messung bei -20°C gelagert.

DC/T-Zell-Kokulturen im 12-Loch-Format wurden durchgeführt, um Kulturüberstände für Zytokin-ELISA zu erhalten. Hierfür wurden 2×10^5 APC und 1×10^6 T-Zellen (human) bzw. 3×10^6 T-Zellen (murin) in 1 ml für drei Tage bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank kokultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände aus den Vertiefungen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.14 Messung von Radioaktivität

Für die Messung des genomisch inkorporierten, tritiummarkierten Thymidins proliferierender Zellen, wurden die lysierten Zellen mittels eines Zellerntegeätes auf eine Membran übertragen. Die Membran wurde in einer Mikrowelle getrocknet und in einer Plastikfolie zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt. Die Szintillationsflüssigkeit diente dazu, die schwache β -Strahlung des $^3\text{HTdR}$ messen zu können, indem Substanzen in der Flüssigkeit durch die radioaktive Strahlung dazu angeregt wurden, Lichtblitze zu emittieren. Diese Impulse wurden mit Hilfe eines Szintillationszählers (β -Counter) als Anzahl pro Minute (*counts per minute*, cpm) gemessen.

2.2.15 Zytotoxizitätstest (CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay)

Die Zytotoxizität von TPT und GA wurde mittels eines 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Tests ermittelt. MTT ist ein gelber, wasserlöslicher, membrangängiger Farbstoff, der durch mitochondriale Enzyme lebender Zellen metabolisiert wird, was zur Bildung von blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan-Kristallen führt. Durch die Zugabe der Solubilisationslösung werden die Zellen lysiert und die Formazan-Kristalle löslich. Anschließend kann das farbige Produkt mittels eines Spektralphotometers durch kolorimetrische Messung bei 570 nm quantifiziert werden und so die Viabilität der Zellen ermittelt werden. Zur Ermittlung der Zellviabilität von humanen DCs nach Behandlung mit den vorgenannten Chemotherapeutika wurden die Zellen an Tag sechs geerntet. In einer 96-Loch-Platte wurden pro Loch 2×10^4 Zellen in 100 μl Kulturmedium eingesät. Für den Test wurden Triplikatansätze unstimulierter DCs angesetzt. Anschließend wurden GA bzw. TPT in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und Aliquote der Zellen wurden mit dem Reifungscocktail stimuliert. Die Ansätze wurden für 48 h (Dauer der Ausreifungsphase) im Brutschrank bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Für die Ermittlung der Zellviabilität der Zelllinien HEK293T und IGROV1 wurden die Zellen geerntet und jeweils 2×10^4 Zellen in 100 μl Kulturmedium pro Loch einer 96-Loch-Platte eingesät. Zu den Zellen wurden dann GA bzw. TPT in verschiedenen Konzentrationen in Triplikatanätzen hinzu pipettiert.

Nach der Inkubationszeit von 48 h wurden in jedes Loch der 96-Loch-Platte 15 μl der MTT-Lösung hinzu pipettiert und die Platten für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 μl Solubilisationslösung gestoppt und die Intensität der Färbung bei 570 nm im Spektralrometer gemessen. Anhand der unbehandelten Kontrolle konnte somit die Zytotoxizität von GA und TPT bestimmt werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation der DNA aus Zellen

Die Präparation genomischer DNA (gDNA) erfolgte mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit von der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte gDNA wurde im mitgelieferten AE-Puffer eluiert.

2.3.2 Präparation der DNA aus tierischem Gewebe

Für die Bestimmung des Genotyps der gezüchteten Mäuse wurden Ohr- bzw. Schwanzbiopsien durchgeführt. Hierzu wurde das Gewebe mit 750 µl Schwanz-Lysepuffer und 2 µl Proteinase K (200 µg/ml) über Nacht bei 54°C auf einem Schüttler verdaut. Am nächsten Tag wurden zu dem verdauten Gewebe 250 µl 5 M NaCl gegeben und die unverdauten Gewebereste bei 16.000 x g und RT für 30 min sedimentiert. Im Anschluss wurden 750 µl Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die DNA-Fällung wurden zu dem Überstand 750 µl Isopropanol zugefügt, mehrfach invertiert und bei 16.000 x g und RT für 30 min sedimentiert. Das DNA-haltige Sediment wurde zweimal mit 500 µl 75 % Ethanol für 10 min bei 16000 x g und RT gewaschen. Anschließend wurde die genomische DNA getrocknet und in 100 µl *Aqua bidest.* resuspendiert.

2.3.3 Präparation von RNA

Die Präparation der RNA wurde mit QIAshredder® und dem RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert.

2.3.4 Reverse Transkription der RNA

Die Methode der reversen Transkription basiert auf dem Einsatz der reversen Transkriptase, einer RNA- und DNA-abhängigen DNA-Polymerase, mit deren Hilfe aus RNA sequenzkomplementäre DNA (cDNA) synthetisiert wird. Für die reverse Transkription wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad verwendet.

cDNA-Synthese-Parameter

| Temperatur | Zahl der Zyklen | Dauer |
|------------|-----------------|--------|
| 25°C | 1 | 5 min |
| 42°C | 1 | 30 min |
| 85°C | 1 | 5 min |

Nach der reversen Transkription wurde der cDNA-Gehalt photometrisch bestimmt und die Probe bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung wurde mittels eines Photometers oder mit Hilfe des NanoDrops durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen. Zusätzlich wurde auch die optische Dichte bei 280 nm bestimmt, bei der Proteine ihr Absorptionsmaximum besitzen, um die RNA- bzw. DNA-Lösung auf eine Kontamination durch Proteine zu überprüfen. Der Quotient der beiden Werte (OD_{260}/OD_{280}) beschreibt das Verhältnis von Nukleinsäuren zu Protein in der Lösung. In einer weitgehend proteinfreien Lösung liegt der Wert ungefähr zwischen 1,8 und 2,0.

2.3.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, QPCR), auch *Real Time* PCR genannt, ist eine präzise und sensitive Methode zur Quantifizierung von cDNA. Um die PCR-Produkte quantifizieren zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green verwendet. Die nach jedem PCR-Zyklus gemessene Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge an doppelsträngiger DNA. In dieser Arbeit wurde die QPCR mit dem Absolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix der Firma Thermo Scientific nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Messung erfolgte im Thermozykler (ABI 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) nach folgenden Parametern:

QPCR-Zyklus-Parameter

| Temperatur | Zahl der Zyklen | Dauer |
|------------|-----------------|--------|
| 95°C | 1 | 15 min |
| 95°C | | 15 s |
| 60°C | 50 | 1 min |
| 95°C | | 30 s |
| 60°C | 1 | 30 s |
| 95°C | | 15 s |

Die Auswertung der QPCR erfolgte mit der 7300 System Software Version 1.4.0.

2.3.7 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Bei der PCR können durch Oligonukleotide definierte DNA-Fragmente enzymatisch amplifiziert werden²⁰⁵. Die einzelnen Schritte der PCR umfassen die Denaturierung der Matrize (95-98°C), Anlagerung der Oligonukleotide an den Einzelstrang (*annealing*, 55-70°C) und die Kettenverlängerung (*extension*). Die Neusynthese der DNA erfolgt mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Für den Nachweis von AcCre wurde MyTaq DNA-Polymerase (Bioline, Luckenwalde) und für VHL1^{fl/fl} bzw. VHL2^{fl/fl} GoTaq DNA-Polymerase (Promega, Heidelberg) jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet.

PCR-Zyklus-Parameter

| Temperatur | Zahl der Zyklen | Dauer |
|------------|-----------------|-------|
| 94°C | 1 | 5 min |
| 94°C | | 30 s |
| 60-63°C | 34 | 1 min |
| 72°C | | 1 min |
| 72°C | 1 | 7 min |
| 4°C | | ∞ |

Anschließend wurden 7-15 µl der amplifizierten DNA auf 1% (w/v) Agarosegelen analysiert.

2.3.8 Agarose Gelelektrophorese

Mit dieser Methode können Nukleinsäure-Fragmente nach ihrer molekularen Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei bewegen sich die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle in einem Spannungsfeld durch die Agarosematrix von der Kathode zur Anode. Je konzentrierter die Agarose ist, desto kleiner sind die Poren der Matrix und umso kleinere Fragmente können aufgetrennt werden. Die Auftrennung erfolgte in 1%igen (w/v) Agarosegelen. Hierzu wurde Agarose abgewogen und in der entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Vor dem Aushärten des Gels wurde zur späteren Visualisierung der Nukleinsäure-Fragmente GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) zugefügt. Nach dem Aushärten des Gels in einer Gelapparatur (Roth) wurden die Proben und ein Größenstandard (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die angelegte Spannung betrug zwischen 80-150 V. Die photographische Auswertung erfolgte mit dem Geldokumentationsgerät und der gerätespezifischen Analyse-Software.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Extraktion von Proteinen aus Zellen

Alle Arbeitsschritte für die Gewinnung von Proteinen aus Zellen erfolgten auf Eis unter Verwendung von auf 4°C gekühlten Puffern und Lösungen. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben geerntet, mit 1x PBS gewaschen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Das Zellsediment wurde je nach Größe in 300 - 1000 µl RIPA-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 16.000 x g und 4°C für 10 min sedimentiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Sicherheitsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe von Roti®-Quant der Firma Roth. Roti®-Quant enthält den Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue-G520*. Durch die Bindung des Farbstoffes an Proteine, hauptsächlich an basische Aminosäuren, wird sein Absorptionsverhalten geändert. Für die Messung der Proteinkonzentration wurde 1 µl Proteinextrakt in 799 µl *Aqua bidest.* verdünnt und mit 200 µl Roti®-Quant versetzt.

Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde die Proteinlösung im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Anhand der bekannten Konzentrationen einer ebenfalls gemessenen BSA-Standardreihe wurde eine lineare Regressionsfunktion erstellt, anhand der die Protein-Konzentration der Probe bestimmt werden konnte.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse komplexer Proteinmischungen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt, bei der Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-Page durchgeführt, bei der das Fertiggelsystem (Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX Precast Gel) von Bio-Rad verwendet wurde. Für die Vorbereitung der Proben wurden jeweils 50 µg des Proteinextraktes mit Gelladepuffer (SDS Blue Loading Buffer) versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf Eis kurz abgekühlt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die SDS-Page erfolgte mit 1x Laufpuffer bei einer Spannung von 160 V.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Immunblot

Beim Immunblot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und so eine Antikörper-vermittelte Detektion einzelner Proteine ermöglicht. Zunächst wurden die Schwammplatten, das Whatman-Filterpapier und die Nitrozellulose-Membran mit Transferpuffer befeuchtet. Das Gel wurde aus der Halterung genommen und in Transferpuffer äquilibriert. In der nachstehenden Reihenfolge wurde die Kassette des Transfertanks blasenfrei zusammengebaut: Anode, Schwammplatte, Whatman-Papier, Trenngel, Nitrozellulose-Membran, Whatman-Papier, Schwammplatte, Kathode. Der Transfertank wurde mit einem Kühlakku versehen und mit Transferpuffer befüllt. Der Transfer erfolgte bei 30 V über Nacht bei RT.

2.5.2 Immundetektion von Proteinen

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran für 5 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und danach für 1 h bei RT in Blockierungslösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blockieren wurde die Membran noch ein weiteres Mal für 5 min gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde ungebundener Antikörper durch einen Waschschrift (3 x 10 min) entfernt und die Membran mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf folgend wurde die Membran ein weiteres Mal gewaschen (1 x 10 min, 4 x 5 min). Die Detektion basiert auf Chemilumineszenz. Dabei katalysiert das Enzym HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, wobei die oxidierungsabhängige Lichtemission detektiert werden kann. Hierzu wurde die Membran mit 2 ml ECL plus (PerkinElmer) für 1 min inkubiert und anschließend in eine Filmkassette transferiert. In der Dunkelkammer wurden durch Auflegen von Röntgenfilmen und bei unterschiedlich langer Exposition die Proteinbanden sichtbar gemacht.

Für weitere Protein-Nachweise auf der Membran wurde diese zunächst mit Waschpuffer gewaschen (5 min) und danach jeweils für 5 min in *Aqua bidest.* und 0,2 M NaOH (in *Aqua bidest.*) geschwenkt. Hierdurch wurden die noch gebundenen Antikörper von der Membran gelöst. Nach erneutem Blockieren und Waschen konnte die Membran wiederholt mit Antikörpern inkubiert werden.

2.5.3 Magnetische Anreicherung humaner CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs

Die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs erfolgte mittels immunmagnetischer Separation. Dazu wurden die PBMCs zunächst sedimentiert (400 x g, 5 min, 4°C), in 300 µl pro 10⁷ Zellen *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS[®])-Puffer aufgenommen und 2 µl pro 10⁷ Zellen *α-CD4-Microbeads* zugegeben. Die Zellsuspension wurde gut resuspendiert und anschließend bei 4°C für 25 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Säulen (LS) in ein starkes magnetisches Feld (QuadroMACS[™] Separator) gebracht und anschließend mit 6 ml MACS[®]-Puffer gespült. Danach wurden die ungebundenen anti-CD4-*Microbeads* über einen Waschschrift mit 1x PBS entfernt (400x g; 5 min; 4° C) und das Zellsediment in 1 ml MACS[®]-Puffer aufgenommen. Bevor die Zellsuspension auf die Säulen gegeben wurde, wurden unter die Säulen 50 ml-Röhrchen gestellt, um den Durchfluss aufzufangen. Danach folgten drei Waschschriffe mit jeweils 3 ml MACS-Puffer, um zu gewährleisten, dass sich nur noch Zellen in der Säule befinden, die aufgrund der

spezifischen Bindung des Antikörpers und der magnetischen Eigenschaften der gebundenen anti-CD4-*Microbeads* dort festgehalten werden. Somit wird sowohl die Reinheit der CD4⁺-Population als auch die Ausbeute an CD4-negativen Zellen erhöht. Die CD4-negativen Zellen aus dem Durchfluss wurden sedimentiert (400 x g; 5 min; 4° C), in IMDM-Medium aufgenommen und anschließend sofort für die Aufreinigung von Monozyten verwendet oder eingefroren. Die Säulen wurden aus dem Magneten genommen und auf ein neues 15 ml-Röhrchen transferiert. Um die CD4⁺-Zellen aus der Säule zu eluieren, wurde diese mit ca. 6 ml MACS[®]-Puffer gefüllt, welcher mit einem Stempel durch die Säule gepresst wurde. Die so gewonnenen CD4⁺-Zellen wurden in IMDM-Medium aufgenommen und wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben weggefroren.

2.5.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) dient der semiquantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf Einzelzellebene. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei werden Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzmarker waren Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanin 5 (PE-Cy5), Allophycocyanin (APC) und Peridinin-Chlorophyll-Protein/Cyanin 5.5 (PerCP/Cy5.5). Die fluoreszenzmarkierten Zellen passieren durch einen Flüssigkeitsstrom nacheinander einen Laserstrahl, der die Fluorochrome zur Lichtemission anregt. Durch die zusätzliche Emission von Streulicht können zwei weitere Parameter der Zelle – die relative Größe und die Granularität ermittelt werden. Die Zellgröße wird mit dem Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) ermittelt, während das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) mit der Granularität korreliert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird in der Regel über eine Kombination aus lichtdurchlässigen Spiegeln, farbselektiven Bandpassfiltern und Photomultipliern von Photodetektoren detektiert. Die Emission erfolgt hierbei in einer für jedes Fluorochrom spezifischen Wellenlänge. Über einen Argon-Laser (488 nm) stehen die Fluoreszenzkanäle FL1 für 530 nm, FL2 für 585 nm und FL3 für >650 nm zur Verfügung. Über einen zweiten, roten Dioden-Laser (633 nm) kann ein weiterer Fluoreszenzkanal (FL4 für > 670 nm) manuell zugeschaltet werden. In dieser Arbeit wurden die Proben mit dem BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer (Becton Dickinson) gemessen, mit Hilfe von CellQuest II (Becton Dickinson) ausgewertet und mit FlowJo (Tree Star, Inc.) bearbeitet.

2.5.4.1 Oberflächenfärbung

Für die FACS-Messung humaner DCs wurden 10^5 Zellen in Rundbodenröhrchen überführt, zentrifugiert (400x g; 4°C; 5 min) und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Danach wurde das Zellsediment in 25 µl FcR Blocking Reagent (Verdünnung 1:10) resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde zu der Zellsuspension doppelt konzentrierter Antikörpermix zugegeben und für weitere 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Antikörper mit 1 ml FACS-Puffer ausgewaschen und das Zellsediment in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Für die Analyse von BM-DCs wurden 5×10^5 Zellen in Rundbodenröhrchen aufgeteilt und mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment zur Absättigung von Fc-Rezeptoren in 25 µl Anti-FcγRII/III-Antikörper (Verdünnung 1:100) resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden mit je 50 µl eines Antikörpermix für 15 min bei 4°C gefärbt. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Antikörper mit 1 ml FACS-Puffer ausgewaschen und das Zellsediment in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Für den Fall, dass eine sofortige Messung nicht erfolgen konnte, wurden die Zellen mit 1x PBS/0,7% PFA fixiert. Für die Einstellungen und die Justierung des Durchflusszytometers und Kompensation der Fluorochrome wurden Kontrollfärbungen, wie zum Beispiel ungefärbte Zellen, Isotypkontrollen und Einzelfärbungen, mitgeführt.

2.5.4.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Färbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen zunächst geerntet, 2×10^5 (human) bzw. 5×10^5 (murin) Zellen in Rundbodenröhrchen überführt und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Für die Fascin-Färbung der humanen DCs wurden die Zellen zunächst mit 500 µl Methanol für 10 min bei 4°C permeabilisiert. Nach dem Inkubationsschritt wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (400 x g, 4°C, 5 min), wie unter Punkt 2.5.4.1 beschrieben, die Fc-Rezeptoren blockiert und die Zellen mit dem anti-Fascin-Antikörper sowie einem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Vor der intrazellulären Färbung von CD207 wurde zunächst die Färbung der Oberflächenmarker durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 500 µl Fixier-/Permeabilisierungslösung (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für 30 min bei 4°C fixiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurde zu den Zellen 1 ml Permeabilisierungspuffer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) zugegeben.

Dann wurden die Zellen sedimentiert, in je 50 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert und für 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD207-PE (Verdünnung 1:20) für 20 min bei 4°C gefärbt. Nach einem Waschschriff mit 1 ml Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung im Durchflusszytometer bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.5.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wird zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die indirekte Sandwich-ELISA-Methode verwendet, bei der ein Primärantikörper (*Capture*-Antikörper), der spezifisch für das zu untersuchende Zytokin ist, an eine Kunststoffoberfläche gebunden wird (*coating*). Im Anschluss wird der Zellüberstand zugegeben, so dass die darin enthaltenen Zytokine an die Antikörper binden können. Zur Detektion werden zytokinspezifische, biotinylierte Sekundärantikörper (Detektionsantikörper) zugegeben, die an ein anderes Epitop des Zielproteins binden. Im nächsten Schritt wird eine Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase zugegeben, welche an Biotin bindet und die Umwandlung des farblosen Substrats OPD in ein photometrisch messbares Produkt katalysiert. Durch Mitführung einer definierten Standardlösung des jeweiligen Zytokins kann so die Konzentration in dem Zellüberstand ermittelt werden. Die Messung der Zytokinkonzentration wurde in einer 96-Loch-Platte mit hoher Bindungsaffinität durchgeführt. Für den ELISA der murinen Kulturüberstände wurden zunächst die Primärantikörper in 1 M NaHCO₃ (IFN-γ, IL-5) bzw. in 1x PBS (IL-10, IL-17A) verdünnt und die Kunststoffoberflächen der Vertiefungen mit 50 µl Primärantikörper beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Platte zweimal im ELISA-Waschgerät gewaschen. Anschließend wurden mit 150 µl Blockierungslösung pro Vertiefung freie Bindungsstellen blockiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte einmal gewaschen. Anschließend wurden in Duplikatansätzen die Zellkulturüberstände und das in Blockierungslösung verdünnte Standardzytokin in einem Volumen von jeweils 100 µl in die jeweiligen Löcher pipettiert und seriell in 50 µl Blockierungspuffer 1:2 verdünnt. Um später den unspezifischen Hintergrund von den gemessenen Werten abziehen zu können, wurden in vier Vertiefungen lediglich 50 µl ELISA-Puffer pipettiert (Nullwert). Die Inkubation der Überstände und der Standards erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach zwei Waschschriffen im ELISA-Waschgerät wurden am nächsten Tag 50 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C (IFN-γ, IL-5) bzw. bei RT (IL-10, IL-17A) wurden die überschüssigen Antikörper durch zweimaliges Waschen entfernt und ExtrAvidin (Verdünnung 1:2.000 in Blockierungspuffer) zugegeben.

Die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten-Streptavidin erfolgte für eine Stunde bei RT. Im Anschluss wurde durch viermaliges Waschen ungebundenes Enzym entfernt. Im nächsten Schritt wurde die enzymatische Nachweisreaktion durchgeführt, wobei zunächst in jede Vertiefung 50 µl Substratlösung (1 mg/ml OPD in Substratpuffer gelöst), versetzt mit 1 µl/ml H₂O₂, gegeben wurde. In den Vertiefungen, in denen das Zytokin vorhanden war, zeigte sich dann ein zur Zytokin-Konzentration proportionaler Farbumschlag von farblos zu gelb. Nach Eintreten des Farbumschlages wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung pro Loch abgestoppt. Die Intensität der Färbung wurde anschließend in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Nach Subtraktion des Nullwertes konnte durch die mitgeführten Zytokin-Standardkonzentrationen eine lineare Regression berechnet und anhand dieser die Konzentration der Zytokine bestimmt werden.

2.5.6 Immunglobulin-ELISA

Um OVA-spezifische Immunglobuline (IgE, IgG) im Serum von Mäusen nachzuweisen, wurde ein Ig-ELISA durchgeführt. Dazu wurde eine 96-Loch-Platte mit hoher Bindungskapazität mit 100 µl OVA-Lösung (50 µg/ml in 0,1 M NaHCO₃) je Loch beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Lösung wurde ausgeschlagen und freie Bindungsstellen mit 200 µl 1% BSA in 1x PBS je Vertiefung blockiert. Nach der Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Blockierungslösung ausgeschlagen und die Seren in einer geeigneten Verdünnung aufgetragen. Die Seren wurden über 10 Stufen seriell 1:2 titriert. Ein Kontrollansatz wurde anstatt mit OVA-haltiger Lösung mit 1x PBS/1% BSA beschichtet, zusätzlich enthielten weitere Kontrollansätze anstatt Serum 1x PBS/1% BSA. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 4°C über Nacht. Nach einem zweimaligen Waschschrift wurde entweder ein biotinylierter anti-IgG1 bzw. anti-IgG2-Antikörper (1:5000) oder ein anti-IgE-Primärantikörper (1:1000) in einem Volumen von 100 µl je Loch auf die Platte pipettiert und für 45 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden im Fall von anti-IgE 100 µl je Loch biotinylierter, isotypspezifischer Sekundärantikörper zugegeben und weitere 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde ungebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen entfernt. Im Anschluss erfolgte die enzymatische Nachweisreaktion wie unter Punkt 2.5.5 beschrieben.

2.5.7 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden zunächst Zytospinpräparate hergestellt. Hierzu wurden die Zellen geerntet, mit 1x PBS gewaschen und die Zellzahl auf 1×10^5 Zellen in 30 µl eingestellt. Für den nächsten Schritt wurde zuerst die Zytospinvorrichtung zusammengebaut.

Dafür wurden ein Objektträger, eine Filterkarte und ein Zytologie-Trichter in einer Klemme eingespannt. Die Filterkarte dient der Aufnahme überschüssiger Flüssigkeit. Anschließend wurde die Zellsuspension in den Zytologie-Trichter pipettiert und die Ansätze in einer Zytospinzentrifuge für 2 min bei 500 UpM und bei mittlerer Beschleunigung auf die Objektträger zentrifugiert. Die Zytospinpräparate wurden über Nacht an der Luft getrocknet und bis zu weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Färbung wurden die Präparate zunächst mit Aceton bei -20°C für 5 min fixiert. Nach einmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Zytospinpräparate in Blockierungslösung für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Primäantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit Waschpuffer gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit einem Fluorochrom-konjugierten Sekundäantikörper und mit DAPI für die Zellkernfärbung für 1 h bei RT in der feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zytospinpräparate mit einem Deckgläschen unter Verwendung von Vectashield®-Eindeckmedium eingedeckelt. Die Schnittbilder wurden mit einem CSLM (LSM SP5 STED Leica Laser Scanning Confocal Mikroskop, Leica, Wetzlar) aufgenommen. Das CLSM besteht aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (DMI 6000 CS), das mit einer Multilaserkombination und fünf verschiedenen Detektoren, die eine Wellenlänge von 400-800 nm detektieren, ausgestattet ist. Für die Aufnahme wurde ein HCX PL APO CS 100 x 1,4 Ölobjektiv verwendet. Die Bildverarbeitung wurde mit Leica LAS AF lite und die Bildanalyse mit der Software Volocity 6.0.1 (PerkinElmer, Rodgau) durchgeführt. Anschließend wurden die Bilder in Adobe Photoshop weiter bearbeitet. Die konfokale Laserscanningmikroskopie wurde freundlicherweise von Dr. S. Ritz am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz durchgeführt.

2.5.8 Endozytose-Assay

Für den Nachweis einer Endozytose über Makropinozytose bzw. den Mannose-Rezeptor wurden FITC-Dextran, DQ-OVA und AF-OVA verwendet. Die DCs wurden geerntet, gewaschen und jeweils 2×10^5 humane Zellen bzw. 5×10^5 murine Zellen in einem Volumen von 50 µl Medium in Rundbodenröhrchen überführt. Die Zellen wurden jeweils mit den oben genannten Dextran- bzw. OVA-Derivaten parallel bei 4°C (Kontrolle) und bei 37°C im Brutschrank inkubiert (10, 30, 60 min). Die Endozytose wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten durch schnelles Abkühlen der Röhrchen auf Eis abgestoppt. Im Fall von FITC-Dextran wurden die Zellen anschließend noch dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und mit einem Antikörper gegen CD11c-APC gefärbt. Die Zellen wurden umgehend am Durchflusszytometer gemessen.

2.5.9 in vitro-Migration

Die in vitro-Migration wurde in einer Kollagenmatrix durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 5 µl 7,5%iges Na₂CO₃ und 10 µl 10x MEM gemischt, danach 75 µl PureCol[®] Rinderkollagen I zugegeben und 67 µl dieser Lösung zu 33 µl Zellsuspension (3 x 10⁵ DCs) gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension in den Zwischenraum von Deckgläschen und Objektträger pipettiert und zur Polymerisierung im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C für 45 min inkubiert. Die in vitro-Migration der Zellen wurde simultan über einen Zeitraum von ca. 6 h im Zeitraffer mit einem Olympus BX61 Mikroskop beobachtet. Die Bilder wurden alle 2 min von einer FView Kamera aufgenommen und mit der Software Cell^P (SIS, Münster) analysiert.

2.6 Tierexperimentelle Arbeiten

2.6.1 in vivo-Migration

Die in vivo-Migration der DCs wurde mit der Methode nach Pior et al.²⁰⁶ nachgewiesen. Hierzu wurde Mäusen auf ein Ohr eine FITC-Lösung aufgetragen und nach einem bestimmten Zeitraum die Migration der DCs in die drainierenden Lymphknoten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurde zunächst die FITC-Stammlösung angesetzt. DBP wurde mit Aceton 1:1 vermischt und dazu wurden 5% (v/v) DMSO zugegeben. In 15 µl dieser Lösung wurden anschließend 500 µg FITC gelöst. Die FITC-Stammlösung wurde anschließend auf die Innen- und Außenseite eines Ohres einer mit Forene[®] betäubten Maus aufgebracht. Nach 24 h wurde die Maus getötet und die drainierenden Lymphknoten entnommen (Punkt 2.2.9). Die Lymphknotenzellen wurden anschließend mit Antikörpern gegen CD11c, CD207 und MHCII gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

2.6.2 Immunisierung und Provokation

An den Tagen 0, 7 und 14 wurde den zu sensibilisierenden Mäusen nach Desinfektion der Injektionsstelle mit 70% Ethanol 200 µl OVA (100 µg) adsorbiert an Aluminiumhydroxid intraperitoneal injiziert. Um eine Verletzung innerer Organe und Gefäße durch die Injektionsnadel weitgehend auszuschließen, wurde als Injektionsort der rechte oder linke untere Quadrant des Abdomens gewählt. An den Tagen 25-27 erfolgte die intranasale Provokation mit OVA. Hierfür wurden die Tiere in eine Aerosolkammer gesetzt und mit für 30 min mit 1% OVA in 1x PBS vernebelt. Die OVA-Lösung wurde durch die Vernebelung von

den Mäusen eingeatmet. Kontrollmäusen wurden analog 1x PBS/Aluminiumhydroxid intraperitoneal injiziert und entsprechend mit 1x PBS vernebelt.

2.6.3 Lungenfunktionsmessung

In den letzten Jahren wurden viele verschiedene Techniken entwickelt, um den Phänotyp von Lungenkrankheiten im experimentellen Modell zu charakterisieren²⁰⁷. Prinzipiell kann man zwischen der nicht-invasiven Methode und invasiven Methode unterscheiden. Bei der nicht-invasiven Methode, wie der Ganzkörperplethysmographie wird die Maus nicht narkotisiert und sitzt frei beweglich in einer Kammer. Die Bronchokonstriktion wird durch den Druckabfall in der Kammer gemessen²⁰⁷.

In der vorliegenden Arbeit wurde die invasive Methode angewendet, dazu wurden die Mäuse mit einer Phenobarbital-Lösung narkotisiert und bei Erreichen der chirurgischen Toleranz die Trachea und der Ösophagus frei präpariert. Nach Freilegen der Trachea wurde den Tieren ein Trachealtubus minimal invasiv implantiert. Das so intubierte Tier wurde anschließend in eine Kammer der Firma BUXCO® eingespannt, wobei es über den Ösophagus zusätzlich mit einem Schlauch intubiert wurde, der mit einem Druckmessfühler verbunden ist. Für die Messung des Atemwegswiderstands wurde die Kammer verschlossen, um äußere Einflüsse zu vermeiden. Die Beatmung der Maus wurde durch den implantierten Trachealtubus, der mit einer frei einstellbaren Pumpe verbunden war, sicher gestellt. Der Atemwegswiderstand wurde nach einem fixen Protokoll gemessen. Als erstes wurde die Grundaktivität der Atemwege über einen Zeitraum von 60 s bestimmt. Jeweils im Anschluss wurden für 30 s unterschiedliche Methacholin-Dosen (0-50 mg/ml) mit Hilfe eines Verneblers, der mit dem Trachealtubus verbunden ist, verabreicht. Die über ein T-Stück mit dem Trachealtubus verbundene Ventilationseinheit sorgte für einen gleichmäßigen Luftstrom, der das vernebelte Methacholin in die Lunge befördert. Damit wurde eine direkte Wirkung des Methacholins gewährleistet. In einem dritten Schritt wurde die bei der Atmung entstehende Druckdifferenz und somit die Änderung des Atemwiderstandes aufgezeichnet und später mit einer speziellen Software (BioSystem XA) des Herstellers ausgewertet. Hierfür wurde die isovolumetrische Methode zu Grunde gelegt, bei der die Veränderung des Ein- und Ausatemdrucks bezogen auf ein kalibriertes Volumen berechnet wurde. Der Atemwegswiderstand wird als *Resistance* (RI (cm H₂O x s/ml)) angegeben.

3 Ergebnisse

Tumore sind durch eine charakteristische Erhöhung der HIF-Expression gekennzeichnet. Diese vermehrte Expression wird einerseits durch die Tumormikroumgebung, hierbei vorrangig durch eine vorherrschende Hypoxie und andererseits durch Mutationen des Tumorsuppressorgens *VHL* hervorgerufen. Durch die Überexpression von HIF werden das Tumorwachstum und die Metastasierung begünstigt, da Zielgene von HIF maßgeblich an der Angiogenese und Vaskularisierung beteiligt sind. Aus diesem Grund stellt HIF ein interessantes Ziel in der Tumorthherapie dar. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss zum einen HIF-Inhibitoren und zum anderen ein partieller Verlust des *VHL*-Gens auf die Ausprägung des Phänotyps und Funktion von DCs besitzen.

3.1 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von humanen DCs nach Behandlung mit den Antitumor-Agenzien TPT und GA

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen der Antitumor-Agenzien Topotecan (TPT) und Geldanamycin (GA) auf den Phänotyp und die Funktion humaner DCs untersucht werden. Konventionelle Chemotherapie ist, neben operativen Eingriffen und Radiotherapie, die wichtigste Behandlung gegen Tumore²⁰⁸. In früheren Studien wurde dokumentiert, dass die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika nicht nur nachteilig für Tumorzellen ist, sondern auch das Immunsystem der Krebspatienten negativ beeinflussen kann^{209,210}. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass einige Chemotherapeutika durchaus in der Lage sind die Effizienz der Antitumor-Immunantworten zu erhöhen und somit die Tumorregression fördern^{192,211,212}.

DCs sind die potenteste APC-Population¹⁴⁰. Sie besitzen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung von adaptiven Immunantworten und sind somit essentiell für die Induktion von Antitumor-Immunantworten¹⁸⁰. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse zu wissen, welchen Einfluss die beiden Chemotherapeutika TPT und GA auf die Immunfunktionen von DCs haben.

3.1.1 Behandlung immortalisierter Zelllinien mit TPT und GA

Das Antitumor-Agens TPT ist ein TopI Hemmer, der in der Tumorthherapie vor allem bei Ovarialkarzinomen als *second-line* Chemotherapeutikum eingesetzt wird²¹³. Die Wirkungsweise von TPT beruht auf der Stabilisierung des TopI-DNA-*cleavable complex* (Spaltkomplex), was in Doppelstrangbrüchen resultiert und letztendlich einen Apoptose-induzierenden Effekt in proliferierenden Tumorzellen auslöst²¹⁴. Zunächst wurde dieser inhibitorische Effekt des Antitumor-Agens auf die Viabilität und die Proliferation der immortalisierten Zelllinien HEK293T und IGROV1 analysiert. Hierzu wurden die beiden Zelllinien für 48 h über einen großen Konzentrationsbereich mit TPT behandelt und die Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Testes ermittelt. Nach zwei Tagen Inkubation mit dem Chemotherapeutikum war die Viabilität von beiden Zelllinien dosisabhängig signifikant vermindert (Abbildung 3.1). Die Viabilität der Krebszelllinie HEK293T war bei einer TPT-Konzentration von 2,5 μM um die Hälfte reduziert, während die IGROV1-Zellen erst ab einer Konzentration von 5 μM eine Reduktion der Zellviabilität um 45% zeigten.

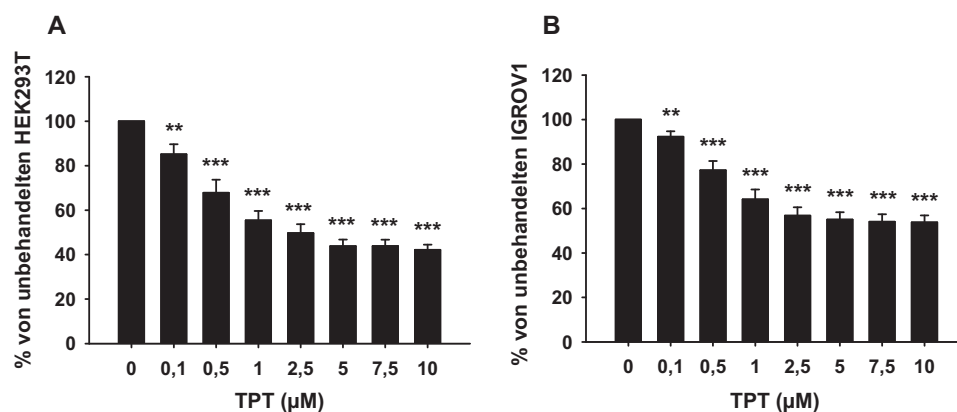


Abbildung 3.1 Die Viabilität von immortalisierten Zelllinien wird durch TPT beeinträchtigt.

(A) HEK293T-Zellen und (B) IGROV1-Zellen (jeweils $5 \times 10^4/0,1$ ml/Vertiefung) wurden mit der jeweils angegebenen TPT-Konzentration für 48 h behandelt. Die Viabilität der Zellen wurde anhand der NADH/NADPH-Oxidoreduktase-abhängigen Umsetzung von MTT zu Formazan kolorimetrisch (CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatansätze \pm Standardfehler von zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen und TPT-behandelten Zellen sind angegeben (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Da TPT aufgrund seiner Wirkungsweise die Replikation der DNA inhibiert und somit die Zellteilung und Zellvermehrung verhindert, wurde zusätzlich die Proliferation der Zelllinien nach Behandlung mit TPT untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 48 h mit verschiedenen TPT-Konzentrationen behandelt und die Proliferation über die Inkorporation von ³HTdR in die

DNA gemessen. Wurden beide Zelllinien in Anwesenheit von TPT kultiviert, verminderte sich die Proliferationsrate schon bei geringen TPT-Konzentrationen (0,5 μM) signifikant um mehr als 98%.

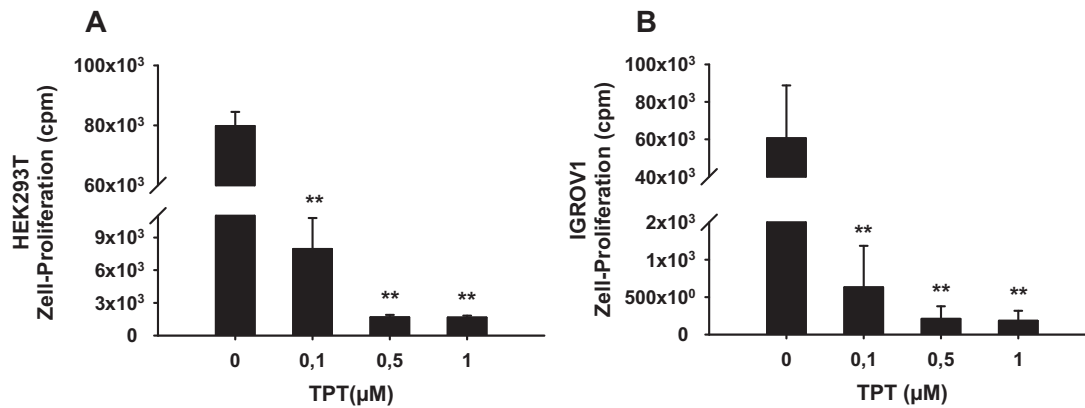


Abbildung 3.2 Die Proliferation von HEK293T und IGROV1 wird durch die Behandlung mit TPT vermindert.

(A) HEK293T-Zellen und (B) IGROV1-Zellen (jeweils $5 \times 10^4/0,1$ ml/Vertiefung) wurden mit der jeweils angegebenen TPT-Konzentration für 48 h behandelt. Die Proliferation der Zellen wurde anhand der Aufnahme von $^3\text{HTdR}$ während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsansätze \pm Standardfehler von zwei bzw. vier unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen und TPT-behandelten Zellen sind angegeben (** $p < 0,01$)

Das Chemotherapeutikum GA besitzt ebenfalls eine sehr potente Antitumoraktivität. Durch dessen irreversible Bindung an die N-terminale ATP-Bindetasche von HSP90 wird die Funktion des Chaperon-Komplexes inhibiert und somit die Proteasom-abhängige Degradation von krebsrelevanten Zielproteinen induziert⁵⁴. In präklinischen Studien wurde der antiproliferative Effekt von GA auf verschiedene Tumorzelllinien gezeigt²¹⁵. Anknüpfend an diese Untersuchungen wurde der Einfluss des Antitumor-Agens auf die beiden vorgenannten Zelllinien untersucht. Die Viabilität der Zellen wurde mittels eines MTT-Tests ermittelt (Abbildung 3.3). Beide Zelllinien zeigten dosisabhängig eine signifikant verminderte Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Während die Zelllinie HEK293T schon ab der geringsten Konzentration von GA (0,1 μM) sensitiv reagierte, stellte sich ein toxischer Effekt von GA bei IGROV1 erst ab einer Konzentration von 0,5 μM ein.

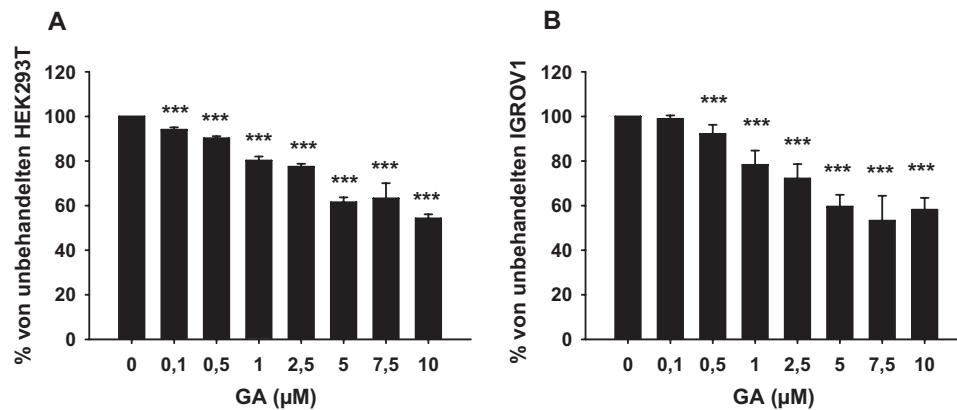


Abbildung 3.3 Die Viabilität von immortalisierten Zelllinien wird durch GA beeinträchtigt.

(A) HEK293T-Zellen und (B) IGROV1-Zellen (jeweils $5 \times 10^4/0,1$ ml/Vertiefung) wurden mit der jeweils angegebenen GA-Konzentration für 48 h behandelt. Die Viabilität der Zellen wurde anhand der NADH/NADPH-Oxidoreduktase-abhängigen Umsetzung von MTT zu Formazan kolorimetrisch (CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsansätze \pm Standardfehler von zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen und GA-behandelten Zellen sind angegeben (***) $p < 0,001$.

Da in der Literatur GA als Agens mit antiproliferativen Eigenschaften beschrieben wird²¹⁶, wurde der Einfluss von GA auf die Proliferation der beiden Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zellen jeweils mit verschiedenen Konzentrationen von GA über einen Zeitraum von 48 h behandelt und anschließend die Proliferation gemessen. Beide Zelllinien wurden in ihrer Fähigkeit zu proliferieren nach Applikation von GA nicht so stark eingeschränkt wie im Vergleich nach Behandlung mit TPT (Abbildung 3.4). Während HEK293T Zellen bei geringen Konzentrationen von GA (ab $0,1 \mu\text{M}$) signifikant weniger proliferierten, reagierte die Ovarialkarzinomzelllinie IGROV1 weniger sensitiv auf die Behandlung. Hier wurde die Proliferation erst ab einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ GA vermindert.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass in beiden experimentellen Ansätzen eine Behandlung mit TPT oder mit GA zu einer Inhibierung des Zellüberlebens, -wachstums und -teilung führt.

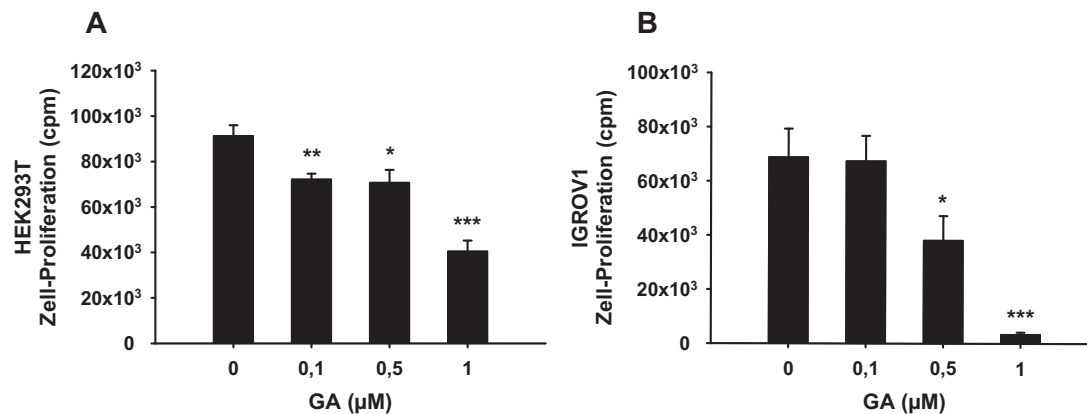


Abbildung 3.4 Die Proliferation von HEK293T und IGROV1 wird durch die Behandlung mit GA vermindert.

(A) HEK293T-Zellen und (B) IGROV1-Zellen (jeweils $5 \times 10^4/0,1$ ml/Vertiefung) wurden mit der jeweils angegebenen GA-Konzentration für 48 h behandelt. Die Proliferation der Zellen wurde anhand der Aufnahme von $^3\text{HTdR}$ während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatansätze \pm Standardfehler von zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen und TPT-behandelten Zellen sind angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.2 Behandlung humaner T-Zellen mit TPT und GA

Stark proliferierende Zellen, insbesondere Tumorzellen sind die eigentlichen Zielzellen von TPT und GA. Sie werden durch unterschiedliche Mechanismen von TPT bzw. GA in die Apoptose getrieben. Jedoch können nach Aktivierung im Rahmen einer adaptiven Immunantwort T- und B-Zellen ebenfalls proliferieren. Aufgrund der essentiellen Rolle von zellulären Antitumor-Immunantworten wurden mögliche unerwünschte Nebeneffekte von TPT und GA auf die klonale Expansion von aktivierten T-Zellen analysiert. Zunächst wurde für die verwendete Konzentration ein MTT-Test durchgeführt, um zu klären, inwiefern eine Behandlung der aktivierten T-Zellen mit diesen Chemotherapeutika einen Einfluss auf die Viabilität der T-Zellen hat (Abbildung 3.5). Hierfür wurden CD4^+ T-Zellen aus PBMCs aufgereinigt und für 48 h mit $1 \mu\text{M}$ TPT bzw. $0,1 \mu\text{M}$ GA inkubiert. Anschließend wurde photometrisch die Zellviabilität bestimmt. TPT war für ruhende T-Zellen nicht toxisch (Abbildung 3.5 A), derselbe Effekt konnte auch für GA beobachtet werden (Abbildung 3.5 B).

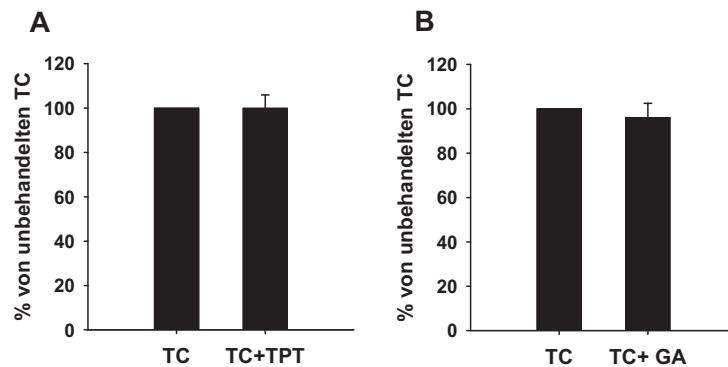


Abbildung 3.5 Die Viabilität der T-Zellen wird durch TPT bzw. GA nicht beeinflusst.

CD4⁺ T-Zellen (TC) wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen in einem Volumen von 100 μ l in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Zu jeder Vertiefung wurden 5% (v/v) Serum und 100 U/ml IL-2 zugegeben. Die T-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 1 μ M TPT im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ für 48 h inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde anhand der NADH/NADPH-Oxidoreduktase-abhängigen Umsetzung von MTT zu Formazan kolorimetrisch (CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsätze \pm Standardfehler von einem Experiment.

Zusätzlich wurde der Einfluss von TPT bzw. GA auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen analysiert. Hierfür wurden CD4⁺ T-Zellen und Mo-DCs, im unstimulierten oder stimulierten Zustand, in An- oder Abwesenheit von TPT bzw. GA über einen Zeitraum von vier Tagen kokultiviert (Abbildung 3.6 A, B). Während unstimulierte DCs ein moderates allogenenes T-Zell-Aktivierungspotential aufwiesen, regten mit dem Reifungscocktail ausgereifte DCs allogene T-Zellen im hohen Maße zur Expansion an. Wurde zu der Kokultur das Antitumor-Agens TPT zugegeben, verminderte sich die Proliferationskapazität der T-Zellen unabhängig vom Maturierungsstatus der DCs signifikant (Abbildung 3.6 A). Analog zur Behandlung mit TPT führte eine Applikation von GA zu den Kokulturen zu dem gleichen Bild (Abbildung 3.6 B). Es zeigte sich somit, dass die beiden Chemotherapeutika die T-Zellproliferation inhibierten, wobei man hierbei nicht unterscheiden konnte, ob es sich um einen direkten Effekt der Agenzien auf die T-Zellen handelt oder ob der Effekt durch die DCs vermittelt wurde. Aus diesem Grund wurden die CD4⁺ T-Zellen polyklonal mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert und in An- oder Abwesenheit von TPT oder GA kultiviert. Eine polyklonale Stimulierung der T-Zellen führte zu einer starken T-Zellproliferation (Abbildung 3.6 C, D). Wurden die CD4⁺ T-Zellen hingegen in Anwesenheit von TPT kultiviert, wurde die durch anti-CD3 und anti-CD28 Stimulierung induzierte Proliferation der T-Zellen signifikant inhibiert (> 99% Inhibition). Durch eine Behandlung mit GA wird die induzierte Proliferation der polyklonal stimulierten T-Zellen ebenfalls signifikant reduziert (> 99% Inhibition).

Insgesamt ergab sich aus diesen Versuchen, dass TPT und GA die Proliferation der Zelllinien HEK293T und IGROV1 verhindern konnten, aber auch die Proliferation stimulierter CD4⁺ T-Zellen, die für eine adäquate Antitumor-Immunantwort essentiell sind. Interessanterweise waren beide Chemotherapeutika im Gegensatz zu Krebszellen für humane T-Zellen in der eingesetzten Konzentration nicht toxisch.

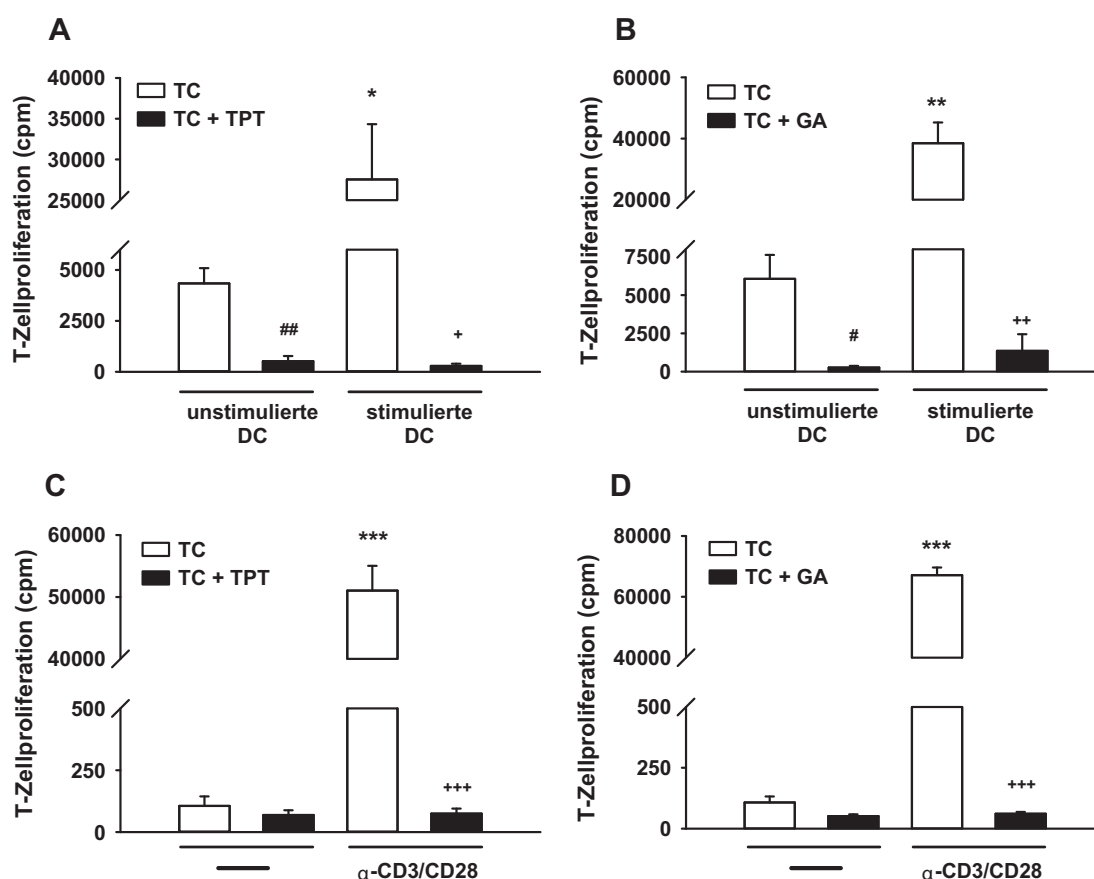


Abbildung 3.6 Die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen wird durch TPT bzw. GA herabgesetzt.

CD4⁺ T-Zellen ($10^5/200 \mu\text{l/Vertiefung}$) wurden in An- oder Abwesenheit von (A, C) $1 \mu\text{M}$ TPT bzw. (B, D) $0,1 \mu\text{M}$ GA entweder (A, C) mit allogenen Mo-DCs ($2 \times 10^4/200 \mu\text{l/Vertiefung}$) oder (B, D) polyklonal in Triplikaten über einen Zeitraum von vier Tagen stimuliert. Die polyklonale Stimulierung erfolgte mit Antikörper gegen CD3 ($1 \mu\text{g/ml}$) und CD28 ($0,5 \mu\text{g/ml}$). Zusätzlich wurden zu der Kultur 5 % (v/v) hitzeinaktiviertes Serum und 100 U IL-2 zugegeben. Die Mo-DCs wurden aus Monozyten differenziert, an Tag sechs der Kultur Aliquote der Zellen mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE $_2$) stimuliert und an Tag acht geerntet. Die T-Zell Proliferation wurde anhand der Aufnahme von $^3\text{HTdR}$ während der letzten 16 h der DC/T-Zell-Kokultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (A, B) * T-Zellen aktiviert durch unstimulierte bzw. stimulierte DCs, T-Zellen aktiviert durch unstimulierte (#) bzw. stimulierte (+) DCs in Ab- oder Anwesenheit von TPT oder GA; (C, D) * polyklonal aktivierten und nicht aktivierten T-Zellen, + polyklonal aktivierten T-Zellen kultiviert in Ab- oder Anwesenheit von TPT oder GA sind angegeben (*, #, + $p < 0,05$; **, ##, ++ $p < 0,01$; ***, +++ $p < 0,001$).

3.1.3 Die Antitumor-Agenzien TPT und GA verändern den Phänotyp humaner Mo-DCs

DCs besitzen bei der Initiierung und Aufrechterhaltung von Immunantworten eine wichtige Schlüsselrolle¹⁴⁰. Als die wichtigsten APCs besitzen sie die Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren, die daraufhin zu Effektorzellen differenzieren¹⁶⁰. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, welchen Einfluss die beiden Antitumor-Agenzien auf Mo-DCs haben.

Als erstes wurde die Viabilität von mit TPT und GA behandelten Mo-DCs untersucht, um mögliche toxische Effekte dieser Chemotherapeutika auf DCs zu untersuchen. Hierfür wurden Monozyten aus PBMCs isoliert und über einen Zeitraum von sechs Tagen zu DCs differenziert. Im Anschluss wurde ein Aliquot der Zellen mit dem Reifungscocktail stimuliert. TPT bzw. GA wurden in verschiedenen Konzentrationen während der Ausreifungsphase zu den DCs zugegeben. Die Toxizität der Agenzien wurde mittels des CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assays bestimmt.

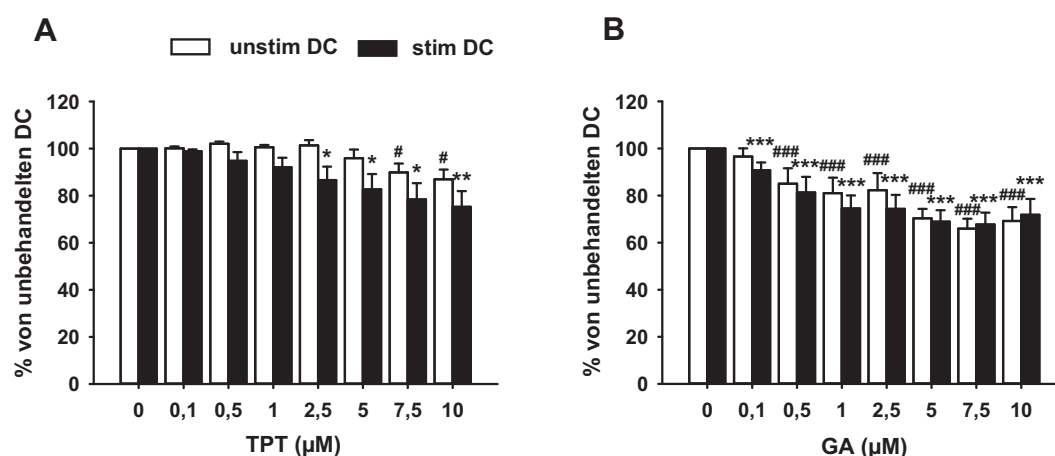


Abbildung 3.7 Zytotoxische Effekte von TPT auf humane DCs.

Mo-DCs ($2 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ /Vertiefung) wurden mit (A) TPT bzw. (B) GA bei den angegebenen Konzentrationen behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE₂) stimuliert. Nach 48 h wurde die Viabilität der Zellen anhand der NADH/NADPH-Oxidoreduktase-abhängigen Umsetzung von MTT zu Formazan kolorimetrisch (CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von fünf unabhängigen Experimenten. (A, B) Statistische signifikante Unterschiede zwischen Agens-behandelten DCs und unbehandelten DCs entweder im unstimulierten (#) oder stimulierten (*) Status sind angegeben (*, # p<0,05; ** p<0,01, ***, ### p<0,001).

Im eingesetzten Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 1,0 μM TPT wurde die Viabilität der beiden DC-Populationen nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 3.7 A). Während unstimulierte DCs erst bei einer Konzentration von 7,5 μM eine signifikante Verminderung ihrer Viabilität aufwiesen, war für stimulierte DCs schon eine TPT-Konzentration ab 2,5 μM toxisch. Interessanterweise reagierten mit dem Reifungscocktail stimulierte DCs sensitiver auf das Chemotherapeutikum als unstimulierte DCs. Die Viabilität von Mo-DCs nach Behandlung mit verschiedenen GA-Konzentrationen ist in Abbildung 3.7 B dargestellt. Die Behandlung mit GA reduzierte die Viabilität von unstimulierten DCs signifikant ab einer Konzentration von 0,5 μM , wohingegen stimulierte DCs schon ab einer Konzentration ab 0,1 μM sensitiv reagierten. Auffallend hierbei war, dass bei niedrigeren Dosierungen die Viabilität der DCs durch eine Behandlung mit GA mehr beeinflusst wurde im Vergleich zu einer Behandlung mit TPT.

Auf Basis dieser Experimente wurden für alle weiteren Analysen eine TPT-Konzentration von 1 μM und eine GA-Konzentration von 0,1 μM ausgewählt. Diese Konzentrationen waren für T-Zellen und Mo-DCs nicht toxisch. Dennoch wurde bei diesen Konzentrationen eine eindeutige Inhibierung der Proliferation der Zelllinien HEK293T und IGROV1 und eine Verminderung der Viabilität dieser Zellen um 40% erzielt. Im Hinblick auf die klinische Anwendung von TPT als Chemotherapeutikum lag die gewählte Konzentration im Bereich der Plasmakonzentration eines Krebspatienten.

Für die phänotypische Charakterisierung der mit TPT bzw. GA behandelten DCs wurde die Oberflächenexpression von HLA-DR und der Moleküle CD14, CD80, CD83 und CD86 mittels FACS-Analyse untersucht. Die DCs wurden aus Monozyten differenziert. Monozyten sind durch eine hohe CD14-Expression gekennzeichnet²¹⁷. Durch Zugabe von IL-4 zu der Zellkultur wird die Differenzierung von DCs gefördert und dadurch die Expression von CD14 auf den sich differenzierenden Zellen verringert²¹⁸. Um zu überprüfen, ob durch die Behandlung mit TPT bzw. GA eine Veränderung der DC-Differenzierung stattgefunden hat, wurde die Expression von CD14 an Tag acht der Kultivierung analysiert. TPT hatte keinen Einfluss auf die CD14-Expression (<5%) der DCs im unstimulierten sowie im stimulierten Status der DCs (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit Literaturdaten^{164,219} werden durch die Maturierung der DCs HLA-DR und kostimulatorische Moleküle erhöht exprimiert (Abbildung 3.8). Während unstimulierte DCs eine basale Expression des Reifungsmarker CD83 und des kostimulatorischen Moleküls CD80 aufwiesen, konnten HLA-DR und CD86 in einem höheren Maß auf der Oberfläche nachgewiesen werden.

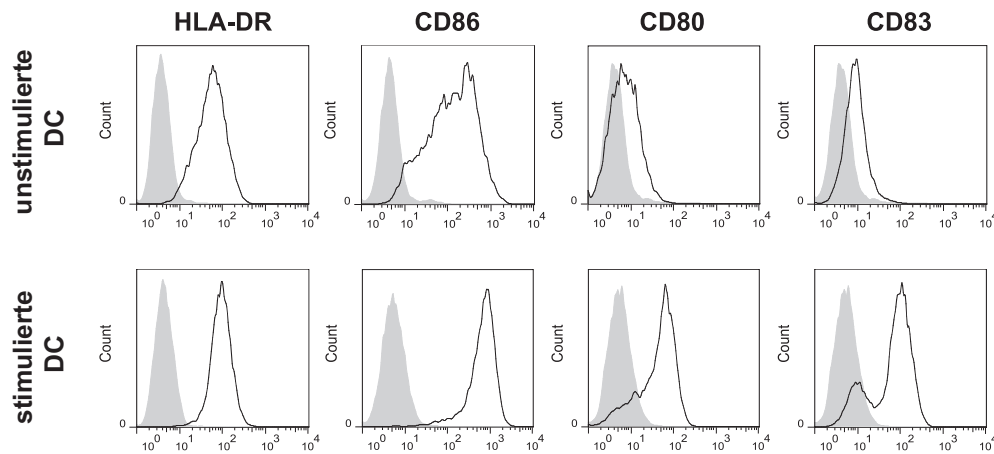


Abbildung 3.8 Die Maturation von DCs mit dem Reifungscocktail bedingt eine Erhöhung der Expression distinkter Oberflächenmarker.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote der DCs wurden während der letzten 48h der Zellkultur zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE $_2$) stimuliert. Die Expression der Moleküle HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme repräsentieren den jeweiligen Isotyp Kontroll-Antikörper (grau-schattierte Fläche) und die spezifische Oberflächenfärbung (schwarze Linie).

Eine Behandlung der unstimulierten DCs mit TPT führte zu einer erhöhten Oberflächenexpression der vorher genannten Moleküle, wobei die Steigerung nur im Fall von CD80 signifikant war (Abbildung 3.9 A). Der maturierungsassoziierte Anstieg der Expression der Oberflächenmarker wurde durch eine Koapplikation von TPT und Reifungscocktail inhibiert. Eine Behandlung während der Stimulierungsphase der DCs mit TPT führte zu einer signifikant verminderten Aufregulation der Expression von HLA-DR sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86.

Die Behandlung mit GA führte im Vergleich mit TPT zu analogen Resultaten (Abbildung 3.9 B). Hierbei führte die Gabe von GA zu einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression der Moleküle HLA-DR, CD86 sowie des Reifungsmarkers CD83. Interessanterweise wurde im Gegensatz zu der Behandlung mit TPT die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 durch GA signifikant verringert. Wie auch im Fall von TPT wurde die maturierungsassoziierte Aufregulation der Oberflächenmarker durch eine Koapplikation des Reifungscocktails und des Antitumor-Agens verhindert.

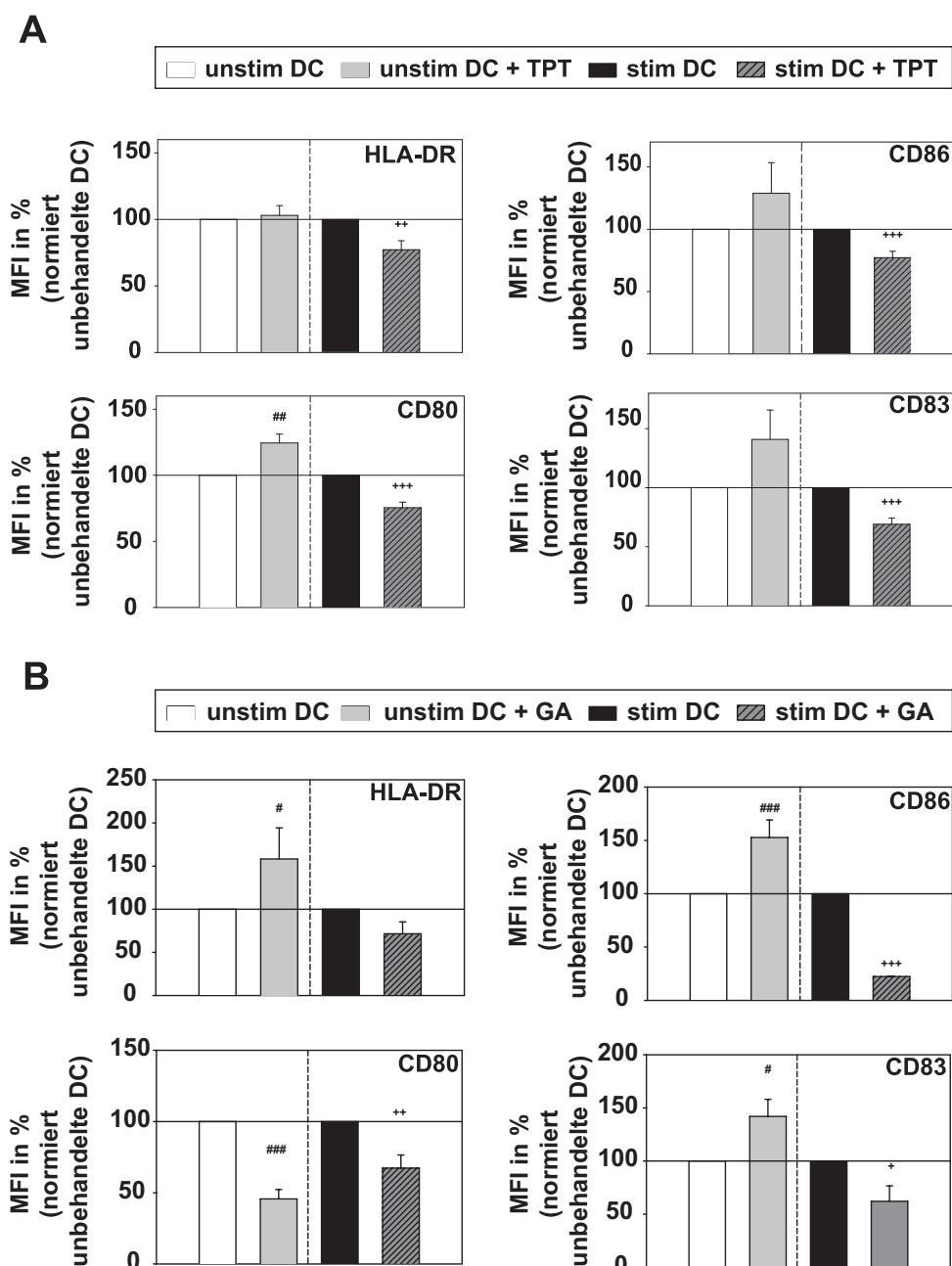


Abbildung 3.9 TPT und GA beeinflussen den Phänotyp von Mo-DCs.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit (A) 1 μ M TPT oder mit (B) 0,1 μ M GA während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE₂) stimuliert. Die Expression der Moleküle HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A, B) Die relativen Änderungen der Oberflächenexpression der DCs sind als mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) dargestellt. Die MFIs der unbehandelten DCs wurden gleich 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von jeweils fünf bis sechs unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen mit TPT bzw. GA behandelten DCs und unbehandelten DCs entweder im unstimulierten (#) oder stimulierten (+) Status sind angegeben (#, + p<0,05; ##, ++ p<0,01, ###, +++ p<0,001).

3.1.4 TPT bzw. GA haben unterschiedliche Effekte auf das Zytokinprofil von Mo-DCs

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von DCs ist die Sekretion von Zytokinen nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren bzw. Bakterienkomponenten^{220,221}. Durch die Sekretion von Zytokinen kann eine Th-Polarisierung initiiert werden²²². Dabei fördert das Zytokin IL-12 die Differenzierung von Th1-Zellen, während IL-6 eher die Differenzierung zu Th2-Zellen begünstigt^{223,224}. Im Gegensatz dazu führt eine Sezernierung von IL-10 zu einer verstärkten Induktion von Tregs²²⁵.

Zur Klärung der Frage, inwieweit eine Behandlung der DCs mit den beiden Chemotherapeutika zu einer Veränderung ihres Zytokinprofils führt, wurden IL12p40, IL-6 und IL-10 in den Kulturüberständen der verschiedenen DC Populationen analysiert.

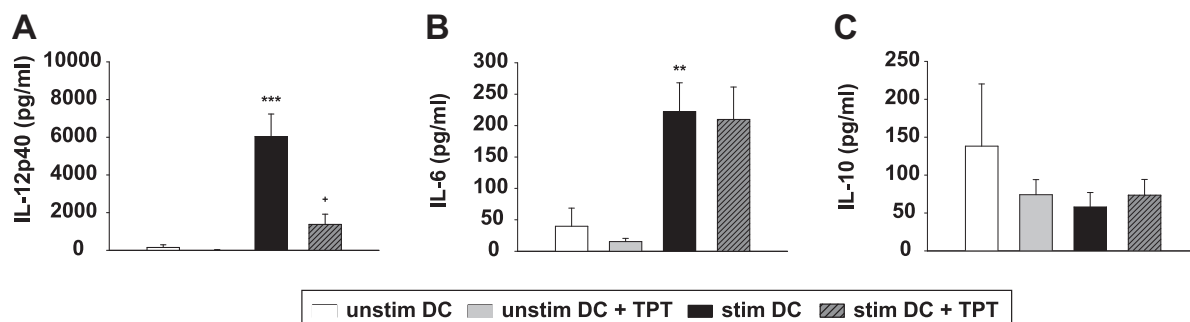


Abbildung 3.10 Die Behandlung von Mo-DCs mit TPT hat einen differenziellen Einfluss auf deren Zytokinprofil.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 1 μ M TPT während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE₂) stimuliert. An Tag acht wurden die Kulturüberstände genommen und mittels ELISA auf ihren Gehalt an (A) IL-12p40, (B) IL-6 und (C) IL-10 untersucht. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von jeweils zehn unabhängigen Experimenten. (A-C) Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten DCs und stimulierten DCs und zwischen TPT behandelten DCs und unbehandelten DCs entweder im unstimulierten (#) oder stimulierten (+) Status sind angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Im Kulturüberstand unstimulierter DCs war kaum IL-12p40 enthalten (Abbildung 3.10 A). Auch durch eine Behandlung mit TPT wurde das Zytokin nicht vermehrt ausgeschüttet. Infolge der Ausreifung der DCs mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und PGE₂ wurde IL-12p40 verstärkt von DCs sezerniert. Diese maturierungsassoziierte erhöhte IL-12p40 Produktion war infolge einer gleichzeitigen Gabe von TPT signifikant verringert. Während IL-6 auf einem basalen Level von unstimulierten DCs produziert wurde, verringerte TPT die IL-6 Produktion kaum (Abbildung 3.10 B). Dem gegenüber fand eine reifungsbedingte signifikante Steigerung der IL-6 Produktion statt. Dabei hatte eine

Koapplikation von TPT und dem Reifungscocktail keinen Einfluss auf die IL-6 Produktion. IL-10 wurde von unstimulierten DCs am stärksten sezerniert (Abbildung 3.10 C). Die Behandlung von unstimulierten DCs mit TPT resultierte in einer Verringerung der IL-10 Produktion, die aber nicht statistisch signifikant war. Auch im Rahmen einer Stimulierung der DCs wurde die IL-10 Produktion verglichen mit unstimulierten DCs vermindert. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine mögliche Verschiebung des Th1/Th2 Gleichgewichtes in Richtung Th2 hin.

Auch eine Behandlung unstimulierter Mo-DCs mit GA hatte keine Wirkung auf die IL-12p40 Produktion (Abbildung 3.11 A). Wie zuvor gezeigt, führte eine Maturierung mit dem Reifungscocktail zu einer erhöhten Sezernierung von IL-12p40. Im Gegensatz zu TPT führte eine Koapplikation mit GA zu keiner signifikanten Verringerung der IL-12 Produktion. In Kulturüberständen von unstimulierten DCs wurde kaum IL-6 nachgewiesen (Abbildung 3.11 B). Desweiteren wurde durch die Behandlung mit GA keine Veränderung der IL-6 Produktion hervorgerufen. Während mit dem Reifungscocktail stimulierte DCs IL-6 im hohem Maße sezernierten, war der Gehalt an IL-6 im Kulturüberstand stimulierter, GA behandelter nur unwesentlich geringer.

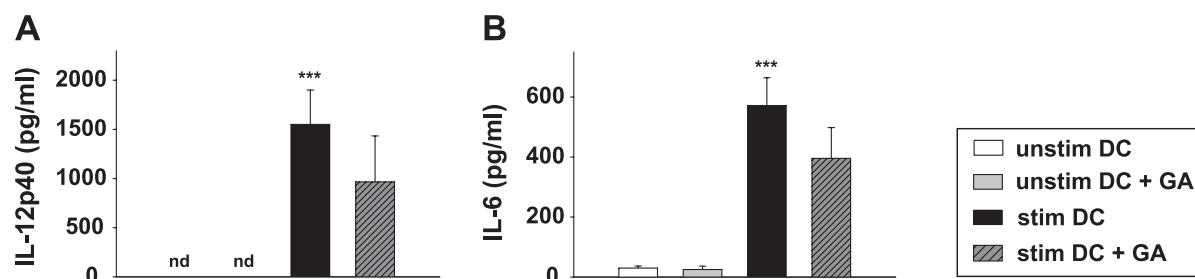


Abbildung 3.11 GA vermindert nicht signifikant die Zytokinproduktion von stimulierten Mo-DCs.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 0,1 μM GA während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE $_2$) stimuliert. Am Tag acht wurden die Kulturüberstände genommen und mittels ELISA auf ihren Gehalt an (A) IL-12p40, (B) IL-6 Gehalt untersucht. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von acht bis zehn unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten DCs und stimulierten DCs sind angegeben (***) $p < 0,001$).

3.1.5 TPT und GA beeinflussen die Fascin-Expression sowie das Migrationsverhalten von MO-DCs

Basierend auf der essentiellen Rolle des Aktinbündelungsprotein Fascin für die Migration von DCs²²⁶, wurde die Fascin-Expression der DCs untersucht. Frühere Studien zeigen, dass das Expressionsniveau von Fascin mit dem Maturierungsstatus von DCs korreliert^{227,228}. Während unstimulierte DCs Fascin nur auf einem basalen Niveau exprimierten, wurde durch die Stimulierung mit dem Reifungscocktail die Expression dieses Protein gesteigert (Abbildung 3.12 A).

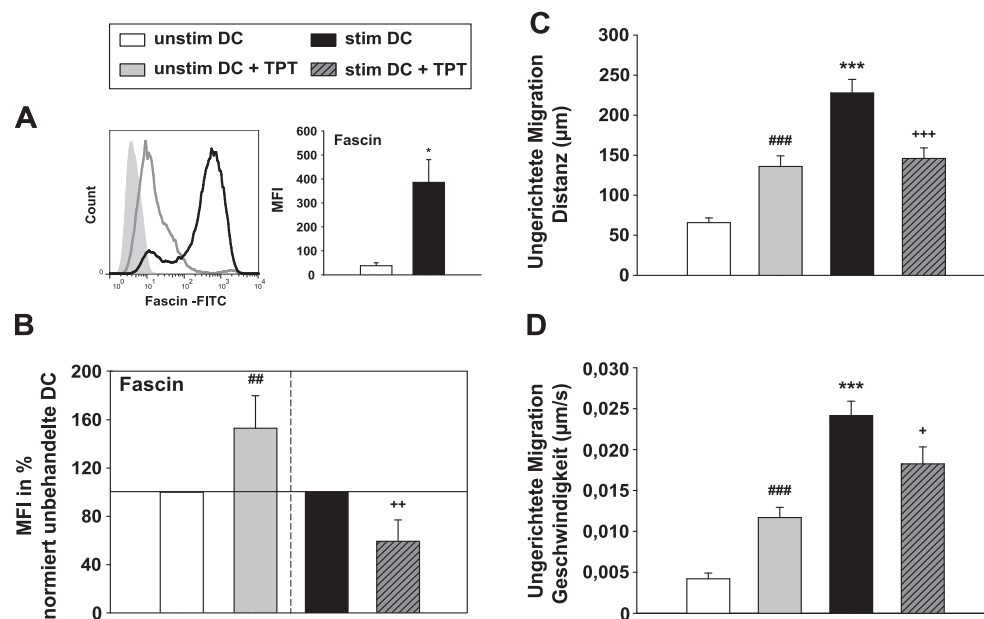


Abbildung 3.12 TPT beeinflusst die Fascin-Expression sowie das Migrationsverhalten Mo-DCs.

Humane Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 1 µM TPT während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1β, TNF-α und PGE₂) stimuliert. (A) Die Expression des DC Aktivierungsmarkers Fascin wurden mittels FACS-Analyse untersucht. Die Histogramme zeigen die Fascin-Expression von unstimulierten DCs (graue Linie) und stimulierten DCs (schwarze Linie), die graue Fläche zeigt den Isotyp. Der Graph zeigt die MFIs der Fascin-Expression unstimulierter und stimulierter DCs und repräsentiert den Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten. (B) Die relativen Änderungen der Fascin-Expression sind als MFIs dargestellt. Die MFIs der unbehandelten DCs wurden gleich 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von vier oder fünf unabhängigen Experimenten. (C, D) Es wurden 3D Kollagen Matrizen, die jeweils 3 x 10⁵ DCs enthielten, präpariert und die Bewegungen der verschiedenen Zellpopulationen im Bezug auf (C) Distanz und (D) Geschwindigkeit über einen Zeitraum von sechs Stunden im Zeitraffer mit einem Olympus BX61 Mikroskop mit einer UAPO Linse (20x/340, NA 0.75) beobachtet. Die Bilder wurden alle 2 min von einer FView Kamera aufgenommen und mit der Software Cell^P analysiert. (C, D) Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, was 120 individuell analysierten Zellen pro Population entspricht. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten DCs und stimulierten DCs und zwischen TPT behandelten DCs und unbehandelten DCs entweder im unstimulierten (#) oder stimulierten (+) Status sind angegeben (*, + p<0,05, ##, ++ p<0,01, ***, ###, +++ p<0,001).

Die Gabe von TPT führte zu einer signifikanten Aufregulation der Fascin-Expression verglichen mit unbehandelten unreifen Mo-DCs (Abbildung 3.12 B). Währenddessen führte eine Koapplikation von TPT und dem Reifungscocktail zu einer signifikant geringeren Aufregulation des Proteins. Durch die Behandlung mit GA veränderte sich die Fascin-Expression auf unstimulierten DCs nicht (Abbildung 3.13 A). Wurden Reifungscocktail und GA koappliziert, war die Zunahme der Fascin-Expression signifikant vermindert. Die spontane Migration der DCs wurde in 3D Kollagengelen untersucht. In Übereinstimmung mit dem hohen Niveau an Fascin-Expression zeigten stimulierte DCs ein hohes Maß an Migrationsaktivität verglichen mit unstimulierten DCs, die sich hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit viel langsamer bewegten und in dem definierten Zeitraum auch eine kürzere Distanz zurücklegten (Abbildung 3.12 C, D).

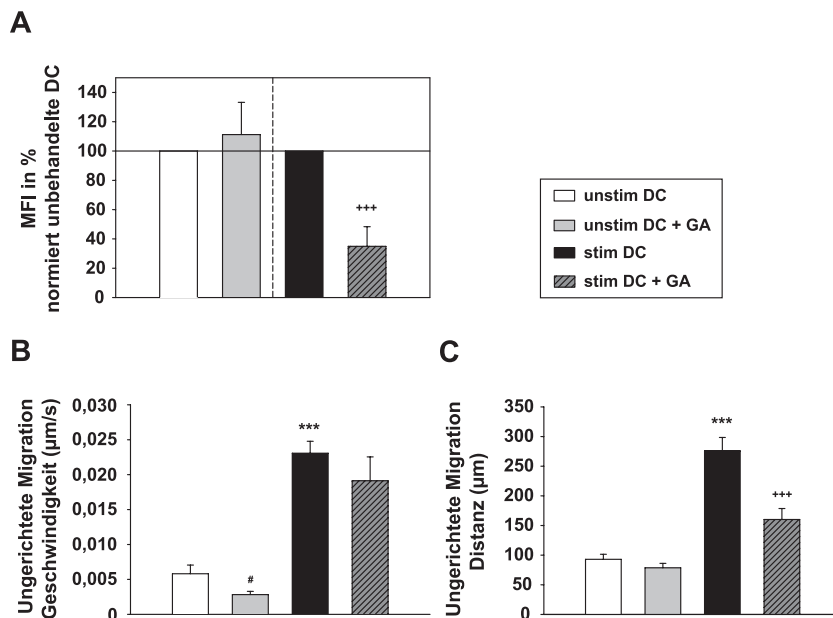


Abbildung 3.13 Die Behandlung mit GA reduziert die Fascin-Expression humaner stimulierter DCs, sowie das Migrationsverhalten beider DC-Populationen.

Humane Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 0,1 µM GA während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1β, TNF-α und PGE₂) stimuliert. (A) Die relativen Änderungen der Fascin-Expression sind als MFIs dargestellt. Die MFIs der unbehandelten DCs wurden gleich 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von fünf unabhängigen Experimenten. (B, C) Es wurden 3D Kollagen Matrizen, die jeweils 3 x 10⁵ DCs enthielten, präpariert und die Bewegungen der verschiedenen Zellpopulationen im Bezug auf (B) Geschwindigkeit und (C) Distanz über einen Zeitraum von sechs Stunden im Zeitraffer mit einem Olympus BX61 Mikroskop mit einer UAPO Linse (20x/340, NA 0.75) beobachtet. Die Bilder wurden alle 2 min von einer FView Kamera aufgenommen und mit der Software Cell^P analysiert. (B, C) Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, was 80 individuell analysierten Zellen pro Population entspricht. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten DCs und stimulierten DCs und zwischen GA behandelten DCs und unbehandelten DCs entweder im unstimulierten (#) oder stimulierten (+) Status sind angegeben ([#] p<0,05, ***, *** p<0,001).

Wurden die unstimulierten DCs mit TPT behandelt, erhöhte sich ihre Migrationsaktivität signifikant. Die DCs wurden schneller in ihren ungerichteten Bewegungen und bewegten sich über eine längere Distanz. Eine Behandlung mit TPT während der Ausreifungsphase führte zu einer geringeren Migrationskapazität im Vergleich mit stimulierten, unbehandelten DCs.

Interessanterweise bewegten sich unstimulierte DCs nach Behandlung mit GA im Vergleich zu der Kontrollgruppe langsamer. Demgegenüber hatte die Gabe von GA keinerlei Einfluss auf die zurückgelegte Strecke der Zellen. Eine Koapplikation von Reifungscocktail und GA hatte zur Folge, dass sich die DCs hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit und zurückgelegten Strecke weniger bewegten als die stimulierte, unbehandelte Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass TPT einen stimulationsabhängigen differentiellen Einfluss auf die migratorischen Fähigkeiten von Mo-DCs hat. Dies korrelierte mit der Fascin-Expression. Durch GA wurde die Migrationskapazität unstimulierter wie auch stimulierter Mo-DC reduziert. Hierbei ergab sich nur im Fall der Reifungscocktail stimulierten DCs eine Korrelation zwischen Fascin-Expression und Migrationsverhalten.

3.1.6 Durch die Behandlung mit TPT und GA wird die Antigenaufnahme seitens der DCs verringert.

Angesichts der Agens-induzierten partiellen Aktivierung von unstimulierten DCs wurde deren endozytotische Aktivität ermittelt. Die Antigenaufnahme ist ein wesentliches Hauptmerkmal unreifer DCs²²⁹. Durch die Ausreifung verlieren DCs ihre Fähigkeit Antigen aufzunehmen und zu prozessieren²³⁰. Aus diesem Grund wurde die Endozytosekapazität von unstimulierten DCs analysiert (Abbildung 3.14).

Die Internalisierung von FITC-Dextran durch unreife DCs war temperatursensitiv. Bei 4°C nahmen sowohl unbehandelte DCs als auch TPT- bzw. GA-behandelte DCs kaum Dextran-Partikel auf. Bei einer Inkubation bei 37°C nahmen unreife DCs Antigen aktiv auf. Eine vorherige Inkubation mit TPT verringerte die Aufnahme von Dextran-Partikel signifikant um 30 %, durch die Applikation von GA wurde die Antigenaufnahme tendenziell reduziert.

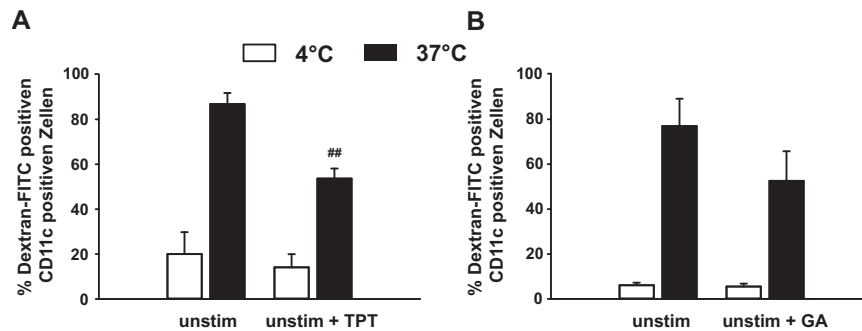


Abbildung 3.14 Die Behandlung mit TPT bzw. GA beeinträchtigt die endozytotische Fähigkeit von Mo-DCs.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit (A) 1 μM TPT bzw. (B) 0,1 μM GA während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Die DCs (2×10^5) wurden mit FITC-konjugiertem Dextran für 30 min bei 37°C und als Kontrolle parallel bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die DCs gewaschen und die Aufnahme von FITC-konjugiertem Dextran im FACS analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von vier oder fünf unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen TPT behandelten DCs und unbehandelten DCs sind angegeben (^{###} $p < 0,01$).

3.1.7 Die Behandlung von Mo-DCs mit TPT oder GA verändert ihr T-Zell-Aktivierungspotential

Anknüpfend an die phänotypischen Analysen wurde die Funktionalität der humanen Mo-DCs nach Behandlung mit den Chemotherapeutika TPT und GA untersucht. Hierfür wurde das Potential der DCs, T-Zellen zu aktivieren, in einer primären gemischten Lymphozyten-Reaktion untersucht. Immature DCs besaßen eine moderate T-Zellstimulierungskapazität, während durch eine Stimulierung mit dem Reifungscocktail die Kapazität T-Zellen zu aktivieren im hohen Maß gesteigert wurde (Abbildung 3.15). Generell nahm die T-Zellproliferation mit sinkendem DC/TC-Verhältnis ab. Die Behandlung unstimulierter Mo-DCs mit TPT führte interessanterweise zu einer signifikanten Erhöhung ihres T-Zellstimulierungspotentials. Wurden im Gegensatz dazu die DCs gleichzeitig stimuliert und mit TPT behandelt, führte dies zu einer gegenüber unbehandelten stimulierten DCs signifikant verminderten T-Zellproliferation. Analog dazu führte eine Behandlung mit GA ebenfalls zu einem gesteigerten T-Zellstimulierungspotential, wobei die Steigerung im Vergleich zu TPT moderat ausfiel. Die stimulierungsbedingte Steigerung der T-Zellaktivierungskapazität wird durch die Koapplikation von GA signifikant vermindert.

Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich, dass durch eine Behandlung mit diesen Chemotherapeutika während der Reifungsphase zweierlei Effekte hervorgerufen werden. Zum einem zeigten unstimulierte DCs eine erhöhte APC-Funktion. Demgegenüber führte eine Koapplikation von Reifungscocktail und Agens zur einer verminderten T-Zellstimulierungsfähigkeit der Mo-DCs.

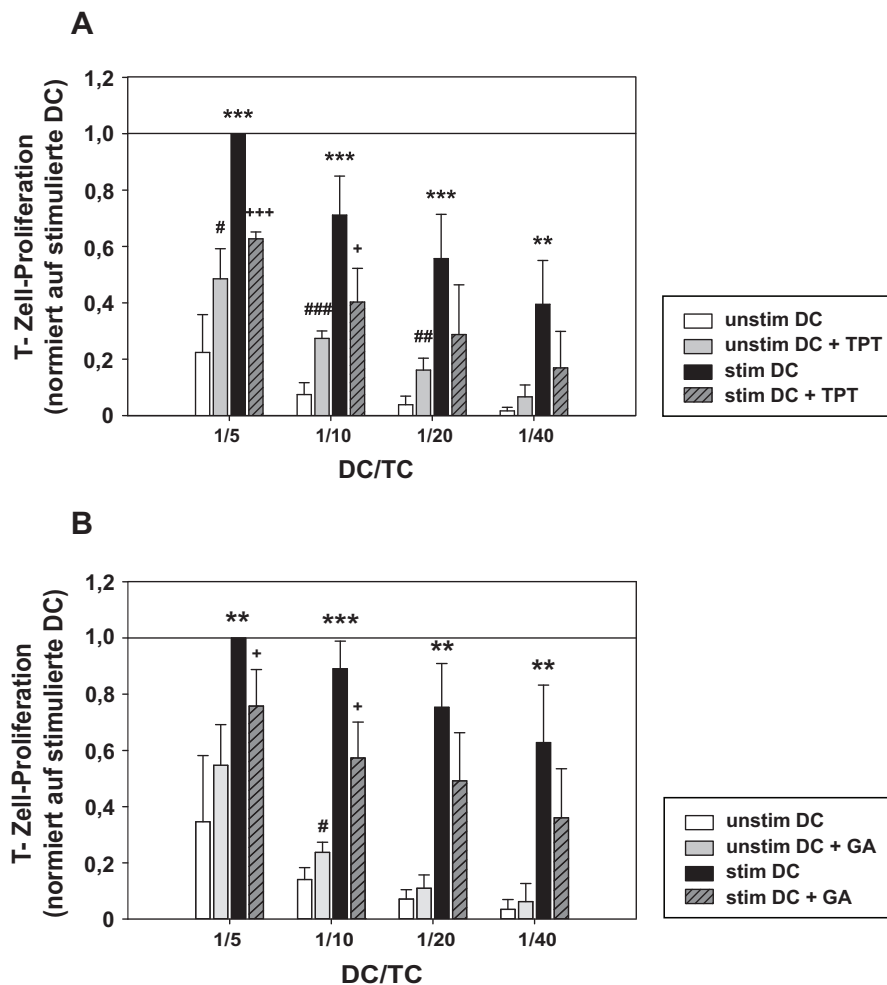


Abbildung 3.15 TPT erhöht das T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter humaner DCs, aber verringert die stimulationsabhängige funktionale Aktivierung humaner T-Zellen.

Humane Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit (A) 1 µM TPT bzw. (B) 0,1 µM GA während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1β, TNF-α und PGE₂) stimuliert. Mo-DCs (2 x 10⁴) wurden in Triplikaten seriell verdünnt und mit 10⁵ allogenen CD4⁺ T-Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen kokultiviert. Die T-Zell Proliferation wurde anhand der Aufnahme von ³HTdR während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die durch stimulierte DCs induzierte T-Zellproliferation wurde gleich 1 gesetzt. (A, B) Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten DCs und stimulierten DCs und zwischen TPT behandelten DCs und unbehandelten DCs entweder im unstimulierten (#) oder stimulierten (+) Status sind angegeben (#, + p<0,05, **, ## p<0,01, ***, ###, +++ p<0,001).

3.1.8 Behandlung von Mo-DCs mit TPT und GA beeinflusst unterschiedlich das Zytokinprofil von T-Zellen

Aufgrund des Einflusses von TPT auf das Zytokinprofil der DCs, wurden TPT-abhängige Veränderungen der T-Zell-Polarisierung untersucht. Die Analyse der Zytokinproduktion wurde nach Kokultivierung von allogenen CD4⁺ T-Zellen mit unbehandelten bzw. TPT-behandelten DCs im unstimulierten und stimulierten Status mittels ELISA bestimmt. Hierbei wurde das Th1/Th2 Gleichgewicht durch den Ratio des Th1-Zytokins IFN- γ zum Th2-Zytokin IL-5 reflektiert (Abbildung 3.16 A). Während mit unstimulierten DCs kokultivierte T-Zellen ein basales Niveau des Zytokins IL-5 aufwiesen, besaßen Kokulturen mit stimulierten DCs einen höheren Gehalt an IL-5.

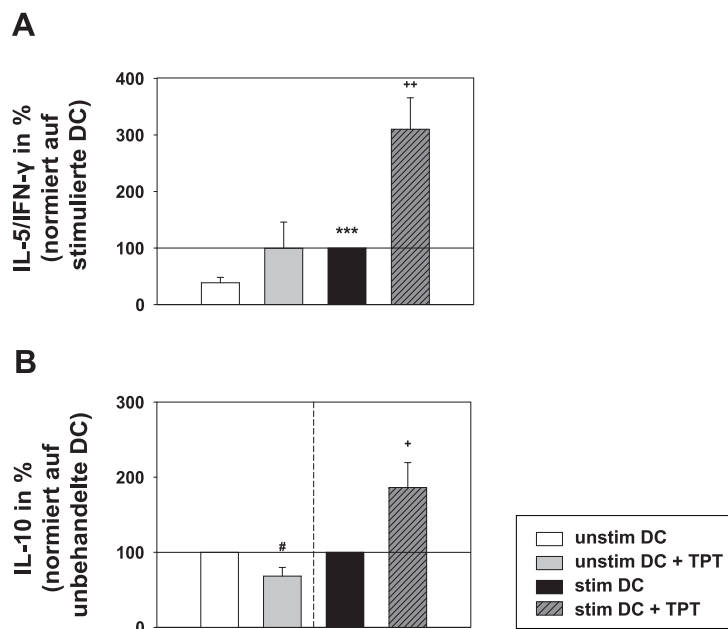


Abbildung 3.16 Eine Behandlung von DCs mit TPT beeinflusst die Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 1 μ M TPT während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE₂) stimuliert. CD4⁺ T-Zellen (10⁶) wurden mit den DC-Populationen (2x10⁵) über einen Zeitraum von vier Tagen kokultiviert. Die Überstände wurden an Tag vier gesammelt und der Gehalt an IL-5, IL-10 und IFN- γ mittels ELISA bestimmt. (A) Der IL-5/IFN- γ -Ratio ist dargestellt, wobei der Ratio der Kokulturen mit stimulierten DCs gleich 100% gesetzt wurde. (B) Der relative Gehalt an IL-10 in den Kokulturen ist dargestellt, wobei der Gehalt von IL-10 in Kokulturen mit unbehandelten DCs gleich 100% gesetzt wurde. (A, B) Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von jeweils sieben unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten DCs und stimulierten DCs und zwischen TPT behandelten DCs und unbehandelten DCs entweder im unstimulierten (#) oder stimulierten (+) Status sind angegeben (#, + p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Die Behandlung von DCs mit TPT führte gleichermaßen zu einer Steigerung der IL-5 Produktion von T-Zellen, unabhängig vom Aktivierungsstatus der DCs. Im Gegensatz dazu wurde durch die Gabe von TPT eine moderate Zunahme der IFN- γ -Produktion der mit unstimulierten DCs kokultivierten T-Zellen erreicht (Daten nicht gezeigt). Hierdurch erfolgte eine Steigerung des IL-5/IFN- γ Ratio, welcher allerdings nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu führte eine Koapplikation von TPT und Reifungscocktail zu einer Verminderung der IFN- γ -Produktion (Daten nicht gezeigt). DCs, die stimuliert und mit TPT behandelt wurden, begünstigen somit eine Th2-Polarisierung.

In der Literatur wird IL-10 als Zytokin beschrieben, dass die Entwicklung von Th1 Zellen inhibiert und die Ausbildung von Th2-Zellen fördert²³¹. Desweiteren besitzt IL-10 durch seine immunsupprimierenden Eigenschaften die Fähigkeit, eine T-Zell-Hypoproliferation auszulösen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der IL-10 Gehalt in den DC/TC-Kokulturen analysiert (Abbildung 3.16 B). Der IL-10 Gehalt in Kokulturen von T-Zellen mit stimulierten DCs ist signifikant verringert im Vergleich zu Kokulturen, die unstimulierte DCs enthielten (Daten nicht gezeigt).

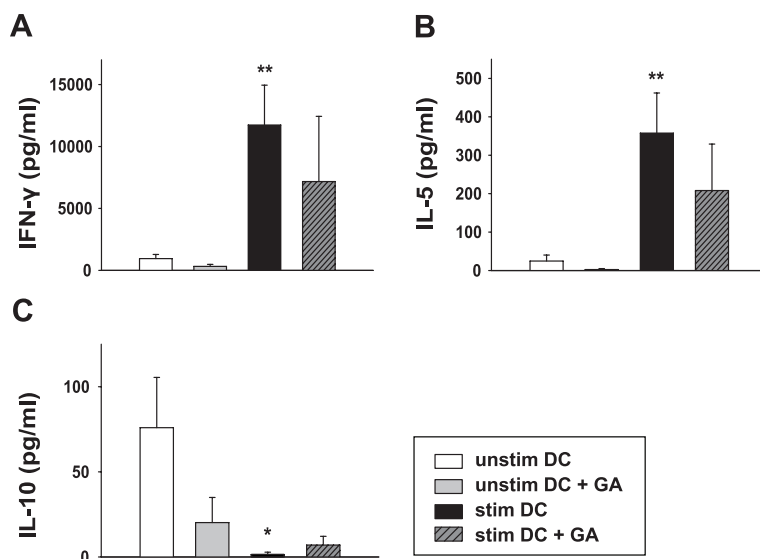


Abbildung 3.17 Die Behandlung von Mo-DCs mit GA hat keinen signifikanten Einfluss auf die Polarisierung der CD4+ T-Zellen.

Humane Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 0,1 μ M GA während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE₂) stimuliert. CD4⁺ T-Zellen (10^6) wurden mit den DC-Populationen (2×10^5) über einen Zeitdauer von vier Tagen kokultiviert. Die Überstände wurden an Tag vier gesammelt und der Gehalt an (A) IFN- γ , (B) IL-5, und (C) IL-10 und mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von zwei bis sieben unabhängigen Experimenten. (A, B, C) Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten DCs und stimulierten DCs sind angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Interessanterweise konnte in DC/TC Kokulturen mit TPT behandelten, unstimulierten DCs signifikant weniger IL-10 detektiert werden als in Kokulturen mit unbehandelten DCs. Im Gegensatz dazu war der Gehalt an IL-10 in Kokulturen mit DCs, denen der Reifungscocktail und TPT gleichzeitig gegeben wurden, gegenüber Kokulturen mit DCs, die nur mit dem Reifungscocktail stimuliert wurden signifikant erhöht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den IL-5/IFN- γ Untersuchungen spiegelte das Ergebnis des IL-10 ELISAs mit stimulierten DCs die Verschiebung in Richtung Th2 wieder. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Untersuchung auch der Einfluss von GA auf das Zytokinprofil von T-Zellen analysiert (Abbildung 3.17). Wie zuvor beschrieben, wurden allogene T-Zellen mit vorbehandelten DCs kokultiviert und der Zytokin-Gehalt im Kulturüberstand gemessen. Die Menge an IFN- γ und IL-5 in den Überständen von beiden T-Zellpopulationen, die mit GA behandelten DCs kokultiviert wurden, war nicht signifikant verändert. Der IL-10 Gehalt nahm in Überständen von mit unstimulierten, GA behandelten DCs aktivierten T-Zellen stark ab. Diese Abnahme war allerdings nicht signifikant.

3.1.9 Der Einfluss von TPT bzw. GA auf die Signaltransduktionswege humaner DCs

In den vorhergehenden Abschnitten dieses Kapitels wurde gezeigt, dass TPT und GA den Phänotyp und die Funktion von humanen DCs modulieren. Aus diesem Grund wurden Veränderungen der Expression von Komponenten DC-relevanter Signaltransduktionskaskaden mittels Immunblot untersucht

Durch eine Behandlung unstimulierter DCs mit TPT wurden die Mengen der Gesamtproteine p38, ERK1/2 und SAPK/JNK nicht beeinflusst (Abbildung 3.18 A). Nach Behandlung mit TPT konnte eine geringe Steigerung des phosphorylierten SAPK/JNK-Gehaltes in unstimulierten DCs detektiert werden. Stimulierung mit dem Reifungscocktail führte zu keiner Veränderung der Expression der MAP-Kinasen. Desweiteren wurde durch eine Koapplikation von Reifungscocktail und Chemotherapeutikum ihre Expressionsstärke nicht signifikant verändert. Einzig die Menge von phosphorylierten ERK1/2 wurde durch die Stimulierung mit dem Reifungscocktail vermindert. Die Koapplikation von Reifungscocktail und TPT führte im Vergleich mit stimulierten DCs zu einer weiteren Verminderung der Expression von phosphorylierten ERK1/2.

Die DC-Populationen zeigten sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach einer Stimulierung mit dem Reifungscocktail jeweils vergleichbare Expressionslevel an AKT (Abbildung 3.18 B). Die Gabe von TPT hatte keinen Einfluss auf die Menge von AKT bzw. phosphorylierten AKT in unstimulierten bzw. stimulierten Mo-DCs. Wurden DCs jedoch gleichzeitig stimuliert und mit TPT behandelt, führte dies zu einer Verringerung des Expressionslevels von phosphorylierten AKT (oberer Bande).

Angeichts der maßgebenden Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B für die DC-Aktivierung wurden die Expressionsniveaus von NF- κ B-Familienmitgliedern analysiert (Abbildung 3.18 C).

Unstimulierte DCs exprimierten I κ B α , RelB und NF- κ B (p65) in geringer Menge. Im Rahmen der Stimulierung mit dem Reifungscocktail wurden diese Effektorproteine vermehrt in den DCs exprimiert. Während eine Behandlung von unstimulierten DCs mit TPT keinerlei Effekte auf die Expression von I κ B α , RelB und NF- κ B hatte, wurde die maturierungsassoziierte Hochregulation der Expression dieser Effektorproteine durch TPT inhibiert, wenn es während Ausreifungsphase zu den DCs gegeben wurde.

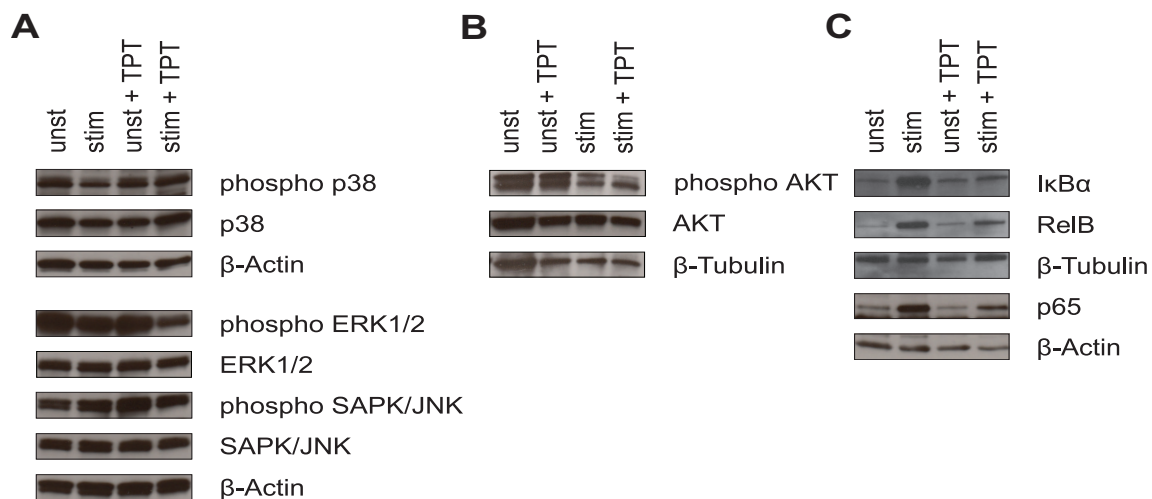


Abbildung 3.18 Der Einfluss von TPT auf die Signaltransduktionskaskaden in Mo-DCs.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 1 μ M TPT während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE₂) stimuliert. Proteinextrakte wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Gesamt und phosphoryliertes (A) p38, ERK1/2, SAPK/JNK, (B) AKT und (C) I κ B α , RelB und NF- κ B (p65) wurden mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern detektiert und mittels Immundetektion die Proteinbanden sichtbar gemacht. (A-C) Die Graphiken zeigen jeweils einen repräsentativen Immunblot aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten.

Um zu klären, inwieweit die inhibitorische Aktivität von NF- κ B bei der Verringerung des Proteinmengen durch TPT eine Rolle spielt, wurde zusätzlich die Translokation von RelB in den Nukleus mittel konfokaler Laserscanningmikroskopie, die freundlicherweise von Dr. S. Ritz am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz durchgeführt wurde, untersucht.

Zwischen der zytosolischen und der nukleären Distribution von RelB der verschiedenen DC-Populationen, wie in der Abbildung 3.19 dargestellt, wurden keine Veränderungen beobachtet. Durch die Behandlung mit TPT wurde die intrazelluläre Distribution des Proteins nicht verändert.

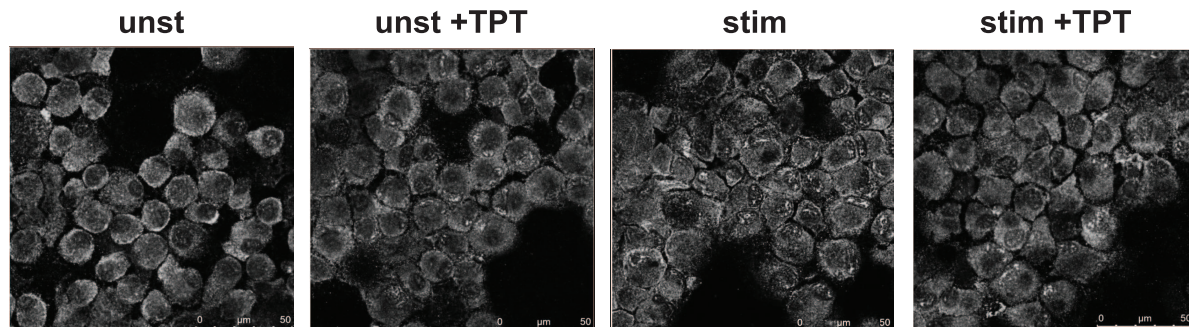


Abbildung 3.19 Der Einfluss von TPT auf die Translokation von RelB in den Nukleus.

Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 1 μM TPT während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE $_2$) stimuliert. Für die Immunfluoreszenz wurden 1×10^5 DCs auf Objektträger zentrifugiert. RelB wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die intrazelluläre Distribution wurde mit einem CSLM (LSM SP5 STED Leica Laser Scanning Confocal Mikroskop) aufgenommen. Für die Aufnahme wurde ein HCX PL APO CS 100 x 1,4 Ölobjektiv verwendet. Die Bildverarbeitung wurde mit Leica LAS AF lite und die Bildanalyse mit der Software Volocity 6.0.1 durchgeführt und die Bilder in Adobe Photoshop weiter bearbeitet. Die Bilder sind für zwei unabhängige Experimente repräsentativ.

Analog wurde der Einfluss von GA auf die DC-relevanten Signalwege untersucht. I κ B α , RelB und NF- κ B wurden von unstimulierten DCs exprimiert. Durch die Ausreifung der DCs erfolgte eine Aufregulation dieser Effektorproteine. Während in unstimulierten, GA behandelten DCs die Expression von I κ B α erhöht wurde, fand man bei einer Koapplikation des Reifungscocktail plus GA keine Veränderung der Proteinmenge gegenüber ausgereiften Mo-DCs. Interessanterweise wurde die Expression von RelB durch GA vermindert. Diesen Effekt konnte man ebenfalls bei phosphorylierten NF- κ B p65 beobachten. Gesamtprotein von NF- κ B wurde durch die Applikation von GA nicht verändert. Im Gegensatz dazu wurde die Expressionsstärke von AKT durch eine Behandlung mit GA nicht beeinflusst (Abbildung 3.20 B).

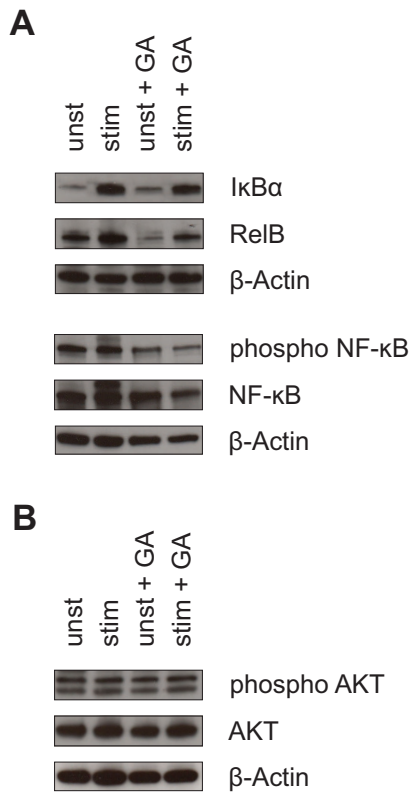


Abbildung 3.20 Der Einfluss von GA auf Signaltransduktionskaskaden in humanen DCs.

Humane Mo-DCs wurden differenziert und Aliquote mit 0,1 μ M GA während der letzten 48h der Zellkultur behandelt. Aliquote der DCs wurden zusätzlich mit dem Reifungscocktail (IL-1 β , TNF- α und PGE₂) stimuliert. Proteinextrakte wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Gesamt und phosphoryliertes (A) I κ B α , RelB und NF- κ B und (B) AKT wurden mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern detektiert und mittels Immundetektion die Proteinbanden sichtbar gemacht. (A-C) Die Graphiken zeigen jeweils einen repräsentativen Immunblot von zwei bis drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die These, dass eine Behandlung mit TPT in einer Modulierung des DC-Maturierungsstatus resultiert, wie aus den Veränderungen des AKT und NF- κ B Signalings hervorgeht. Ebenso resultiert eine Behandlung von Mo-DCs mit GA in einer Veränderung deren Phänotyps und Funktion. Diese Modulierung wird womöglich durch die veränderte Expressionsstärke der NF- κ B-Familienmitglieder vermittelt.

3.2 Phänotypische und funktionelle Analyse von BM-DCs aus Mäusen mit einem partiellen VHL Verlust

Die autosomal dominant vererbte von Hippel Lindau (VHL)-Krankheit wird durch Keimbahnmutationen im *VHL*-Tumorsuppressorgen verursacht⁶⁹.

Das VHL-Syndrom ist durch die Entwicklung von hoch vaskularisierten Tumoren in den verschiedensten Organen charakterisiert. Die klinische Manifestierung des VHL-Syndroms umfasst Hämangioblastome des Auges und des ZNS, Nierenzysten und klarzellige Nierenzellkarzinome, Pankreaszysten und -tumore, sowie Phäochromozytome^{232,233}. Die prominenteste Funktion des VHL-Proteins ist die Regulierung der HIF- α -Proteolyse²³⁴. Die genetische Inaktivierung des VHL-Gens resultiert in einer HIF- α Stabilisierung unter normoxischen Bedingungen und damit in einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF und dementsprechend einer Aufregulation von HIF-Zielgenen wie *VEGF*, *GLUT1* und *EPO*^{1,234}. Neben der Regulierung der Proteolyse von HIF- α ist VHL an vielen weiteren Prozessen beteiligt, die die Genexpression und Zellfunktion beeinflussen¹¹⁰.

In diesem Abschnitt der Arbeit sollten die Auswirkungen eines partiellen ko des *VHL*-Gens auf den Phänotyp und die Funktion von Immunzellen wie DCs und T-Zellen untersucht werden.

Für die Züchtung von transgenen Mäusen, die ein mutiertes Allel des *VHL*-Gens tragen und somit eine modulierte *VHL*-Expression aufweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Strategie der Cre/lox vermittelten Deletion angewandt. Dafür wurde eine Cre verwendet, die unter der Kontrolle des Aktin-Promotors stand. Da Aktin ubiquitär exprimiert wird, ist Cre in allen Zellen konstitutiv aktiv. Als Responderstämme wurden die Mausstämme, *VHL1^{fl/fl}* bzw. *VHL2^{fl/fl}* verwendet. Beide Responderstämme enthalten loxP-Sequenzen, die aber in verschiedenen Bereichen des *VHL*-Gens liegen. Der Mausstamm *VHL1^{fl/fl}*, bei dem der Promotorbereich und das Exon 1 des *VHL*-Gens durch loxP-Stellen flankiert ist, wurde bereits von Haase et al. im Jahr 2001 publiziert¹³¹. Aufgrund der Anordnung dieser loxP-Stellen kann kein funktionelles VHL-Protein entstehen. Zusätzlich wurde in einem weiteren Ansatz Exon 2 des *VHL*-Gens deletiert, wodurch allerdings immer noch ein funktionelles VHL-Protein entstehen kann. Die Generierung des Zielkonstrukts und die Herstellung der homozygoten *VHL2^{fl/fl}* Maus wurden von Dr. Dirk Reutzel (AG Zabel, Kinderklinik, Mainz) durchgeführt und freundlicherweise für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Verfügung gestellt. Da dieser Mausstamm noch nicht publiziert wurde, soll sein genetischer Aufbau zum besseren Verständnis des folgenden hier kurz beschrieben werden.

Zunächst wurde aus der genomischen 129 Ola-Maus-DNA-Bibliothek²³⁵ ein PAC Klon (RZPD-Nr.: MPMGC121G19440), der ein Segment des murinen *VHL*-Lokus von Intron 1 bis

zur 3'- nicht-translatierten Region (*untranslated region*, UTR) umfasst als Vektor (*backbone*) für das Zielkonstrukt (*ko targeting* Konstrukt) isoliert.

Aus diesem Vektor wurde ein acht kbp langes HindIII-Fragment, welches den *VHL*-Lokus enthielt, ausgeschnitten und in den Vektor pGEM11zf⁺ für weitere Modifizierungen kloniert. Zunächst wurde eine synthetische loxP-Sequenz innerhalb des Introns 1 in eine einmal vorkommende *SrfI*-Stelle inkloniert. Die Anwesenheit der loxP-flankierenden *XbaI*-Sequenz wurde später für die Verifizierung der präzisen Integration der rekombinanten Allele in das Genom der Embryostammzellen durch Southern-Blot-Analyse genutzt. Mittels PCR-vermittelter Mutagenese wurde eine *SacII*-Erkennungssequenz in das Intron 2 integriert, um eine Expressionskassette für Neomycin-Phosphotransferase²³⁶ einzufügen. In 3'-Position führt die Expressionskassette eine zweite loxP-Sequenz, um das konditionale Exon 2 k- Allel zu vervollständigen. Anschließend wurde die Neomycin-Selektionskassette mittels Flp-Rekombinase, deren Target die FRT-Sequenzen sind, innerhalb des klonierten *SacII*-Segments entfernt (Abbildung 3.21). Um die rekombinanten Stammzellklone nach Administration von Ganciclovir selektieren zu können, wurde am Schluss eine Negativ-Selektionskassette 5' zum Zielkonstrukt (HSV-Thymidinkinase) ligiert.

Das Zielkonstrukt wurde anschließend vollständig sequenziert durch *SfiI*-Restriktion linearisiert und mittels Elektroporation in totipotente W9.5 embryonische Stammzellen (ES)²³⁷ eingebracht. Nach Selektion mit Neomycin und Ganciclovir wurden über 500 rekombinante ES-Klone isoliert. Die homologe Rekombination des Zielvektors in der 5'-Region wurde durch *Southern Blot* überprüft. Die korrekte Integration innerhalb der 3'-Region wurde kontrolliert, indem ein genomisches Fragment mit einer Fragmentgröße von 4,7 kbp ab der Neomycin-Kassette in Richtung der 3'-Region des murinen *VHL*-Lokus amplifiziert und sequenziert wurde. Die überprüften rekombinanten Stammzellklone wurden in Blastozysten injiziert. Im Anschluss an die Blastozysten-Implantation in scheinchwangere NMRI-Ersatzmütter erhielt man chimäre Nachkommen mit einer großen Anzahl an rekombinierten Zellen. Die chimären Mäuse, die den konditionalen *ko* Lokus trugen, wurden mit transgenen Flp-*Deleter*-Mäusen verpaart (Mäuse wurden von Dr. S. Fraser, MPI für Zellbiologie und Genetik, Dresden freundlicherweise zur Verfügung gestellt), um die Neomycin-Kassette vom rekombinanten Lokus zu entfernen. Die Funktionalität des rekombinanten Lokus wurde kontrolliert, indem homozygot Exon2 geflochte (*VHL2^{fl/fl}*), weibliche Mäuse mit männlichen *Sycp1-Cre-Deleter*-Mäusen²³⁸ (freundlicherweise von Ernesto Bockamp, Zentrallabor für Molekulare Mausgenetik, Mainz zur Verfügung gestellt) verpaart wurden. Die Exzision des loxP-flankierten Exon2 in den Nachkommen wurde mittels PCR kontrolliert.

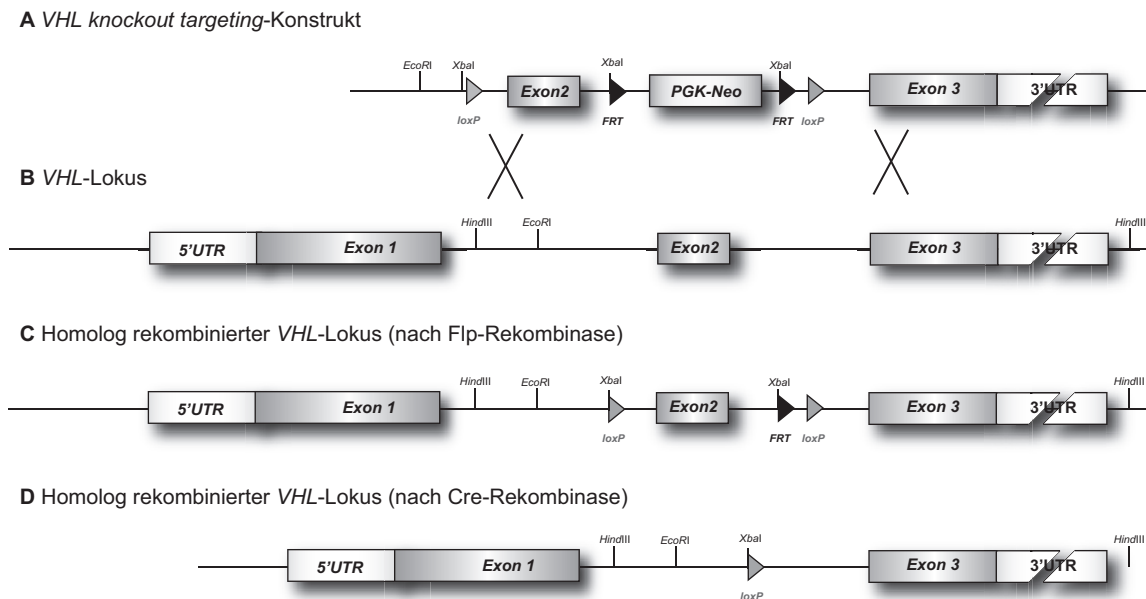


Abbildung 3.21 Schematische Darstellung des $VHL2^{fl/fl}$ und $VHL2^{wt/ko}$.

(A) VHL ko Zielvektor-Konstrukt. (B) Muriner VHL-Lokus. (C) Genomische Sequenz nach homologer Rekombination und FRT-vermittelter Deletion der Neomycin-Selektionskassette. (D) Genomische Maus-Sequenz nach Exzision der loxP-flankierten Sequenz durch die Cre-Rekombinase. Die zusätzlich eingefügte XbaI-Schnittstelle dient als diagnostischer Marker. Genomische XbaI-Restriktionsstellen sind bekannt²³⁵. Anhand der resultierenden Fragmentlängen lassen sich ES-Zelllinien mit homologer Rekombination durch eine entsprechende Sonde nachweisen (23 kbp: Wildtyp-Allel; 4 kbp: rekombinantes Allel).

3.2.1 Generierung von transgenen Mäusen mit heterozygoten VHL Exon2 ko

Ein homozygoter Verlust des *VHL*-Gens ist für Mäuse im Embryostadium letal. Homozygote $VHL^{ko/ko}$ Embryos scheinen sich bis Gestation E9.5 bis E10.5 normal zu entwickeln. In diesem Stadium entwickelt sich eine Dysgenese der Plazenta, die sich in fehlender Vaskulogenese und hämorrhagischen Läsionen manifestiert. Die Hämorrhagie verursacht letztendlich Nekrose und Tod des Embryos im Stadium E10.5 bis E12.5¹¹². Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Mäuse gezüchtet und verwendet, bei denen nur ein Allel des *VHL*-Gens vom ko betroffen ist. Um einen heterozygoten Verlust des *VHL*-Gens zu erzeugen, wurden ActinCre-Mäuse, die das Wildtyp-Allel von VHL ($VHL2^{wt/wt}$) tragen mit den geflochtenen *VHL2* Mäusen ($VHL2^{fl/fl}$) verpaart (siehe Abbildung 3.22).

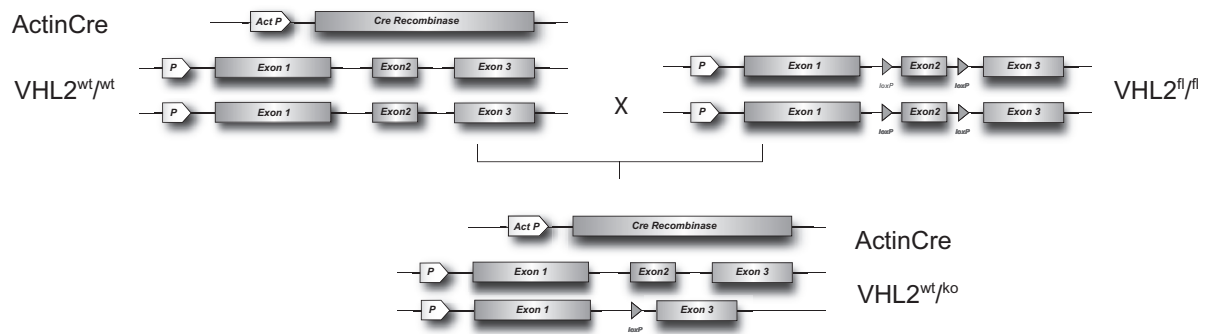


Abbildung 3.22 Kreuzungsschema zur Generierung von $VHL2^{wt/ko}$ Mäusen.

Für die Generierung von Mäusen mit einem partiellen VHL ko wurden Actin-Cre Mäuse, die die Wildtyp-Allele von VHL ($VHL2^{wt/wt}$) tragen mit geflochten v2ko ($VHL2^{fl/fl}$) Mäusen verpaart.

Für den Nachweis der Deletion des geflochten Exon 2 des *VHL*-Gens wurde aus den Ohrbiopsien der zu typisierenden Mäuse gDNA isoliert und eine spezifische PCR durchgeführt. Desweiteren wurden bei jedem Experiment die eingesetzten Zellen hinsichtlich ihres Genotyps überprüft. Für die Typisierung wurden zwei verschiedene Oligonukleotid-Pärchen verwendet. Das Paar sense F1 & antisense R1 (Abkürzung F1) wurde so designt, dass man die Deletion von Exon 2 nachweisen kann. Bei dem Paar sense F2 & antisense R1 (Abkürzung F2) wurden die Sequenzen so gewählt, dass man zwischen dem Wildtyp-Gen und dem geflochten *VHL*-Allel unterscheiden kann. In Abbildung 3.23 ist beispielhaft ein Gelbild einer Typisierung dargestellt. Die Kontrollen wurden von der AG Zabel bezogen. Heterozygote Mäuse weisen zwei Banden bei Verwendung des Oligonukleotid-Paares F2 auf, wobei die obere Bande das geflochte Allel und die untere Bande das Wildtyp-Allel darstellen. Eine Bande bei F1 ist nur sichtbar, wenn ein *lox out* stattgefunden hat. Bei den Proben eins und zwei ist jeweils eine Bande bei F1 und F2 sichtbar. Da die Bande bei F2 der Wildtyp-Bande (siehe Kontrolle *wt/wt*) entspricht und keine weitere Bande sichtbar ist, haben die Proben eins und zwei einen heterozygoten *VHL2 ko*. Im Gegensatz dazu weisen die Proben drei und vier keine Bande bei F1 auf. Dafür sind zwei Banden bei F2 sichtbar. Diese Mäuse sind $VHL2^{wt/fl}$ und weisen keine Cre auf. Sie wurden in den Experimenten als Kontrollen eingesetzt.

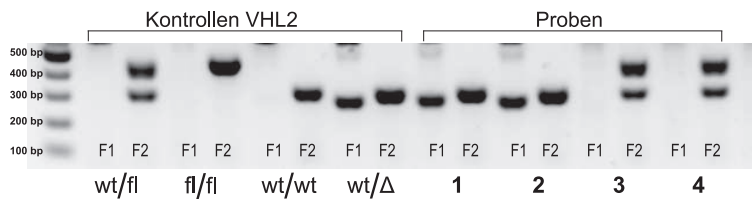


Abbildung 3.23 Nachweis des $VHL2^{wt/ko}$.

Für die Typisierung wurde aus Ohrbiopsien genomische DNA isoliert oder aus kultivierten Zellen gewonnen und mittels PCR und spezifischen Oligonukleotiden der Nachweis des partiellen VHL ko durchgeführt. F1 kennzeichnet das Oligonukleotid-Paar F1 (sense) & R1 (antisense), das die ko-Bande darstellt, während F2 für das Oligonukleotid-Paar F2 (sense) & R1 (antisense) steht, das die Wildtyp-Bande und die Bande für das gefloخته VHL Exon2 darstellt. Die Proben 1 und 2 weisen einen heterozygoten VHL2 ko auf, die Proben 3 und 4 zeigen ein gefloخته Allel und ein Wildtyp-Allel von VHL Exon2.

3.2.2 Phänotyp und Charakterisierung der heterozygoten $VHL2$ ko Mäuse

Bei der Verpaarung von ActinCre- und homozygot gefloختen $VHL2$ Tieren konnten keine Auffälligkeiten bzw. Unterschiede zu anderen Mauslinien beobachtet werden. Zwischen den $VHL2^{wt/ko}$ -Tieren und den Kontrolltieren konnte kein äußerlich sichtbarer Unterschied festgestellt werden. Auch hinsichtlich Gewicht und Größe stimmten die Mäuse überein. Bei der Präparation des Knochenmarks, der Milz und der Lymphknoten waren keine Organe makroskopisch auffällig. Bei der weiteren Charakterisierung der $VHL2^{wt/ko}$ -Mäuse wurde der Fokus auf Zelltypen des Immunsystems gelegt.

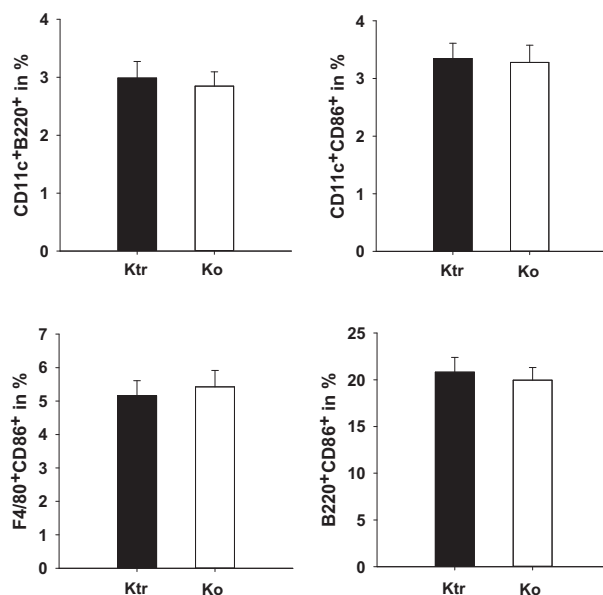


Abbildung 3.24 Frequenz von DCs, Makrophagen und B-Zellen.

Aus $VHL2^{wt/fl}$ (Ktr) und $VHL2^{wt/ko}$ (ko) wurden Milzzellen isoliert und im Durchflusszytometer anhand der Marker B220, CD11c, CD86 und F4/80 analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler von sieben Milzzell-Analysen pro Genotyp.

Um mögliche Unterschiede in der Frequenz der Immunzellen darzustellen, wurden Milzzellen isoliert und anhand verschiedener Oberflächenmarker charakterisiert. Die APCs wurden anhand der Expression an CD11c, CD86, B220 und F4/80 unterschieden (Abbildung 3.24). Plasmazytoide (CD11c⁺ B220⁺) und myeloide (CD11c⁺ CD86⁺) DCs waren sowohl in VHL2^{wt/ko}-Mäusen als auch in Kontrollmäusen in vergleichbarer Frequenz vertreten. Die Frequenz der Makrophagen (F4/80⁺ CD86⁺) und auch der B-Zellen (B220⁺ CD86⁺) war in beiden Mauspopulationen vergleichbar.

In Abbildung 3.25 sind die Frequenzen der verschiedenen T-Zell-Populationen dargestellt. In VHL2^{wt/ko}-Mäusen, sowie in den Kontrollen wurde die gleiche Anzahl an CD3⁺ Zellen detektiert. Ebenso unterschied sich die Frequenz der CD4⁺ Zellen zwischen den beiden Genotypen nicht. Es konnte auch kein Unterschied in der Anzahl der Tregs festgestellt werden. Im Gegensatz dazu besaßen VHL2^{wt/ko}-Mäuse signifikant mehr CD8⁺ Zellen als VHL2^{wt/fl}-Mäuse.

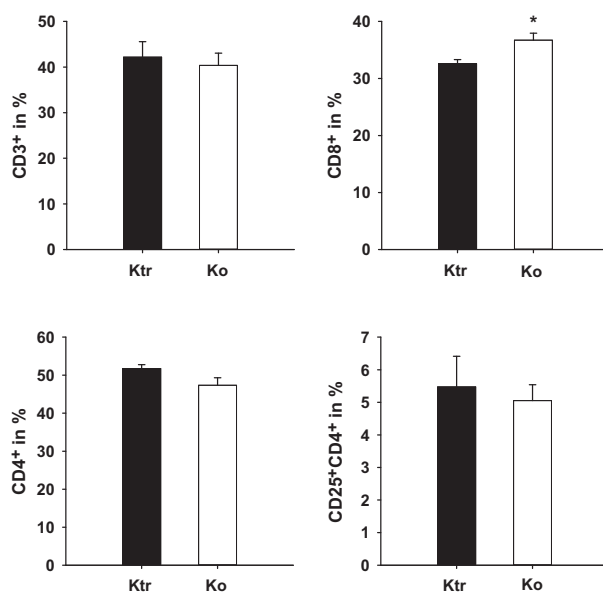


Abbildung 3.25 Frequenz der verschiedenen T-Zell-Populationen.

Aus VHL2^{wt/fl} (Ktr) und VHL2^{wt/ko} (ko) wurden Milzzellen isoliert und im Durchflusszytometer anhand der Marker CD3, CD4, CD8 und CD25 analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler von zwei durchgeführten Experimenten. Insgesamt wurden sieben Tiere pro Genotyp verwendet. Statistische signifikante Unterschiede zwischen Zellen aus Kontrollmäusen und heterozygoten VHL2 ko Mäusen sind angegeben (* p<0,05).

Weiterhin wurden die Frequenzen der MDSCs und NK-Zellen in den beiden Mauspopulationen untersucht. Die Frequenz der MDSCs (CD11b⁺ Gr1⁺) war signifikant erhöht in den Mäusen, bei denen VHL2 partiell deletiert wurde. Im Unterschied dazu wurde eine signifikant geringere Zahl an NK-Zellen (CD49b⁺) bei ko Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren detektiert.

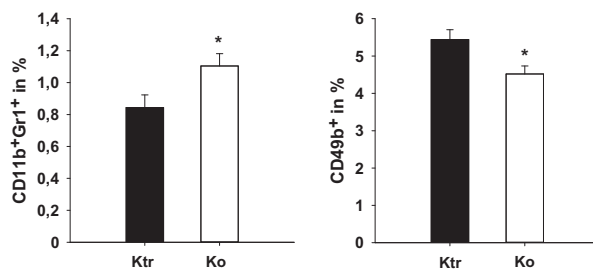


Abbildung 3.26 Frequenz der MDSCs und NK-Zellen.

Aus VHL2^{wt/fl} (Ktr) und VHL2^{wt/ko} (ko) wurden Milzzellen isoliert und im Durchflusszytometer anhand der Marker CD11b, Gr1 und CD49b analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler von zwei durchgeführten Experimenten. Insgesamt wurden sieben Tiere pro Genotyp verwendet. Statistische signifikante Unterschiede zwischen Zellen aus Kontrollmäusen und heterozygoten VHL2 ko Mäusen sind angegeben (* $p < 0,05$).

Zusammengefasst unterschieden sich interessanterweise VHL2^{wt/ko}-Mäuse in der Frequenz ihrer APCs nicht von Kontrollmäusen. Auch die T-Zell-Populationen waren scheinbar nicht durch den heterozygoten ko von VHL2 in ihrer Häufigkeit betroffen, einzig CD8⁺ T-Zellen waren im Gegensatz zu Kontrollmäusen vermehrt in den ko Mäusen vorhanden. Überraschend waren die genotypenabhängigen Unterschiede in der Frequenz der MDSCs und der NK-Zellen.

3.2.3 Analyse der Proliferation von T-Zellen aus heterozygoten VHL2 ko Mäusen

Die Fähigkeit antigenspezifischer T-Zellen zu proliferieren, ist von zentraler Bedeutung für eine effektive adaptive Immunantwort²³⁹. Um zu analysieren, ob durch einen heterozygoten ko von VHL2 die Proliferation der T-Zellen moduliert wird, wurden T-Zellen aus Milzen von Kontrollmäusen und VHL2^{wt/ko}-Mäusen isoliert und polyklonal mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Die Proliferation der beiden T-Zellpopulationen ist in

Abbildung 3.27 dargestellt, wobei die Proliferation von T-Zellen aus Kontrollmäusen gleich 100 % gesetzt wurde. Nach polyklonaler Stimulation proliferierten T-Zellen aus Kontrollmäusen in einem hohen Maß, während nach polyklonaler Stimulation von T-Zellen aus VHL2^{wt/ko}-Mäusen die Expansion der Zellen um 22 % vermindert ist im Vergleich zu Kontrollmäusen.

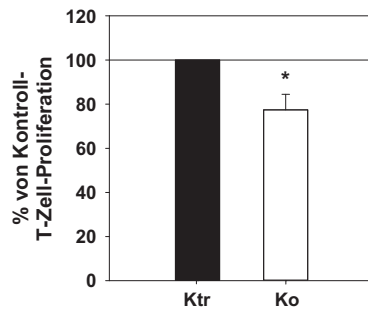


Abbildung 3.27 Proliferation von T-Zellen aus heterozygoten VHL2 ko Mäusen.

T-Zellen wurden aus $VHL2^{wt/fl}$ (Ktr) und $VHL2^{wt/ko}$ (ko) mittels Nylonwoll-Säulen aus Milzen isoliert. 3×10^5 T-Zellen pro Loch wurden in Triplikaten in einer 96-Loch-Platte eingesät und drei Tage bei 37°C und 10 % CO_2 inkubiert. Für die polyklonale Stimulation der T-Zellen wurden die Vertiefungen der 96-Loch-Platte zuvor mit anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet und zu den Kulturen anti-CD28 (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, normiert auf Kontroll-T-Zellen. Statistische signifikante Unterschiede zwischen T-Zellen aus Kontrollmäusen und heterozygoten VHL2 ko Mäusen sind angegeben (* $p < 0,05$).

3.2.4 Phänotypische Charakterisierung der aus heterozygoten VHL2 ko Mäusen isolierten BM-DCs

DCs besitzen die Fähigkeit, T-Zell-Antworten zu induzieren und zu modulieren¹⁶⁰. Um eine vollständige T-Zell-Antwort auszulösen, müssen DCs im Laufe ihrer Reifung, kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD40, CD80 und CD86 hoch regulieren¹⁶⁰. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, inwieweit der partielle ko von VHL2 in BM-DCs einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von DC-Markern besitzt.

Hierfür wurden BM-DCs aus Knochenmark-Vorläuferzellen aus $VHL2^{wt/fl}$ - und $VHL2^{wt/ko}$ -Mäusen generiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 3.29). Durch die Ausreifung mit LPS wurde die Expression der Oberflächenmoleküle MHCII, CD80 und CD86 von Kontroll-DCs signifikant erhöht (Abbildung 3.28). Um Unterschiede zwischen $VHL2^{wt/ko}$ -DCs und Kontroll-DCs zu verdeutlichen, wurden Kontroll-DCs gleich 100 % gesetzt.

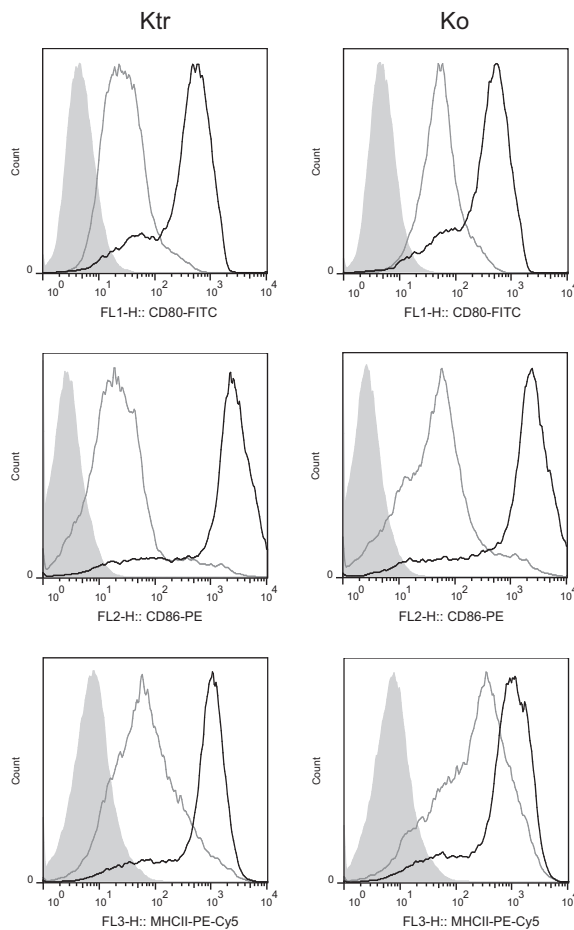


Abbildung 3.28 Die Ausreifung von BM-DCs mit LPS bedingt eine Erhöhung der Expression distinkter Oberflächenmarker. Knochenmarkszellen aus $VHL2^{wt/fl}$ (Ktr) und $VHL2^{wt/ko}$ (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über 9 Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS für 24 h. Die Expression der Moleküle MHCII, CD80 und CD86 wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme repräsentieren den jeweiligen Isotyp Kontroll-Antikörper (grau-schattierte Fläche) und die spezifische Oberflächenfärbung für immature BM-DCs (graue Linie) und mature BM-DCs (schwarze Linie).

Im unstimulierten Zustand exprimierten $VHL2^{wt/ko}$ -DCs auf ihrer Oberfläche mehr MHCII-Moleküle sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 als Kontroll-DCs. Wurden die unstimulierten BM-DCs aus den ko Tieren maturiert, erhöhte sich die Expression der Oberflächenmarker signifikant (Abbildung 3.28). Im Vergleich zu Kontroll-DCs exprimierten $VHL2^{wt/ko}$ -DCs signifikant weniger MHCII und CD86 auf ihrer Oberfläche. Die Expression von CD80 blieb durch den ko von VHL2 unbeeinflusst.

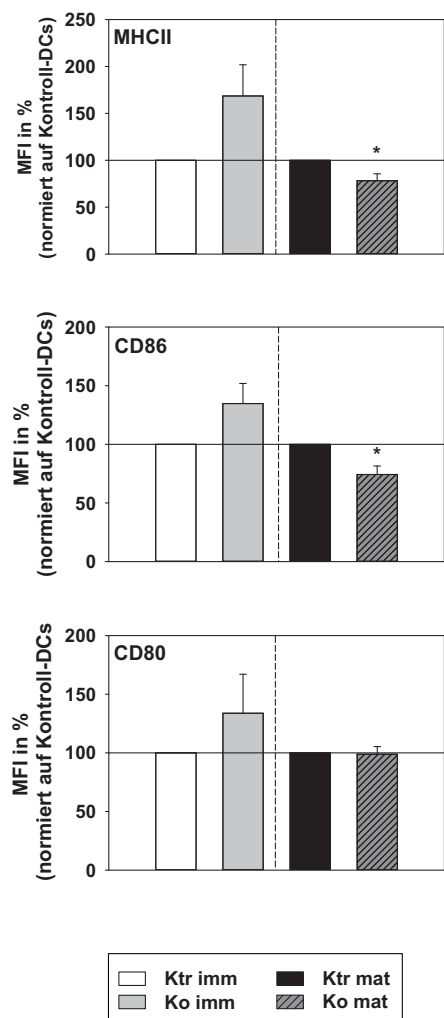


Abbildung 3.29 Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle und MHCII von heterozygoten VHL2 ko-DCs.

Knochenmarkszellen aus $VHL2^{wt/fl}$ (Ktr) und $VHL2^{wt/ko}$ (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über 9 Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS für 24 h. Die Expression der Moleküle MHCII, CD80 und CD86 wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die relativen Änderungen der Oberflächenexpression sind als *mean fluorescence intensities* (MFI) dargestellt. Die MFIs der Kontroll-DCs wurden gleich 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen $VHL2^{wt/ko}$ -DCs bzw. Kontroll-DCs sind angegeben (* $p < 0,05$).

3.2.5 Die Endozytose-Kapazität von heterozygoten VHL2 ko-DCs

Die Fähigkeit zur Endozytose ist essentiell für die Präsentation von Antigenen mittels MHC-Molekülen und somit auch nachfolgend für die T-Zell-Aktivierung¹⁴¹. DCs nehmen lösliches Antigen über zwei verschiedene Mechanismen auf, entweder durch Makropinozytose oder über Clathrin-vermittelte Endozytose²⁴⁰. Während Makropinozytose eine unspezifische Form der Endozytose ist, die Membranausstülpungen involviert, ist die Clathrin-vermittelte Endozytose durch die Beteiligung von verschiedenen Rezeptoren wie zum Beispiel Fc-Rezeptoren, Transferrin-Rezeptoren oder Makrophagen-Mannose-Rezeptoren liganden-selektiv²⁴⁰.

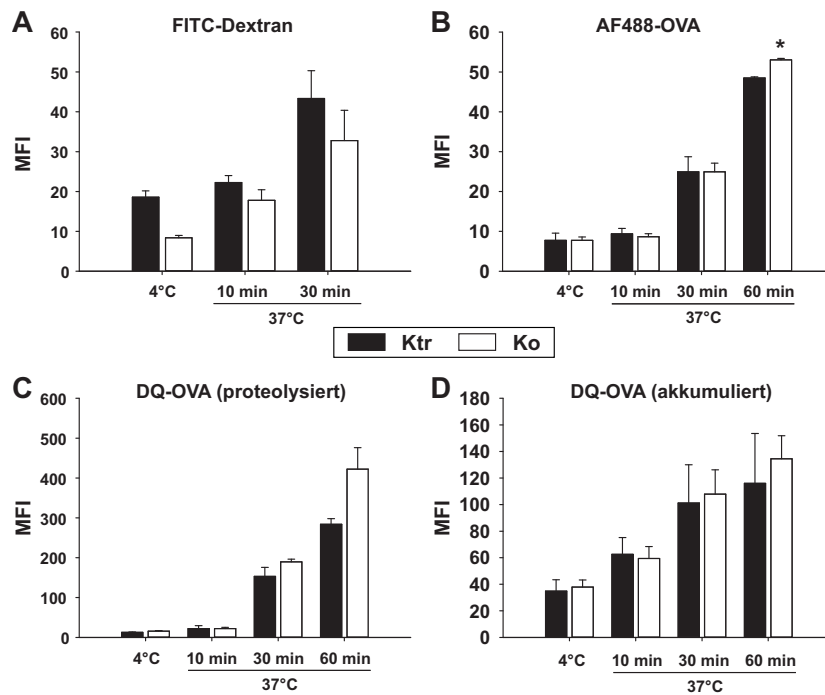


Abbildung 3.30 Der partielle Verlust von VHL2 in BM-DCs besitzt keinen distinkten Einfluss auf die Endozytose-Kapazität.

Knochenmarkszellen aus $VHL2^{wt/fl}$ (Ktr) und $VHL2^{wt/ko}$ (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. BM-DCs (5×10^5) wurden mit (A) FITC-konjugierten Dextran, (B) Alexa Fluor 488 (AF488)-OVA oder (C, D) mit DQ-OVA über die angegebenen Zeiträume (10 min, 30 min, 60 min) bei 37°C und als Kontrolle parallel bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die BM-DCs gewaschen und die Aufnahme von Dextran bzw. OVA im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von zwei bis fünf unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen Kontroll-DCs bzw. $VHL2^{wt/ko}$ -DCs sind angegeben (* $p < 0,05$).

FITC-Dextran wurde von DCs im unstimulierten Zustand bei 4°C kaum aufgenommen. Erst nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C erhöhte sich die Endozytose-Kapazität von beiden DC-Populationen. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der FITC-Dextran-Aufnahme zwischen $VHL2^{wt/ko}$ -Mäusen und Kontrollmäusen (Abbildung 3.30 A). Neben FITC-Dextran wurde zur Analyse der Endozytose-Kapazität OVA als ein weiteres Antigen verwendet. In der Abbildung 3.30 B ist die Aufnahme von Alexa Fluor 488 (AF488)-OVA dargestellt. Mit zunehmender Inkubationszeit wurde AF488-OVA vermehrt von den DCs aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 60 min war die Aufnahmekapazität der BM-DCs von $VHL2^{wt/ko}$ -Mäusen signifikant höher im Vergleich zu $VHL2^{wt/ko}$ -Mäusen. DQ-OVA bietet durch die Konjugation an BODIPY FL die Möglichkeit, je nach Fluoreszenz zwischen degradiertem und in Zellorganellen gespeichertem OVA zu unterscheiden (Abbildung 3.30 C, D). Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei 37°C befand sich die Proteolyse von DQ-OVA bei beiden DC-Populationen auf einem basalen Level.

Nach 30 Minuten war die Degradation deutlich erhöht. Nach weiteren 30 min besaßen VHL2^{wt/ko}-DCs eine gesteigerte proteolytische Aktivität, die jedoch im Vergleich zu Kontroll-DCs nicht signifikant war. Die Akkumulation von DQ-OVA war erkennbar von der Dauer der Inkubation bei 37°C abhängig. Der heterozygote Verlust von VHL2 hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation von DQ-OVA in den Zellen.

3.2.6 Der partielle Verlust von VHL2 führt zu einem verminderten Migrationsverhalten von DCs in vivo

In 3D Kollagengelen wurde die spontane Migration der BM-DCs in vitro untersucht (Abbildung 3.31 A). Das Migrationsverhalten von BM-DCs mit einem partiellen VHL2 ko unterschied sich kaum von dem der Kontroll-DCs. Beide DC-Populationen legten im Gel im Beobachtungszeitraum eine vergleichbare Entfernung zurück. Allerdings bewegten sich Kontroll-DCs tendenziell schneller im Gel im Vergleich zu VHL2^{wt/ko}-DCs.

Für Untersuchungen der in vivo Migration wurde eine FITC-Lösung auf die Ohren aufgetragen und anschließend die drainierenden Lymphknoten mittels FACS untersucht. Wie in Abbildung 3.31 B dargestellt wurden in Lymphknoten der Kontrolltiere nach 24 h ca. 3 % FITC⁺ DCs detektiert. Im Vergleich dazu war die Frequenz der FITC⁺ DCs (2 %) in den Lymphknoten von Mäusen mit einem partiellen VHL2 ko signifikant verringert.

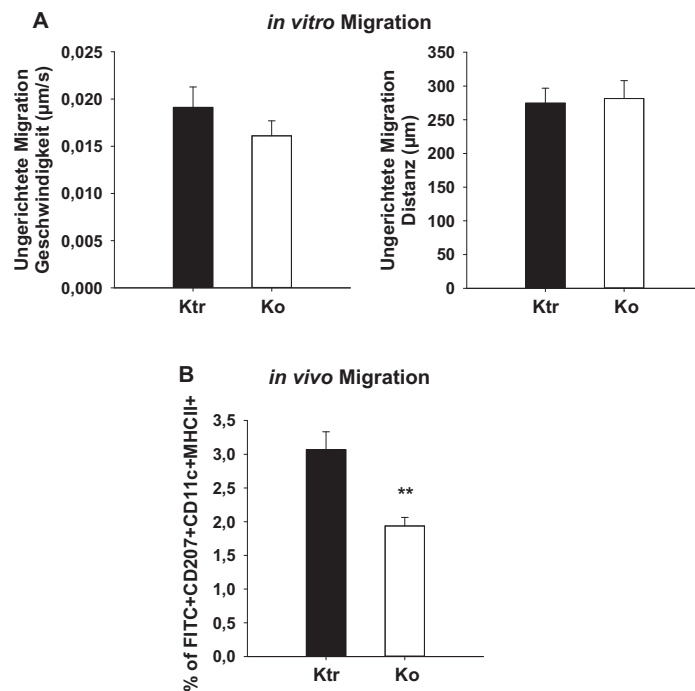


Abbildung 3.31 Der partielle Verlust von VHL2 vermindert die Migration der BM-DCs in vivo.

Knochenmarkszellen aus VHL2^{wt/fl} (Ktr) und VHL2^{wt/ko} (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über neun Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag acht mit 1 µg/ml LPS für 24 h. (A) Es wurden 3D Kollagen Matrizen, die jeweils 3 x 10⁵ DCs enthielten, präpariert und die Bewegungen der verschiedenen Zellpopulationen im Bezug auf Geschwindigkeit und Distanz über einen Zeitraum von sechs Stunden im Zeitraffer mit einem Olympus BX61 Mikroskop mit einer UAPO Linse (20x/340, NA 0.75) beobachtet. Die Bilder wurden alle 2 min von einer FView Kamera aufgenommen und mit der Software Cell^P analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten, was insgesamt 215-230 individuell analysierten Zellen pro Population entspricht. (B) Die Ohren von jeweils fünf heterozygoten VHL2 ko Mäusen und Kontrollmäusen wurden mit einer FITC-Lösung bestrichen. Nach 24 h wurde die Maus getötet und die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen. Die Lymphknotenzellen wurden anschließend gegen CD11c, CD207 und MHCII gefärbt und im FACS analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils fünf Mäusen pro Genotyp. Statistische signifikante Unterschiede zwischen heterozygoten VHL2 ko-DCs bzw. Kontroll-DCs sind angegeben (** p<0,01)

3.2.7 Das Aktivierungspotential von BM-DCs für allogene T-Zellen wird durch einen heterozygoten Verlust von VHL2 nicht beeinflusst

Mittels DC/T-Zell-Kokulturen wurde untersucht, inwieweit ein heterozygoter Verlust von VHL2 zu einer veränderten allogenen primären T-Zell-Aktivierungskapazität von BM-DCs führt. In Abbildung 3.32 sind die Ergebnisse für die jeweilige DC-Population dargestellt, wobei die durch unstimulierte Kontroll-DCs induzierte T-Zell-Proliferation gleich eins gesetzt wurde. Unstimulierte Kontroll-DCs besaßen ein moderates T-Zell-Stimulierungspotential. Die Ausreifung mit LPS bewirkte eine signifikante Steigerung der T-Zell-Aktivierungskapazität.

Im Vergleich dazu konnten unstimulierte BM-DCs aus VHL2^{wt/ko}-Tieren ebenfalls allogene T-Zellen kaum zur Proliferation anregen, obgleich eine Stimulierung mit LPS zu einer signifikanten Steigerung der T-Zellaktivierungskapazität führte. Wurden die Proliferationsraten der allogenen T-Zellen, die entweder mit muren VHL2^{wt/ko}-DCs oder muren Kontroll-DCs stimuliert wurden, miteinander verglichen, fand man keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen.

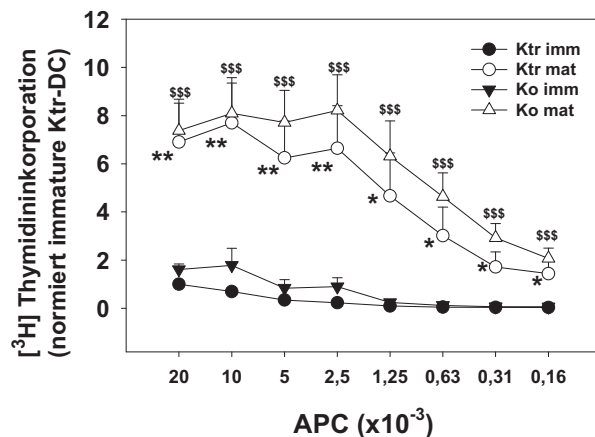


Abbildung 3.32 Heterozygote VHL2 ko-DCs zeigen kein verändertes allogenes T-Zell-Stimulierungspotential im Vergleich zu Kontroll-DCs.

Knochenmarkszellen aus VHL2^{wt/fl} (Ktr) und VHL2^{wt/ko} (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über neun Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag acht mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils 3 x 10⁵ T-Zellen aus BALB/cJ Mäusen für drei Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [³H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten, normiert auf unstimulierte Kontroll-DCs (2 x 10⁴). Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten und stimulierten Kontroll-DCs bzw. (°) unstimulierten und stimulierten heterozygoten VHL2 ko-DCs sind angegeben (* p<0,05; ** p<0,01; \$\$\$ p<0,001).

3.2.8 Heterozygote VHL2 ko-DCs verändern das Zytokinprofil von allogenen T-Zellen

Wie in Abbildung 3.32 gezeigt, vermittelten VHL2^{wt/ko}-DCs und Kontroll-DCs eine vergleichbare allogene T-Zell-Proliferation. Trotzdem keine Unterschiede in der Proliferation sichtbar waren, kann das Zytokinprofil der T-Zellen durch die verschiedenen DC-Populationen moduliert sein. Aus diesem Grund wurden die Zytokine im Überstand der DC/TC-Kokulturen mittels ELISA analysiert. In Kokulturen mit unstimulierten Kontroll-DCs bzw. VHL2^{wt/ko}-DCs und allogenen BALB/cJ T-Zellen wurden vergleichbare Konzentrationen des Th1-Markerzytokins IFN-γ detektiert (Abbildung 3.33 A). Infolge der Stimulierung mit LPS der beiden DC-Populationen wurde IFN-γ nach Aktivierung der T-Zellen vermehrt

produziert, jedoch wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Maus-Genotypen beobachtet.

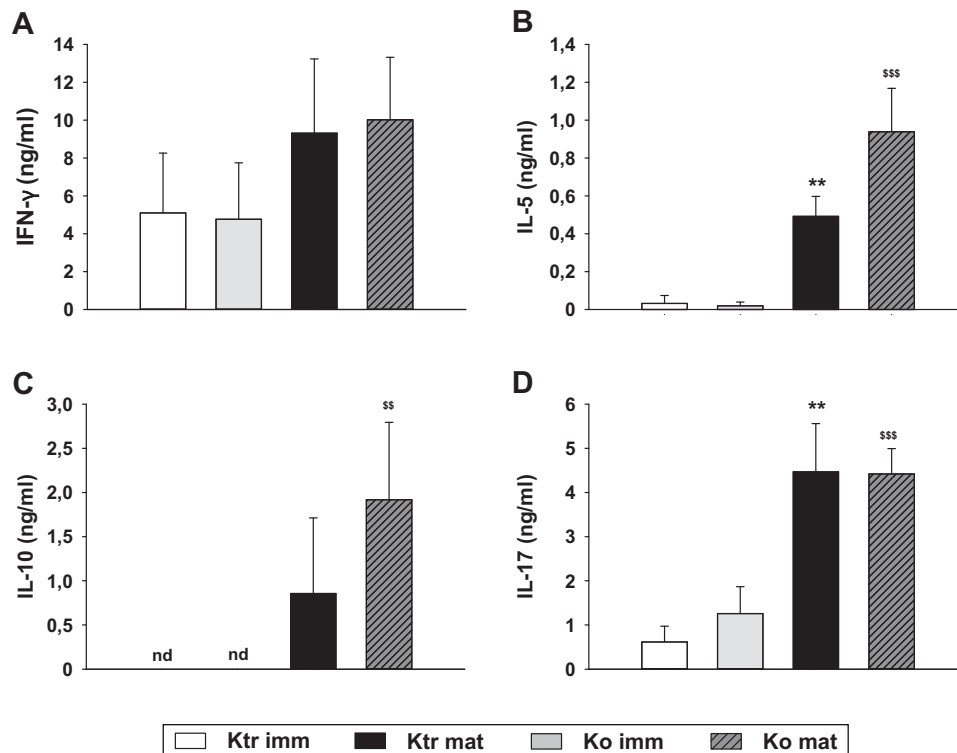


Abbildung 3.33 BALB/cJ T-Zellen, die mit VHL2^{wt/ko}-DCs kokultiviert wurden, sekretieren tendenziell vermehrt IL-5 und IL-10.

Knochenmarkszellen aus VHL2^{wt/fl} (Ktr) und VHL2^{wt/ko} (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über neun Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag acht mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Heterozygote VHL2 ko oder Kontroll-DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils 2 x 10⁵) wurden für drei Tage mit 3 x 10⁶ T-Zellen aus BALB/cJ Mäusen in einem Volumen von 1 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und die Konzentration von (A) IFN-γ, (B) IL-5, (C) IL-10 und (D) IL-17 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten und stimulierten Kontroll-DCs bzw. (§) unstimulierten und stimulierten VHL2^{wt/ko}-DCs sind angegeben (**, §§ p<0,01; §§§ p<0,001).

Das Th2-Markerzytokin IL-5 wurde sowohl von mit unstimulierten Kontroll-DCs als auch von mit VHL2^{wt/ko}-DCs stimulierten T-Zellen kaum sekretiert (Abbildung 3.33 B). Dahingegen wiesen T-Zellen, die mit maturaen Kontroll-DCs stimuliert wurden, signifikant erhöhte IL-5 Konzentrationen auf. Im Vergleich dazu wurden in den Kulturüberständen von LPS stimulierten, VHL2^{wt/ko}-DCs und T-Zellen deutlich höhere IL-5 Konzentrationen detektiert, wobei dieser Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-DCs nicht signifikant war. Das ambivalente Th2/Treg-Markerzytokin IL-10 wurden in den Kokulturen von unstimulierten BM-

DCs, aus Kontroll- bzw. VHL2^{wt/ko}-Tieren und BALB/cJ T-Zellen nicht nachgewiesen (Abbildung 3.33 C). Im Gegensatz dazu induzierten mature Kontroll-DCs eine IL-10 Produktion, die wenn allogene T-Zellen mit LPS stimulierten BM-DCs aus ko Mäusen kokultiviert wurden, gesteigert wurde. Wie in Abbildung 3.33 D gezeigt, führte der heterozygote VHL2 Verlust in unstimulierten BM-DCs zu einer vermehrten IL-17 Produktion von allogenen T-Zellen, dieser Unterschied war im Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht signifikant. Die Stimulation der T-Zellen mit maturaen Kontroll-DCs resultierte in einer signifikanten Steigerung der IL-17 Konzentrationen im Kulturüberstand, wobei eine Kokultivierung von allogenen T-Zellen mit VHL2^{wt/ko}-DCs im Vergleich zu maturaen Kontroll-DCs zu keiner Veränderung der IL-17 Sekretion führte.

3.2.9 Die antigenspezifische Proliferation von OT-I T-Zellen bzw. von OT-II T-Zellen wird durch Stimulation mit 1 µg OVA beladenen BM-DCs mit partiellem VHL2 ko moduliert

Im nächsten Schritt wurde die antigenspezifische Proliferation von TCR-transgenen T-Zellen untersucht. OT-I bzw. OT-II T-Zellen erkennen ein im Kontext von MHC I (OT-I) bzw. MHC II (OT-II) präsentiertes OVA-Peptid. Für die Untersuchung wurden Knochenmarkszellen aus VHL2^{wt/fl}- bzw. VHL2^{wt/ko}-Mäusen isoliert, zu BM-DCs differenziert und für 24 h mit OVA in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die so OVA beladenen DCs wurden zusammen mit OT-I oder OT-II T-Zellen über einen Zeitraum von drei Tagen kokultiviert. Abbildung 3.34 veranschaulicht die antigenspezifische Proliferation der OT-I T-Zellen. Die Beladung der unstimulierten BM-DCs aus Kontroll-Mäusen sowie aus VHL2^{wt/ko}-Mäusen mit 1 µg OVA resultierte in keiner veränderten Proliferation der OT-I T-Zellen. Auch eine Beladung der unstimulierten Kontroll-DCs und VHL2^{wt/ko}-DCs mit OVA in höheren Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung der T-Zellen. Eine Stimulierung der Kontroll-DCs mit LPS und Inkubation mit 1 µg OVA führten zu einer signifikant höheren T-Zellaktivierungskapazität. Die antigenspezifische Proliferation der OT-I T-Zellen nach Aktivierung durch 1 µg OVA beladene, VHL2^{wt/ko}-DCs war gegenüber der durch Kontroll-DCs induzierten OT-I T-Zellproliferation geringfügig, aber signifikant erhöht. Wurden die VHL2^{wt/ko}-DCs mit höheren Konzentrationen von OVA inkubiert, konnte die Steigerung dieser OVA-spezifischen T-Zellaktivierungskapazität im Vergleich zu Kontroll-DCs nicht mehr beobachtet werden.

OT-I T-Zellen

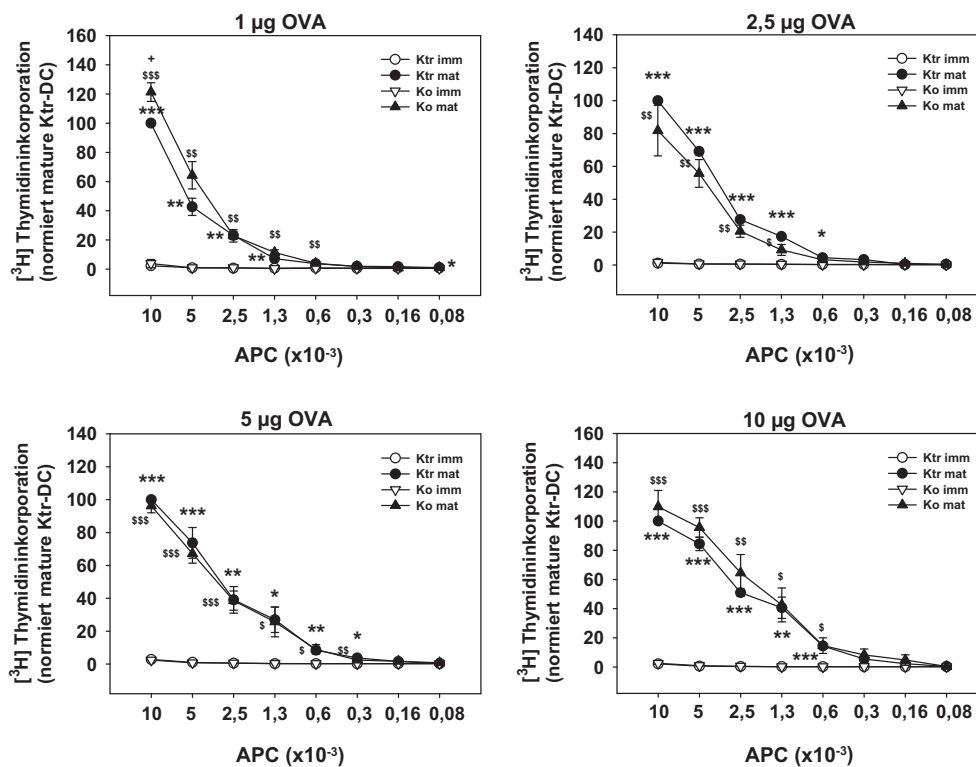


Abbildung 3.34 Die antigenspezifische Proliferation von OT-I T-Zellen.

Knochenmarkszellen aus $\text{VHL2}^{\text{wt/fl}}$ (Ktr) und $\text{VHL2}^{\text{wt/ko}}$ (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über neun Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag acht mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS für 24 h. Die Beladung der BM-DCs mit OVA erfolgte an Tag acht, die jeweilige Konzentration ist angegeben. Nach der Kultur wurden die Zellen zweimal gewaschen. Heterozygote VHL ko oder Kontroll-DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils 1×10^5) wurden für drei Tage mit 5×10^5 T-Zellen aus OT-I Mäusen in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ kokultiviert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis vier unabhängigen Experimenten, normiert auf maturierte Kontroll-DCs. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten und stimulierten Kontroll-DCs, (§) unstimulierten und stimulierten heterozygoten $\text{VHL2}^{\text{wt/ko}}$ -DCs bzw. (†) Kontroll-DCs und $\text{VHL2}^{\text{wt/ko}}$ -DCs im stimulierten Zustand sind angegeben (*,§,† $p > 0,05$; **,§§ $p < 0,01$; ***,§§§ $p < 0,001$).

Desweiteren wurde die Proliferation von OT-II T-Zellen untersucht (Abbildung 3.35). Eine Beladung der unstimulierten Kontroll-DCs mit $1 \mu\text{g}$ OVA resultierte in einer sehr geringen Proliferation der OT-II T-Zellen. Auch OVA ($1 \mu\text{g}$) beladene $\text{VHL2}^{\text{wt/ko}}$ -DCs im unstimulierten Zustand waren nicht in der Lage OT-II T-Zellen zu aktivieren. OT-II T-Zellen zeigten nach Aktivierung durch LPS stimulierte und mit $1 \mu\text{g}$ OVA beladene Kontroll-DCs hingegen eine signifikant gesteigerte T-Zell-Proliferation. Im Gegensatz dazu zeigten mit $1 \mu\text{g}$ OVA inkubierte und mit LPS ausgereifte BM-DCs aus $\text{VHL2}^{\text{wt/ko}}$ -Mäusen gegenüber der Kontrollpopulation ein signifikant verringertes T-Zellaktivierungspotential. Bei einer Inkubation der BM-DC-Gruppen mit höheren OVA-Konzentrationen trat dieser Unterschied nicht auf.

OT-II T-Zellen

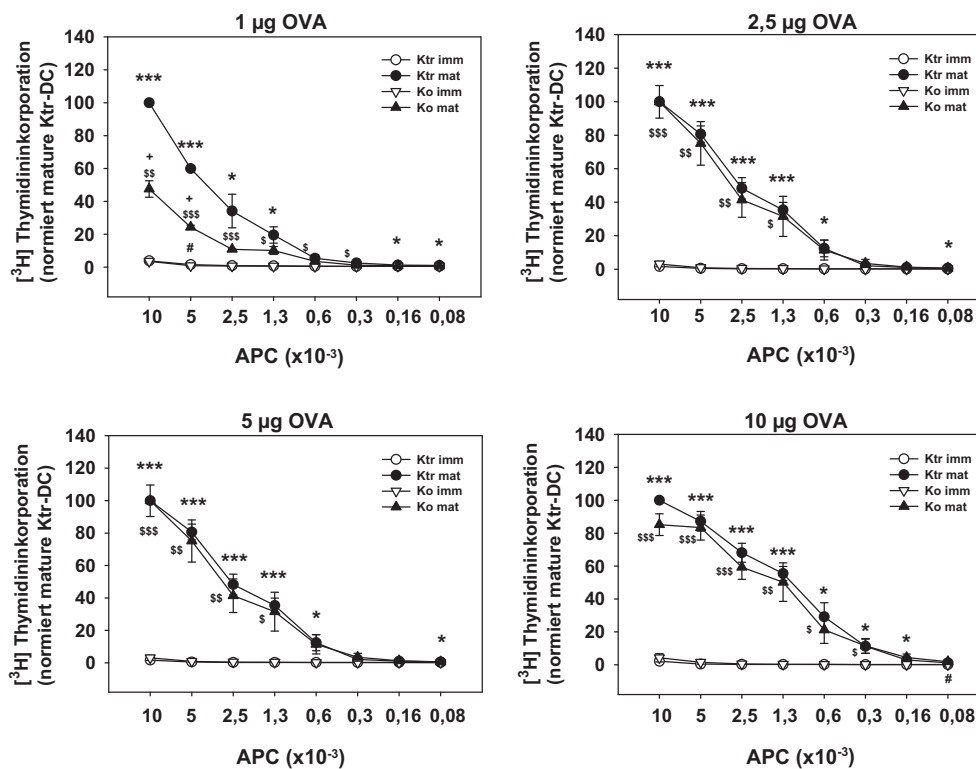


Abbildung 3.35 Die antigenspezifische Proliferation von OT-II T-Zellen.

Knochenmarkszellen aus $VHL2^{wt/fl}$ (Ktr) und $VHL2^{wt/ko}$ (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über neun Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag acht mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS für 24 h. Die Beladung der BM-DCs mit OVA erfolgte an Tag acht, die jeweilige Konzentration ist angegeben. Nach der Kultur wurden die Zellen zweimal gewaschen. Heterozygote VHL ko oder Kontroll-DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils 1×10^4) wurden für drei Tage mit 5×10^5 T-Zellen aus OT-II Mäusen in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ kokultiviert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis vier unabhängigen Experimenten, normiert auf matrierte Kontroll-DCs. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten und stimulierten Kontroll-DCs, (^s) unstimulierten und stimulierten heterozygoten $VHL2$ ko-DCs bzw. (+) Kontroll-DCs und $VHL2^{wt/ko}$ -DCs im stimulierten Zustand sind angegeben (*,^s,+ $p > 0,05$; **,^{ss} $p < 0,01$; ***,^{sss} $p < 0,001$).

3.2.10 Analyse der allergischen Atemwegsentzündung in heterozygoten $VHL2$ ko Mäusen

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde beobachtet, dass BM-DCs und T-Zellen durch einen partiellen Verlust von VHL funktionale Veränderungen aufweisen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob diese Veränderungen Auswirkungen auf den Verlauf von DC-abhängigen Erkrankungen in vivo besitzen.

Der Einfluss des heterozygoten $VHL2$ ko auf die allergische Atemwegsentzündung wurde mittels der Lungenfunktionsmessung analysiert (Abbildung 3.36). Hierfür wurden die Mäuse mit dem Modellallergen OVA sensibilisiert und provoziert. 48 h nach der letzten Provokation

wurde die allergische Atemwegsentzündung anhand der Atemwegsreaktivität und der Bestimmung der spezifischen Immunglobulin-Konzentration im Serum analysiert.

Die intranasale Provokation von Kontroll-Mäusen mit PBS resultierte mit steigenden Methacholin-Dosen in einem Anstieg des Atemwegswiderstandes. Erfolgte die Provokation der Kontrollmäuse mit dem Modellallergen OVA, führte dies nach Inhalation von Methacholin zu einer deutlich signifikanten Steigerung des Atemwegswiderstandes im Vergleich zu PBS Kontroll-Tieren. VHL2^{wt/ko}-Mäuse, die mit PBS provoziert wurden, entwickelten eine Atemwegsreaktion nach Applikation von ansteigenden Methacholin-Dosen, die sich auf dem Niveau der Kontrollmäuse befand. Bemerkenswerterweise führte der heterozygote VHL2 ko bei Tieren, die mit OVA sensibilisiert und provoziert wurden, zu einer weniger starken Erhöhung des Atemwegswiderstandes nach Gabe der angegebenen Methacholin-Dosen im Vergleich zu OVA sensibilisierten Kontrollmäusen.

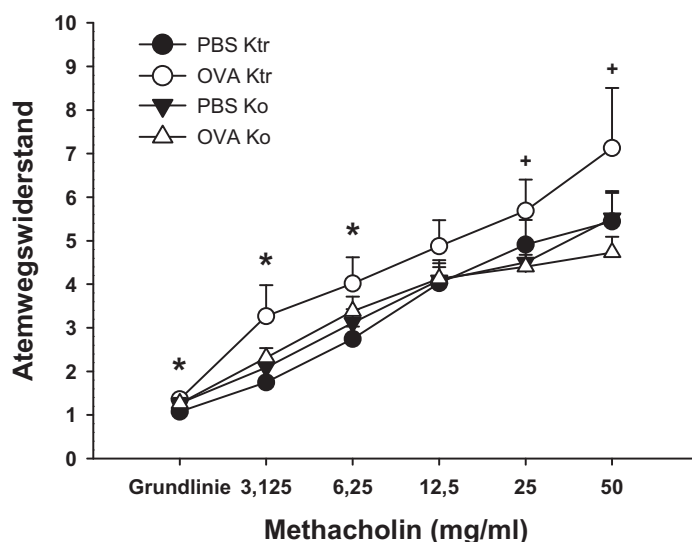


Abbildung 3.36 Messung des Atemwegswiderstandes nach Sensibilisierung und Provokation mit dem Modellantigen OVA.

VHL2^{wt/fl} (Ktr) und VHL2^{wt/ko} (ko) Mäusen wurden an Tagen 0, 7 und 14 mit 100 µg OVA, adsorbiert an Aluminiumhydroxid sensibilisiert. Die Provokation der Mäuse erfolgte an Tag 25-27. 48 h nach der letzten Provokation wurde die Messung der Lungenfunktion unter ansteigenden Dosen von Methacholin (3,125 – 50 mg/ml), welches in einer geschlossenen Kammer der Firma BUXCO® vernebelt wurde, durchgeführt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Atemwegswiderstände ± Standardfehler von vier unabhängig durchgeführten Experimenten. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (•) OVA sensibilisierten und PBS sensibilisierten Kontroll-Mäusen bzw. (+) OVA sensibilisierten Kontroll- und VHL2^{wt/ko}-Mäusen sind angegeben (*, + p>0,05).

Wie in Abbildung 3.37 gezeigt, hat der heterozygote ko von VHL eine Auswirkung auf die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung. Als ein weiterer Parameter wurden die Immunglobuline im Serum der Tiere analysiert. Eine Immunisierung mit PBS hatte eine geringe Bildung von OVA-spezifischem IgE zur Folge (Abbildung 3.37). Durch Immunisierung mit dem Modellallergen OVA stieg die OVA-spezifische IgE-Produktion in Kontrollmäusen stark an. $VHL2^{wt/ko}$ -Mäuse zeigten eine geringere IgE-Produktion als Kontrollmäuse. Eine IgG1/IgG2a-Produktion in PBS-immunisierten Tieren konnte nicht beobachtet werden. Infolge einer Sensibilisierung mit OVA kommt es in Kontrolltieren zu einer starken Induktion der OVA-spezifischen IgG1- bzw. IgG2a-Produktion. Währenddessen zeigen $VHL2^{wt/ko}$ -Tieren in der Tendenz eine höhere IgG1-Produktion.

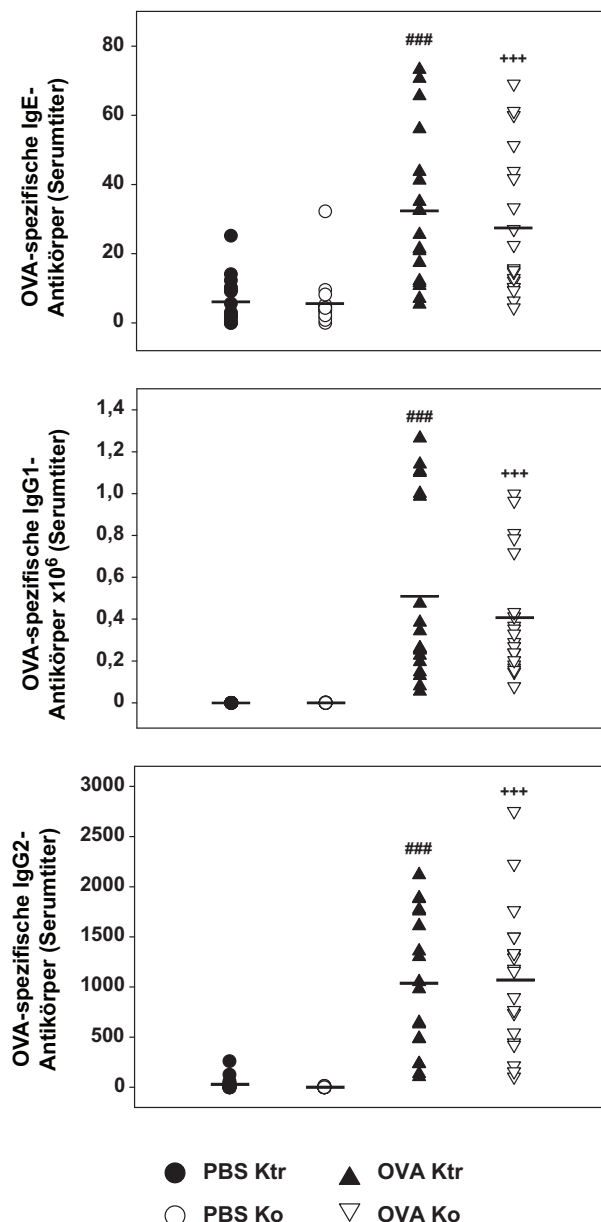


Abbildung 3.37 Einfluss des partiellen VHL2 ko auf die OVA-spezifische Ig-Produktion nach Sensibilisierung mit OVA.

$VHL2^{wt/fl}$ (Ktr) und $VHL2^{wt/ko}$ (ko) Mäusen wurden an Tagen 0, 7 und 14 mit 100 µg OVA, adsorbiert an Aluminiumhydroxid sensibilisiert. Die intranasale Provokation der Mäuse erfolgte an Tag 25-27. 48 h nach der letzten Provokation wurden den Mäusen Blut entnommen und die Konzentration der OVA-spezifischen IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörper im Serum mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.2.11 Generierung von Mäusen mit heterozygotem VHL1 ko

Die Generierung des Mausstammes VHL1 wurde bereits von Haase et al.¹³¹ publiziert. Dieser Mausstamm ist gekennzeichnet durch loxP-Stellen, die den Genpromotor und Exon1 flankieren. Durch Verwendung einer Cre-Rekombinase kann durch Rekombination VHL deletiert werden. Wie schon im Kapitel 3.2.1 beschrieben, führt der homozygote Verlust von VHL zu embryonalen Letalität. Aus diesem Grund wurden ActinCre Mäuse, die das Wildtyp-Allel von VHL ($VHL1^{wt/wt}$) tragen mit homozygot geflochten VHL1 ($VHL1^{fl/fl}$) Mäusen verpaart, um einen heterozygoten VHL1 ko ($VHL1^{wt/ko}$) zu erzeugen (Abbildung 3.38).

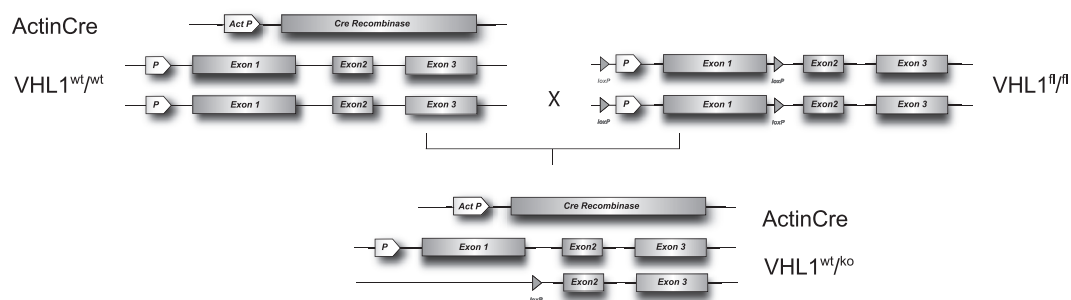


Abbildung 3.38 Kreuzungsschema zur Generierung von heterozygoten VHL1 ko Mäusen.

Für die Generierung von Mäusen mit einem partiellen VHL1 ko wurden Actin-Cre Mäuse, die die Wildtyp-Allele von VHL ($VHL1^{wt/wt}$) tragen mit geflochten VHL Exon1 ($VHL1^{fl/fl}$) Mäusen verpaart.

Zur Typisierung der Mäuse wurde aus Ohrbiopsien gDNA gewonnen und mittels einer spezifischen PCR der *lox out* von Exon 1 nachgewiesen. Zum Nachweis der Deletion von Exon 1 in Zellen wurde aus den kultivierten BM-DCs eines jedes Experimentes die gDNA isoliert und im Anschluss die spezifische PCR durchgeführt. In Abbildung 3.39 ist eine solche Typisierungs-PCR dargestellt. Die Kontrollen wurden von der AG Zabel bezogen. Die Oligonukleotid-Kombination F1 (sense) und R1 (antisense) weisen den ko nach, während die Kombination F2 (sense) und R1 (antisense) den Nachweis für die geflochten Allele erbringen. Heterozygot geflochte v1ko weisen eine Doppelbande für F2 & R1 auf, die obere Bande kennzeichnet das geflochte Allel und die untere Bande das Wildtyp-Allel. Homozygot geflochte VHL1 besitzen eine Bande für F2 & R1 mit einer Größe von ca. 400 bp. Mäuse mit einer heterozygoten Deletion des Exon1 von VHL besitzen für F2 & R1 die Wildtyp-Bande (ca. 300 bp) und zusätzlich für die F1 & R1 eine Bande, die ungefähr 250 bp lang ist. Die in der Abbildung 3.39 sichtbare Bande (gekennzeichnet durch *) zwischen 500 bp und 1000 bp ist ein unspezifisches Nebenprodukt der PCR. Die Probe eins weist einen heterozygoten ko für

Exon1 auf, während die Proben zwei, drei und vier heterozygot gefloxt sind und somit ein gefloxtes Exon 1-Allel und ein Wildtypallel besitzen.

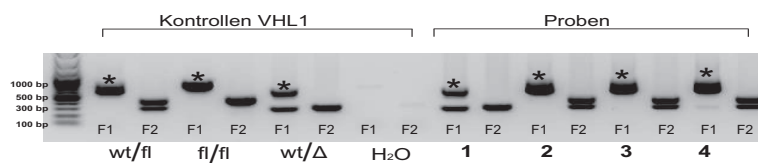


Abbildung 3.39 Nachweis des heterozygoten VHL1 ko.

Für die Typisierung wurde aus Ohrbiopsien genomische DNA isoliert oder aus kultivierten Zellen gewonnen und mittels PCR und spezifischen Oligonukleotiden der Nachweis des partiellen VHL1 ko durchgeführt. F1 kennzeichnet das Oligonukleotid-Paar F1 (sense) & R1 (antisense), das die ko-Bande darstellt, während F2 für das Oligonukleotid-Paar F2 (sense) & R1 (antisense) steht, das die Wildtyp-Bande und die Bande für das gefloxtes VHL Exon1 darstellt. Die Probe 1 weist einen heterozygoten VHL1 ko auf, die Proben 2, 3 und 4 sind heterozygot VHL Exon1 gefloxt. * Bande ist ein unspezifisches Nebenprodukt der PCR.

3.2.12 Phänotypische Analyse von heterozygoten VHL1 ko-DCs

Wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, spielt die Oberflächenexpression der Moleküle MHC, CD86 und CD80 von DCs bei der Aktivierung von T-Zellen eine wesentliche Rolle. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Deletion von Exon 1 von *VHL* auf die Expression der vorgenannten Oberflächenmoleküle untersucht. Hierfür wurde aus heterozygot gefloxtes VHL1 (Kontrollmäusen) und heterozygoten VHL1 ko Mäusen Knochenmark isoliert und daraus BM-DCs generiert. Die Expression von MHCII, CD80 und CD86 wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert und ist in Abbildung 3.40 dargestellt. Unstimulierte BM-DCs aus Kontrollmäusen exprimierten die eben genannten Moleküle auf einem niedrigen Niveau. Erst durch die Ausreifung mit LPS wurden sowohl MHCII, als auch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 vermehrt auf der Oberfläche der Zellen exprimiert (Daten nicht dargestellt). Um Unterschiede zwischen Kontroll-DCs und $VHL1^{wt/ko}$ -DCs besser darzustellen, wurden die Oberflächenexpression der Kontroll-DCs gleich 100 % gesetzt. Die Expression von MHCII auf unstimulierten BM-DCs wurde durch den partiellen Verlust von VHL1 nicht beeinflusst. Die reifungsbedingte erhöhte Expression von MHCII von Kontroll-DCs unterschied sich nicht signifikant von $VHL1^{wt/ko}$ -DCs. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 von $VHL1^{wt/ko}$ -DCs bleibt im Vergleich zu Kontroll-DCs unverändert, unabhängig von Maturierungsstatus.

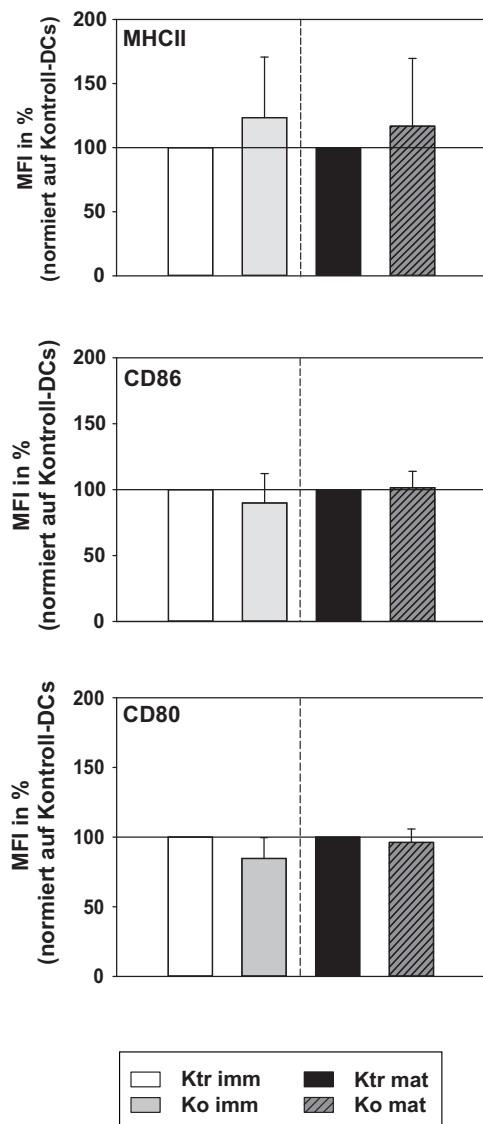


Abbildung 3.40 Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle und MHCII von heterozygoten VHL1 ko-DCs.

Knochenmarkszellen aus VHL1^{wt/fl} (Ktr) und VHL1^{wt/ko} (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über 9 Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die Expression der Moleküle MHCII, CD80 und CD86 wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die relativen Änderungen der Oberflächenexpression sind als *mean fluorescence intensities* (MFI) dargestellt. Die MFIs der Kontroll-DCs wurden gleich 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.13 Die Migration von heterozygoten VHL1 ko-DCs unterscheidet sich nicht signifikant von Kontroll-DCs

Das Migrationsverhalten in vitro von unstimulierten und stimulierten BM-DCs von VHL1^{wt/fl}- bzw. VHL1^{wt/ko}-Mäusen wurde in 3D Kollagengelen untersucht (Abbildung 3.41). Unstimulierte Kontroll-DCs zeigten ein moderates Migrationsverhalten. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für unstimulierte VHL1^{wt/ko}-DCs beobachtet. Eine Ausreifung der BM-DCs aus Kontrollmäusen und aus VHL1^{wt/ko}-Mäusen führte zu einer signifikanten Steigerung der Geschwindigkeit und der Distanz, die die DCs im Gel zurücklegten. Durch den partiellen VHL1 ko wurde die Geschwindigkeit der maturaen BM-DCs im Vergleich zu maturaen Kontroll-DCs nicht verändert. VHL1^{wt/ko}-DCs konnten hingegen eine tendenziell längere Strecke im Gel zurücklegen.

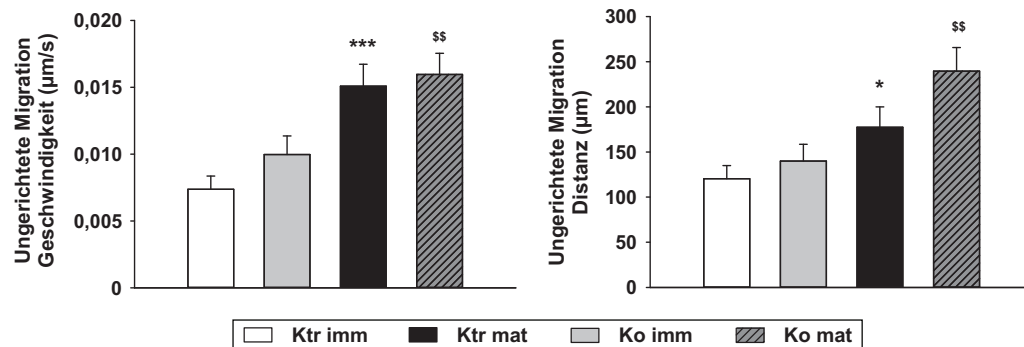


Abbildung 3.41 Der partielle Verlust von VHL hat keinen signifikanten Einfluss auf die Migration in vivo.

Knochenmarkszellen aus VHL1^{wt/fl} (Ktr) und VHL1^{wt/ko} (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über neun Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag acht mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Es wurden 3D Kollagen Matrizen, die jeweils 3 x 10⁵ DCs enthielten, präpariert und die Bewegungen der verschiedenen Zellpopulationen im Bezug auf Geschwindigkeit und Distanz über einen Zeitraum von sechs Stunden im Zeitraffer mit einem Olympus BX61 Mikroskop mit einer UAPO Linse (20x/340, NA 0.75) beobachtet. Die Bilder wurden alle 2 min von einer FView Kamera aufgenommen und mit der Software Cell^P analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten, was 64-84 individuell analysierten Zellen pro Population entspricht. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten und stimulierten Kontroll-DCs, ([§]) unstimulierten und stimulierten VHL1^{wt/ko}-DCs sind angegeben (* p<0,05; ^{§§} p<0,01; *** p<0,001).

3.2.14 Heterozygote VHL1 ko-DCs weisen kein verändertes T-Zellaktivierungspotential auf

Ob die T-Zell-stimulatorische Funktion der BM-DCs durch den partiellen ko von VHL verändert wird, wurde mittels einer MLR überprüft. Hierfür wurden aus Knochenmark-Vorläuferzellen von VHL1^{wt/ko}-bzw. VHL1^{wt/fl}-Mäusen BM-DCs generiert und in verschiedenen Verhältnissen mit allogenen T-Zellen aus BALB/cJ Mäusen kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde über den Einbau von tritiummarkierten Thymidin in die DNA gemessen. In Abbildung 3.42 sind die Ergebnisse der MLR dargestellt. Die durch 2 x 10⁴ mature Kontroll-DCs induzierte T-Zellproliferation wurde gleich 100 % gesetzt. Während unstimulierte Kontroll-DCs ein geringes Potential aufwiesen, allogene T-Zellen zu aktivieren, sind mit LPS ausgereifte Kontroll-DCs in der Lage eine hohe T-Zell-Proliferation zu induzieren. VHL1^{wt/ko}-DCs zeigten eine vergleichbare T-Zellproliferation. Im unstimulierten Zustand wiesen die VHL1^{wt/ko}-DCs ein ähnlich moderates T-Zellaktivierungspotential wie unstimulierte Kontroll-DCs auf.

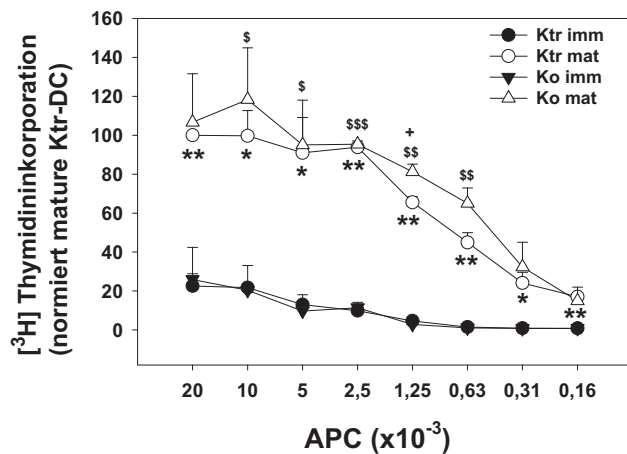


Abbildung 3.42 Der heterozygote ko von VHL Exon 1 beeinflusst das T-Zellaktivierungspotential von BM-DCs bei hohen DC/T-Zell-Verhältnissen.

Knochenmarkszellen aus VHL1^{wt/fl} (Ktr) und VHL1^{wt/ko} (ko) wurden mit Hilfe von GM-CSF über neun Tage zu BM-DCs differenziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag acht mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils 3 x 10⁵ T-Zellen aus BALB/cJ Mäusen für drei Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [³H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten, normiert auf stimulierte Kontroll-DCs. Statistische signifikante Unterschiede zwischen (*) unstimulierten und stimulierten Kontroll-DCs bzw. (§) unstimulierten und stimulierten heterozygoten VHL1 ko-DCs bzw. (+) Kontroll-DCs und heterozygoten VHL1 ko-DCs im stimulierten Zustand sind angegeben (*,§,+ p<0,05; **,§§ p<0,01; §§§ p<0,001).

Zusammenfassend betrachtet, hat der partielle Verlust von VHL Exon2 einen Einfluss auf die Funktion und den Phänotyp von DCs. Von besonderem Interesse ist jedoch, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass VHL2^{wt/ko}-Mäuse eine weniger stark ausgeprägte Atemwegsreaktion ausbilden als Kontrollmäuse. Die Ergebnisse der Analysen mit VHL1^{wt/ko}-DCs zeigen ebenfalls, dass der Einfluss von VHL auf die Funktion und den Phänotyp von BM-DCs gering ist.

4 Diskussion

4.1 Chemotherapeutika und ihre Wirkung auf DCs

Bei der Initiierung und Modulierung von Immunantworten besitzen DCs als professionelle APCs eine bedeutende Schlüsselrolle¹⁴¹. Immature DCs fungieren als immunologische Sensoren, die vor potentiell gefährlichen Mikroorganismen warnen, die sie entweder direkt durch mikrobielle Komponenten oder durch (Gefahren-)Signale, die vom angeborenen Immunsystem gesendet werden, erkennen¹⁴². Immature DCs dekodieren und integrieren diese Signale und leiten die Informationen an adaptive Immunzellen weiter¹⁴⁹. Somit ist die Art der adaptiven Immunantwort stark von der Natur der DC-aktivierenden Stimuli abhängig¹⁴².

Unter homöostatischen Bedingungen residieren DCs im peripheren Gewebe und in lymphoiden Organen, wobei einige DC-Subpopulationen auch im Blut zirkulieren¹⁴². Immature DCs besitzen die Fähigkeit Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und zu prozessieren¹⁵⁰. Nach Kontakt mit PAMPs bzw. DAMPs oder auch proinflammatorischen Zytokinen, die von Zellen im umgebenen Mikromilieu sekretiert werden, migrieren hierdurch aktivierte DCs in die sekundären lymphoiden Organe. Mit der induzierten Ausreifung geht ein Verlust der Phagozytosekapazität, eine starke Aufregulation der Oberflächenexpression von MHC Molekülen und kostimulatorischen Rezeptoren (CD80, CD86), sowie die Sekretion von Zytokinen einher¹⁴⁹. In den sekundären lymphoiden Organen präsentieren DCs das prozessierte Antigen im Kontext von MHC I- bzw. II-Molekülen naiven T-Zellen. Diese Interaktion führt zur terminalen Maturierung der DCs, die letztendlich zu weiterer Expansion und Differenzierung von T-Zellen zu T-Effektorzellen wie z.B. T-Helferzellen führt und auf diese Weise primäre Immunantworten induziert¹⁷⁵.

DCs spielen nicht nur bei der Immunabwehr gegen Pathogene eine große Rolle, sondern sie sind ebenso unerlässlich in der Generierung von Antitumorantworten. DCs sind der Lage Tumore zu infiltrieren¹⁶⁸. Dort nehmen sie Tumorantigene auf und induzieren die Differenzierung von CTLs¹⁷³. Tumorzellen exprimieren Tumorantigene im Kontext von MHC I-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Dabei wird unterschieden zwischen spezifischen Tumorantigenen, die auch als Neoantigene bezeichnet werden und tumorassoziierten Antigenen²⁴¹. Neoantigene, die durch Genmutationen entstehen, werden im Gegensatz zu tumorassoziierten Antigenen nur von Tumorzellen exprimiert¹⁷⁰. Tumorassoziierte Antigene werden sowohl von Tumorzellen als auch von körpereigenen Zellen exprimiert, wobei die Antigendichte auf der Oberfläche von Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen deutlich erhöht ist^{171,242}. Aufgrund der hohen Expressionsfrequenz auf Tumorzellen und der Beschaffenheit der Tumorantigene können CTLs Tumorzellen erkennen und eliminieren²⁴³.

Gegen Tumore existieren zahlreiche Behandlungsmöglichkeiten. Neben operativen Eingriffen gehören Strahlentherapie, Hormontherapie und Chemotherapie mittlerweile zu den Standardtherapien bei vielen Tumorerkrankungen. Nicht nur die Kontrolle des Wachstums, sondern auch die Induktion einer langanhaltenden und vor allem spezifischen Antitumor-Immunantwort gegen den Primärtumor, Rezidive und Metastasen ist perspektivisch das Hauptziel einer effektiven Immun-Tumortherapie²⁴⁴.

Für metastasierende Tumore ist die Chemotherapie die bevorzugte Behandlung¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Basierend auf ihrer zytotoxischen Wirkung und ihrem antiproliferativen Effekt können chemotherapeutische Agenzien Tumorzellen abtöten und somit eine Regression des Tumors bewirken¹⁸⁸. Aufgrund ihrer Wirkungsweise und Zytotoxizität werden Chemotherapeutika oft als Immunsuppressoren beschrieben. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass einige Agenzien Antitumor-Immunantworten induzieren können¹⁹⁰. Die Entwicklung von Tumoren korreliert oftmals mit dem Auftreten von Tumortoleranz, welche den Tumor vor einer Abstoßung durch das Immunsystem bewahrt und die Effizienz einer Immuntherapie verhindert¹⁸⁶. Tumorzellen induzieren dabei die Proliferation und die lokale Akkumulation von immunsuppressiven Zellen wie MDSCs oder Tregs. Desweiteren induzieren Tumorzellen die Expansion von immaturren myeloiden Zellen und die Entstehung einer T-Zell-Dysfunktion, die durch einen Verlust bzw. eine verminderte Expression des TCR, eine Inhibition der T-Zell-Kostimulation und eine verminderte IFN- γ -Produktion charakterisiert ist^{183,245}. Aufgrund des Eingreifens vieler Antitumor-Agenzien in die molekularen und zellulären Mechanismen, die die Ursache einer tumorinduzierten Toleranz sind, kann es zu einer Wiederherstellung einer effizienten Immunantwort kommen. Letztendlich kann dieses Remodellieren des Immunsystems zu einem therapeutischen Erfolg einer Chemotherapie beitragen¹⁸⁸.

Angesichts der elementaren Rolle von DCs als Auslöser einer nachhaltigen Antitumor-Immunantwort ist es notwendig, den Einfluss von Antitumor-Agenzien auf die DC-Differenzierung und -Aktivierung zu untersuchen. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund die Effekte der Chemotherapeutika TPT und GA auf humane Mo-DCs untersucht.

4.1.1 Der Effekt von TPT auf Phänotyp und Funktion von Mo-DCs

TPT ist ein semi-synthetisches Alkaloid-Derivat von Camptothecin, das in dem asiatischen Baum *Camptotheca acuminata* vorkommt. TPT fungiert als potenter Inhibitor der Top I²⁴⁶, die als intranukleäres Enzym eine Schlüsselrolle bei der Replikation, Transkription und beim Reparaturmechanismus der DNA spielt²⁴⁷. Top I bindet an spezifische Regionen der DNA und induziert somit die Relaxation der *supercoiled* DNA⁶¹. Dabei wird ein sogenannter *cleavable complex* (Spaltkomplex) gebildet. Es erfolgen Einzelstrangbrüche der DNA und anschließend die Wiederherstellung der DNA-Struktur. TPT bindet an den *cleavable complex* und induziert Doppelstrangbrüche, die nicht repariert werden können und letztendlich zu Apoptose und Zelltod führen⁶¹.

Da TPT bei vielen verschiedenen Tumoren als Chemotherapeutikum eingesetzt wird²⁴⁸⁻²⁵¹ wurden in dieser Arbeit zunächst die zytotoxische Wirkung und der antiproliferative Effekt von TPT auf zwei immortalisierte Zelllinien experimentell bestätigt. Die verwendeten Konzentrationen von TPT entsprachen dabei den Serumkonzentrationen von Patienten, die eine Chemotherapie absolvieren^{252,253}. Es zeigte sich, dass TPT in diesem Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Mo-DCs besitzt. Grund hierfür könnte die fehlende Fähigkeit differenzierter DC zur Proliferation sein¹⁴⁰.

Interessanterweise zeigten unstimulierte DCs, die mit TPT in therapeutisch relevanten Dosen behandelt wurden, eine höheres T-Zellstimulierungspotential als unbehandelte Kontroll-DCs. Damit übereinstimmend führte die Behandlung von DCs mit dem Antitumor-Agens zu einer Aufregulation der Expression von HLA-DR und der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86. Auf der anderen Seite interferierte TPT mit der phänotypischen und funktionalen Ausreifung von DCs die mit einem Reifungscocktail stimuliert wurden. Die partiell inhibierte Aufregulation der kostimulatorischen Moleküle und darüber hinaus die verminderte Sekretion des Typ1-Markerzytokins IL-12²⁵⁴ im Vergleich zu stimulierten Kontroll-DCs reflektierten eine verringerte Ausreifung der DCs nach Koapplikation von TPT und Reifungscocktail. In Übereinstimmung mit der TPT-abhängigen Inhibition der DC-Aktivierung konnte eine Hypoproliferation kokultivierter allogener CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden.

Infolge der Behandlung mit TPT wiesen unstimulierte DCs eine höhere migratorische Aktivität auf, die der vermehrten Emigration aus der Peripherie zu den drainierenden Lymphknoten dienen und somit die T-Zellaktivierung unterstützen könnte. DCs, die in Gegenwart von TPT stimuliert wurden, zeigten im Gegensatz zu unbehandelten, stimulierten DCs eine verminderte Migrationsfähigkeit und darüber hinaus eine verringerte T-Zellstimulierungs-kapazität. Ebenso konnten Lin et al.²⁵⁵ und Nakashio et al.²⁵⁶ eine Modulation der Zellmigration durch TPT beobachten.

Übereinstimmend mit dem differentiellen Aktivierungsstatus von TPT-behandelten DCs wurde in der vorliegenden Arbeit eine unterschiedliche Expression des Aktinbündelungsprotein Fascin beobachtet. Fascin wird reifungsinduziert von DCs exprimiert und ist ein entscheidender Regulator von DC-Migration und DC/T-Zell-Interaktionen^{226,227,257}. Neben der essentiellen Reorganisation des Zytoskeletts ist die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) für die Zellmigration ebenso von Bedeutung²⁵⁸. MMPs gehören zur Familie der Endopeptidasen, die die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen katalysieren und so extrazelluläre Matrix abbauen können. Dadurch werden Gewebeerneuerungen gefördert und Zellmigration reguliert²⁵⁹. Trotz Unterschiede in der Zellmigration und Expression von Fascin wurde die Expression der MMP-2, -9 und -14 durch eine Behandlung mit TPT nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund des Einflusses von TPT auf den Immunphänotyp und die Funktion der Mo-DCs wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit die für die DC-Entwicklung entscheidenden Signalwege durch die Behandlung mit TPT modifiziert sind. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass bewusst der Fokus auf einen relativ späten Zeitpunkt (zwei Tage nach TPT Behandlung) für die Analysen der Signalwege gelegt wurde, um eine Langzeitbehandlung, wie sie in der Klinik angewendet wird, nachzuempfinden. Es wurde gezeigt, dass TPT die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Tumorzellen induzieren kann²⁶⁰. Angesichts der Bedeutung von NF- κ B-Familienmitgliedern für die Transkription von Genen, die bei der Maturierung von DCs eine Rolle spielen²⁶¹ und ausgehend von dem Befund, dass TPT-behandelte DCs partiell aktiviert sind, wurden die Effekte dieses Antitumor-Agens auf die Expression von NF- κ B analysiert. Es zeigte sich, dass in unstimulierten Mo-DCs die Expression von NF- κ B durch Gabe von TPT nicht verändert wurde. Die Koapplikation von TPT und dem Reifungscocktail führte zu einer Verminderung der reifungsassoziierten Steigerung der Proteinexpression von p65 und RelB. Aktives NF- κ B transloziert in den Nukleus, wo es die Transkription von Zielgenen initiiert²⁶². TPT beeinflusst diese Translokation nicht. Die phänotypischen und funktionalen Veränderungen von TPT-behandelten DCs korrelieren im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-DCs mit dem detektierten partiellen Einfluss von TPT auf die maturierungsbedingte Aufregulation der Expression einiger NF- κ B-Mitglieder. Die nukleäre Translokation und Aktivierung von NF- κ B wird durch eine Familie von inhibitorischen Proteinen, den I κ Bs, kontrolliert²⁶³. Sie interagieren im Zytosol mit NF- κ B-Dimeren und verhindern so deren Translokation in den Nukleus²⁶¹. Tatsächlich zeigten stimulierte Kontroll-DCs ein hohes Proteinniveau des NF- κ B-Antagonisten I κ B α im Vergleich zur Proteinmenge von NF- κ B, während TPT-behandelte, stimulierte DC eine etwas geringere Menge des I κ B α -Protein aufwies. Ähnlich wie diese Beobachtungen zeigte Scott et al., dass eine Überexpression von NF- κ B in lymphoiden

Zellen zu einem erhöhten endogenem I κ B α -Proteinlevel führt²⁶⁴. Der stimulierende Effekt von TPT auf unstimulierte DCs scheint nicht durch NF- κ B vermittelt zu werden.

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass nicht nur NF- κ B, sondern auch die Mitglieder der MAPK-Familie ERK1/2, SAPK/JNK und p38 für die Regulierung und Modulierung der DC-Maturierung und -Funktion relevant sind²⁶⁵⁻²⁶⁹. Unabhängig vom Maturierungsstatus hatte die Behandlung mit TPT keinen Einfluss auf die Expression und Aktivierung von MAPK in Mo-DCs. Eine weitere Signalkaskade, die bei Differenzierung, Überleben und Maturierung von DCs eine positive Rolle spielt, ist der PI3K-AKT-Signalweg^{270,271}. In der vorliegenden Arbeit wurden in unstimulierten DCs nach Behandlung mit TPT keine veränderten Mengen von phosphorylierten AKT detektiert. Im Gegensatz dazu führte die Koapplikation von TPT mit dem Reifungscocktail zu einem geringfügig reduzierten Proteinlevel von phosphoryliertem AKT in stimulierten DCs verglichen mit unbehandelten, stimulierten DCs. Da sich im Ergebnis gezeigt hat, dass eine Langzeitbehandlung von stimulierten Mo-DCs mit TPT einen differentiellen Effekt auf die AKT-Aktivität besitzt, kann angenommen werden, dass die Kinase von TPT reguliert wird. Somit werden die Veränderungen im Phänotyp und Funktion der stimulierten DCs nach Behandlung mit dem Antitumor-Agens möglicherweise von AKT vermittelt.

Durch seine Wirkungsweise beeinflusst TPT die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1⁴⁰. Bei Sauerstoffmangel akkumuliert HIF-1 α im Zytoplasma, dimerisiert mit HIF-1 β und transloziert in den Nukleus, wo es die Transkription von Genen induziert, die in die Regulierung des Zellmetabolismus, der Angiogenese, der Erythropoese, der pH-Homöostase und des Zellüberlebens involviert sind^{4,272}. Da HIF von vielen Tumoren überexprimiert wird, stellt es einen interessanten (immun)therapeutischen Ansatz dar²⁷³. Weiterhin wurde gezeigt, dass HIF einen Beitrag zur DC-Aktivierung leistet^{274,275}. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, inwieweit TPT einen Einfluss auf die HIF-Expression in DCs besitzt. Im Unterschied zu Jantsch et al.²⁷⁵ konnte eine HIF-Expression in DCs nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass die HIF-Aktivität in einer DC-Zelllinie (XS52) mittels eines Luciferase-Reporterassays, der freundlicherweise von Dr. M. Bros durchgeführt wurde, analysiert wurde. Dabei waren die XS52 zuvor mit einem HIF-responsiven Luciferase-Reporter transfiziert worden. Es zeigte sich, dass TPT keinen Einfluss auf die HIF-abhängige Luciferase-Aktivität besaß (Daten nicht gezeigt), was wiederum ein Hinweis sein könnte, dass diese Wirkungsweise von TPT keine entscheidende Rolle bei DCs spielt.

DCs können Immunantworten modulieren. Die Polarisierung der T-Zellen ist durch ein distinktes Muster an Effektorzytokinen gekennzeichnet^{140,276-278}. In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass bei Krebspatienten das Th1/Th2 Verhältnis nicht im Gleichgewicht ist.

Im Vergleich zu gesunden Probanden werden typische Th1-Zytokine wie z.B. IFN- γ von Krebspatienten nur in geringem Maße exprimiert, während Th2-Markerzytokine wie z.B. IL-5 unverändert bleiben oder in größerem Umfang produziert werden^{279–281}. In der vorliegenden Arbeit führte eine Applikation von TPT während der DC-Ausreifung zu einem gesteigerten IL-5/IFN- γ Ratio in DC/T-Zell-Kokulturüberständen verglichen mit Kokulturen, die stimulierte Kontroll-DCs enthielten. IL-12 wird als wichtigster Induktor von Th1-Zellen beschrieben¹⁴⁰. Die Tatsache, dass im Zuge einer Behandlung mit TPT stimulierte DCs weniger IL-12 produzierten, steht im Einklang mit einem erhöhten IL-5 Gehalt in T-Zell-Kokulturen mit TPT-behandelten, stimulierten DCs und dadurch mit einer Verschiebung der T-Zell-Polarisierung in Richtung Th2²⁷⁶. Weiterhin unterstützen die erhöhten Mengen des Th1-supprimierenden Zytokins IL-10 in den DC/T-Zell-Kokulturen mit TPT-behandelten, stimulierten DCs die These der Th2-Polarisierung. Die durch TPT-behandelte, stimulierte DCs induzierte T-Zellhypoproliferation korreliert mit dem Befund, dass vermehrt IL-10 in den DC/T-Zellkokulturen mit TPT-behandelten, stimulierten DCs detektiert wurde. Möglicherweise wurden durch diese DC-Population IL-10 produzierende Tregs induziert^{282–284}.

4.1.2 Der Effekt von GA auf Phänotyp und Funktion von Mo-DCs

HSP90 ist ein ubiquitär exprimierter Chaperon-Komplex, der bei der Faltung, Maturierung und Stabilisierung einer Vielzahl zellulärer Proteine beteiligt ist²⁸⁵. HSP90 beeinflusst die Aktivität von zahlreichen Proteinen, die vor allem in die Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle, Transkription und Viabilität involviert sind²⁸⁶. In der Literatur wird beschrieben, dass HSP90 aufgrund seiner zentralen Rolle bei Zellwachstum und -überleben in Tumorzellen vermehrt exprimiert wird²⁸⁷. Ebenso wurde gezeigt, dass aus malignen Zellen isoliertes HSP90 eine signifikant erhöhte ATPase-Aktivität und ATP-Bindeaffinität aufweist als HSP90 normaler Zellen²⁸⁸. Diese Eigenschaften machen HSP90 zu einem interessanten Ziel in der Tumorthherapie.

GA war das erste benzochinoide Ansamycin-Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus*, das 1970 identifiziert wurde⁵². GA bindet an die N-terminale ATP-bindende Domäne von HSP90 und inhibiert so dessen ATP-abhängige Chaperon-Aktivität²⁸⁹. In Anwesenheit von GA wird die Chaperon-Funktion von HSP90 unterbunden und nicht korrekt gefaltete Proteine werden durch einen Ubiquitin-abhängigen, proteasomalen Mechanismus rapide degradiert²⁹⁰. Aufgrund der Bindung an HSP90 und die damit einhergehende Inhibition von dessen Funktion besitzt GA eine hohe Antitumor-Aktivität⁵⁴.

Entsprechend der zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen zeigte GA in dieser Arbeit ähnliche Effekte auf Mo-DCs. Unabhängig davon, ob DCs unstimuliert blieben, oder gleichzeitig mit dem Reifungscocktail stimuliert wurden, war die DC-Vitalität konzentrationsabhängig durch GA beeinträchtigt. In ihrer Studie zeigten Du et al.²⁹¹, dass GA die Proliferation von HeLa-Zellen hemmt und Apoptose in diesen Zellen induziert, indem es die Transkription und Expression des anti-apoptotisch wirkenden Gens *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) herabsetzt²⁹². Desweiteren ist Bcl-2 auch in die Regulierung der Lebensdauer von DCs involviert²⁹³. Neben Bcl-2 gehört auch AKT, welches ebenso die DC-Lebensspanne kontrolliert, zu den sogenannten *client* Proteinen von HSP90^{270,294–296}. Eine Inhibierung der HSP90-AKT-Bindung führt zur einer Dephosphorylierung und einer damit verbundenen Inaktivierung des Proteins²⁹⁷. Dies könnte den Einfluss von GA auf die Vitalität der DCs erklären. Allerdings konnten Bae und Kollegen²⁹⁸ keine zytotoxische Wirkung des Antitumor-Agens bei 1 µM auf Mo-DCs nachweisen. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde von Bae et al.²⁹⁸ jedoch die Viabilität mittels Trypanblau-Färbung und AnnexinV-PI-Färbung untersucht.

Um nachteilige Effekte auf die Viabilität der DCs zu vermeiden, wurde eine GA-Konzentration von 0,1 µM gewählt, welche zehnfach geringer war als die von Bae und Kollegen²⁹⁸. Dabei korrespondierte die in dieser Arbeit gewählte Konzentration des HSP90-Inhibitors mit den Serumkonzentrationen von Patienten, die im Verlauf einer Tumorthherapie mit GA-abgeleiteten/verwandten HSP90-Inhibitoren behandelt wurden^{66,299}.

Im unstimulierten Zustand zeigten GA-behandelte DCs deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expression ihrer Oberflächenmoleküle gegenüber Kontroll-DCs. Während die Oberflächenexpression von CD80 nach Applikation des Agens herunter reguliert wurde, erhöhte sich die Expression von HLA-DR, CD83 und CD86 auf GA-behandelten, unstimulierten DCs im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-DCs signifikant. Im Gegensatz dazu beobachteten Bae et al.²⁹⁸ eine deutliche Verminderung der Oberflächenexpression von HLA-Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle nach Behandlung von unstimulierten Mo-DCs mit GA.

Unstimulierte DCs sind darauf spezialisiert, Antigene aus ihrer Umgebung über verschiedene Mechanismen aufzunehmen und diese Fähigkeit im Zuge einer Ausreifung zu verlieren³⁰⁰. Sowohl in dieser Arbeit, als auch in der Arbeit von Bae et al.²⁹⁸ wurde gezeigt, dass die Behandlung mit GA zu einer Verminderung der Endozytose-Kapazität führte. Dieser Befund unterstützt die These, dass unstimulierte DCs nach Gabe von GA partiell aktiviert werden. Während Bae und Kollegen²⁹⁸ ein vermindertes T-Zellstimulierungspotential für unstimulierte DCs nach Behandlung beobachteten, wurde in dieser Arbeit die Fähigkeit der unstimulierten DCs, eine T-Zellproliferation zu induzieren, nach GA-Behandlung erhöht. Die erhöhte Expression der DC-Aktivierungsmarker und das gesteigerte T-Zellstimulierungspotential von

unstimulierten DCs nach Behandlung mit GA deuten auf deren partielle Aktivierung hin, was im Einklang mit der verminderten Endozytose-Kapazität steht. Die auftretende Diskrepanz zwischen den beiden Arbeiten liegt möglicherweise in den verschiedenen verwendeten GA-Konzentrationen begründet. Die GA-Konzentration von Bae und Kollegen²⁹⁸ war zehnfach höher als die Konzentration, die in dieser Arbeit verwendet wurde. Obwohl sich GA-behandelte und unbehandelte DCs im unstimulierten Zustand hinsichtlich ihrer Oberflächenmarkerexpression und T-Zellaktivierungspotential unterscheiden, wurde infolge der GA-Behandlung die Migrationsaktivität sowie die Expression von Fascin nicht beeinflusst. Diese Beobachtungen sowie die GA-abhängige Inhibition der CD80-Expression führen zu der Vermutung, dass die Inhibition von HSP90 in unstimulierten DCs vielmehr ein Ergebnis einer genspezifischen Veränderung als einer globalen Änderung des Aktivierungsstatus ist.

In weiteren Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass GA mit der phänotypischen und funktionalen Ausreifung von mit Reifungscocktail stimulierten DCs interferiert. Eine Koapplikation von GA und Reifungscocktail führt zu einer Inhibition der reifungsinduzierten Aufregulation der DC-Aktivierungsmarker. Die maturierungsbedingte Aufregulation von HLA-DR wird durch eine GA-Koapplikation kaum beeinflusst. Ebenso wurde durch Bae et al.²⁹⁸ eine reduzierte Oberflächenexpression der genannten Moleküle beobachtet. Aktivierte DCs sind durch eine ausgeprägte migratorische Aktivität gekennzeichnet^{301,302}, die eine Aufregulation von einer Vielzahl von Komponenten des Zytoskeletts, inklusive des Aktinbündelungsprotein Fascin benötigt^{226,227}. In Übereinstimmung mit der verminderten Aufregulation des Zytoskelettproteins Fascin, welches an der Ausbildung der Dendriten²²⁶ und Migration²⁵⁷ beteiligt ist, wiesen GA-behandelte DCs im Zuge der Stimulierung gegenüber Kontroll-DCs eine reduzierte Migrationskapazität auf. Taiyab und Roa³⁰³ zeigten in ihrer Studie, dass eine Inhibition von HSP90 eine Abnahme der Migration humaner Brustkrebszellen sowie von Fibroblasten zur Folge hat. Hierbei wurde eine Abnahme der Interaktionen zwischen Aktin-Monomeren beobachtet, was zu einer Verringerung der Aktin-Polymerisierung führt. Zusätzlich konnten Taiyab et al.³⁰³ zeigen, dass infolge der Hemmung von HSP90 durch ein GA-Derivat die Expression von *Ras homolog gene family member A* (RhoA) herabgesetzt wurde. Verschiedene Studien zeigen, dass RhoA an der Formation von Dendriten und der DC-Migration beteiligt ist³⁰⁴⁻³⁰⁶. Eine GA-induzierte Inhibition von RhoA könnte zur reduzierten Migrationsaktivität GA-behandelter, stimulierter DCs beitragen.

In Übereinstimmung mit der GA-abhängig partiell inhibierten Aufregulation kostimulatorischer Moleküle und einer partiell inhibierten Produktion proinflammatorischer Zytokine zeigten entsprechend behandelte Mo-DCs eine geringere T-Zellstimulierungskapazität und DC/T-Zell-Kokulturen geringere Mengen der Th1- bzw. Th2-Effektorzytokine INF- γ und IL- 5 als die korrespondierenden Kontrollansätze.

Auch Bae et al.²⁹⁸ konnten in ihrer Arbeit eine signifikante INF- γ -Produktion allogener T-Zellen beobachten. Somit scheint eine Inhibition von HSP90 in DCs keinen direkten Einfluss auf die Th1/Th2-Zellpolarisierung zu haben.

Im Zuge einer Stimulierung von Mo-DCs werden eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert, dabei sind einige Schlüsselmoleküle als HSP90 Klienten beschrieben wurden³⁰⁷. Die erhöhte Expression der DC-Aktivierungsmarker und die gesteigerte T-Zellstimulierungskapazität von unstimulierten DCs nach Gabe von GA deuten auf eine Modifikation von DC-relevanten Signalwegen hin. Angesichts der essentiellen Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B für die DC-Maturierung²⁶¹ und des Befundes von Hsu und Kollegen, dass eine LPS induzierte NF- κ B-Aktivierung in Makrophagen durch GA inhibiert wurde³⁰⁸, wurden zunächst Mitglieder der NF- κ B-Familie untersucht. Hierbei wurden weder die Expressionshöhe des endogenen NF- κ B-Inhibitor I κ B α ³⁰⁹ noch die Proteinmenge bzw. Aktivierungsstatus des ubiquitär exprimierten NF- κ B-Familienmitglieds p65³¹⁰ in unstimulierten Mo-DCs nach GA-Behandlung verändert gefunden. Allerdings hatte eine Behandlung von unstimulierten Mo-DCs mit dem Antitumor-Agens eine verminderte RelB-Expression zur Folge. Während RelB in unstimulierten DCs eher eine untergeordnete Rolle spielt^{311,312}, ist das Protein für die reifungsinduzierte Aufregulation der Expression der DC-Aktivierungsmarker und folglich auch deren T-Zellstimulierungskapazität essentiell³¹³. Dementsprechend könnte die verminderte Expression von RelB in stimulierten DCs nach Gabe von GA eine Erklärung für die GA-induzierten Veränderungen des Phänotyps und Funktion der DCs sein. Für verschiedene Zelltypen wurde gezeigt, dass eine Inhibition von HSP90 durch GA die NF- κ B-Aktivität aufgrund der reduzierten Expressionsmengen der NF- κ B-Signalregulatoren I κ B-Kinase (IKK)³¹⁴, *NF- κ B-inducing kinase* (NIK)³¹⁵ und *receptor-interacting protein 1* (RIP1)³¹⁶ vermindert. Eine reduzierte Expression und eine damit einhergehende limitierte Aktivität dieser Regulatoren könnten die Ursache der verminderten RelB-Expression in stimulierten Mo-DCs sein³¹⁷.

Eine weiterer Signalweg, der in die Differenzierung und Maturierung von DCs involviert ist, ist der PI3K-AKT-Signalweg^{270,271}. Der negative Einfluss einer HSP90-Inhibition auf die AKT-Expression wurde für verschiedene Zelltypen beschrieben^{318,316}. In der vorliegenden Arbeit wurde die AKT-Expression weder in unstimulierten noch in stimulierten DCs durch eine Behandlung mit GA modifiziert. Somit scheint ein anderer molekularer Mechanismus für die partielle Aktivierung unstimulierter DCs verantwortlich zu sein.

4.1.3 Zusammenfassung der Effekte von Chemotherapeutika

In der Gesamtheit betrachtet wurde in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss des Antitumor-Agens TPT und des HSP90-Inhibitors GA auf die Aktivierung und Funktion von Mo-DCs demonstriert. Von besonderer Bedeutung hierbei ist, dass beide Antitumor-Agenzien in Abhängigkeit des Reifungsstatus der DCs auf unterschiedliche Art und Weise deren Phänotyp und Funktionen beeinflussen. Eine Behandlung von unstimulierten DCs mit einer niedrigen GA-Konzentration förderte eine funktionelle Aktivierung der DCs durch einen bis dato unbekanntem Mechanismus. GA scheint indirekt oder auch direkt, die Reifung und Expression eines DC-aktivitätsinhibierenden Moleküls zu reduzieren. Dieser Befund kann durch Einsatz von hohen GA-Konzentrationen wieder aufgehoben werden²⁹⁸. Ein Grund hierfür könnte eine mögliche Inhibierung anti-apoptotischer Signale bzw. DCs positiv regulierender Moleküle sein. Eine Behandlung unstimulierter DCs mit TPT resultierte ebenfalls in einer partiellen Aktivierung, die möglicherweise durch eine vermehrte Expression von AKT gesteuert wird.

Demgegenüber resultierte eine Koapplikation von GA bzw. TPT und dem Reifungscocktail in einer Herabsetzung der DC-Aktivierung, die sich in einer verminderten Aufregulation der Oberflächenexpression der DC-Aktivierungsmarker, einer geringeren Migrationsfähigkeit und in einer geringeren T-Zellstimulierungskapazität widerspiegelte. Dabei scheinen die immunmodulatorischen Effekte von TPT auf Mo-DCs keine direkte Konsequenz der Inhibition von Top1 zu sein, da Irinotecan, welches ein anderes Camptothecin-Analogon ist und auch als Chemotherapeutikum eingesetzt wird, die Viabilität von IGROV1 und Mo-DCs ebenfalls konzentrationsabhängig beeinflusste, allerdings keine großen Veränderungen des DC-Immunphänotypen hervorgerufen hat (Daten nicht gezeigt).

Um die beobachteten Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten DCs nach Applikation von GA bzw. TPT erklären zu können, sollte in weiterführenden Studien detaillierter untersucht werden, welche Signalwege in den DCs durch die Behandlung mit GA bzw. TPT jeweils moduliert werden. Interessant wäre es bspw., den Einfluss von GA auf den MAPK-Signalweg zu analysieren, der bereits in verschiedenen Studien für andere Zelltypen demonstriert wurde^{319,320}.

Zusätzlich wäre es von großem Vorteil, wenn die immunmodulatorische Kapazität beider Antitumor-Agenzien mit primären DCs aus Patienten, die eine Therapie mit TPT bzw. mit einem GA-Derivat bekommen, validiert werden könnte. Darüber hinaus wäre es interessant, die potentiellen Effekte von GA bzw. TPT auf die T-Zellen dieser Patienten zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit GA bzw. TPT auf ruhende T-Zellen keinen Einfluss hatte, allerdings zeigten aktivierte T-Zellen eine reduzierte Proliferation nach Gabe des jeweiligen Agens. Gegenwärtig sind solche Analysen schwierig durchführbar, da TPT oftmals als *second line* Chemotherapeutikum oder als

Kombinationspräparat mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt wird und somit TPT-spezifische Effekte auf das Immunsystem der Patienten schwer nachzuweisen sind. Desweiteren findet GA in der Tumorthherapie aufgrund seiner hepatischen Toxizität und weiterer Limitierungen keine Anwendung⁵⁴. Für weitere Untersuchungen ist es deshalb empfehlenswert auf nicht toxische GA-Derivate, die bereits in klinischen Phase II-Studien^{66,299} eingesetzt werden, auszuweichen. Aufgrund des großen Interesses an TPT wird aktuell die Effizienz dieses Antitumor-Agens als *first line* Chemotherapeutikum in klinischen Phase I-Studien getestet, wodurch sich möglicherweise zukünftig ein Zugang zu DCs solcher Patienten ergibt^{62,321}.

Für die Zukunft eine weitere interessante, translationale Perspektive wäre die Nutzung von Nanopartikeln, um GA und TPT selektiv in den Tumorbereich einzubringen³²². Hierdurch könnte erstens der Tumor direkt abgetötet werden und zweitens möglicherweise tumorresidierende, unreife DCs aktiviert werden, die nach Tumorantigenaufnahme auswandern und tumorspezifische CTLs aktivieren. Hierfür geeignete Nanopartikel wurden bereits von verschiedenen Laborgruppen entwickelt³²³⁻³²⁶.

4.2 Die Auswirkungen eines partiellen Verlust von VHL in BM-DCs

Die VHL-Erkrankung ist eine autosomal dominant vererbare Tumorerkrankung, die durch eine phänotypische Variabilität und altersabhängige Penetranz gekennzeichnet ist²³³. Betroffen sind in etwa eine von 35.000 Personen, dabei tritt die Erkrankung oft innerhalb des 10. und 40. Lebensjahrs auf¹¹⁰. Viele verschiedene Regionen bzw. Organe des Körpers können von der VHL-Erkrankung betroffen sein. Die häufigsten Tumore sind Hämangioblastome der Retina und des ZNS, klarzellige Nierenzellkarzinome, Phäochromozytome, Pankreastumore und endolymphatische Sacktumore. Desweiteren können Nieren- und Pankreaszysten und Zysten-Adenome der Nebenhoden bzw. des *Ligamentum latum uteri* bei VHL-Patienten auftreten¹³³.

Die prominenteste Funktion des VHL-Proteins ist wohl die Bindung und Regulation von HIF. Der Transkriptionsfaktor HIF besteht aus den Untereinheiten HIF- α und HIF-1 β . Während HIF-1 β im Zellkern lokalisiert und konstitutiv exprimiert wird, befindet sich HIF- α im Zytosol und unterliegt einer strengen Regulation: Unter Normoxie-Bedingungen wird HIF- α durch spezifische PHDs an den Prolinresten 402 und 564 innerhalb der ODDD hydroxyliert. Diese Reaktion benötigt neben Sauerstoff, α -Ketoglutarat und Ascorbinsäure auch Fe^{2+} ³²⁷. Die Hydroxylierung von HIF- α ermöglicht die Bindung von pVHL an die ODDD von HIF- α . pVHL gehört zu einem E3 Ubiquitin-Ligase-Komplex, bestehend aus Elongin B, Elongin C, Cul-2 und Rbx 1, der die Polyubiquitinierung und somit die proteasomale Degradation von HIF- α herbeiführt¹⁸. Unter hypoxischen Bedingungen wird die PHD-Aktivität inhibiert. Aufgrund der fehlenden Hydroxylierung kann pVHL nicht binden, es kommt zu einer Stabilisierung von HIF- α . Daraufhin kann es in den Kern translozieren, mit HIF-1 β dimerisieren und als Heterodimer an die HRE in den Promotorregionen der Zielgene binden⁴.

In den letzten Jahren wurde für pVHL auch eine Vielzahl an HIF-unabhängigen Funktionen beschrieben. Die Effizienz von Chemotherapien ist eng an die p53-vermittelte Apoptose gekoppelt³²⁸. Es hat den Anschein, dass sowohl HIF als auch pVHL in der Lage sind, die Funktion von p53 zu beeinflussen. Einige Studien haben gezeigt, dass HIF direkt p53 bindet, dessen Aktivität moduliert und unter hypoxischen Bedingungen in einer Abnahme der p53-abhängigen Apoptose resultiert. Dagegen ist pVHL imstande, die Funktion von p53 in einer HIF-unabhängigen Weise zu regulieren, in dem die E3 Ubiquitin-Ligase Mdm-2-vermittelte Ubiquitinierung von p53 sowie dessen Export aus dem Nukleus supprimiert wird, was letztendlich zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivität von p53 führt³²⁹⁻³³¹. Zusätzlich zeigten pVHL-defiziente Zellen eine verstärkte NF- κ B-Aktivität, die teilweise auf dem konstitutiven Signaling von HIF basiert³³². Die NF- κ B-Aktivität kann auch auf andere Weise durch pVHL moduliert werden. Hierbei bindet pVHL an die CK2 und dadurch wird die inhibitorische Phosphorylierung des NF- κ B-Agonisten CARD9 gefördert⁹⁷.

Der Verlust von pVHL, resultierend in der Aktivierung von NF- κ B und Inaktivierung von p53 hat möglicherweise die Ausbildung eines Tumor-Phänotyps zu Folge, der gegenüber Chemotherapie resistent ist³³³. Weiterhin wurde gezeigt, dass pVHL mit Mikrotubuli assoziieren kann und so deren Stabilität reguliert. Die Regulation scheint dabei indirekt ein Resultat der Phosphorylierung von pVHL durch GSK3 zu sein³³⁴. Calzada und Kollegen demonstrierten in ihrer Arbeit, dass in VHL-defizienten Zellen die Zellpolarität, sowie die Ausbildung von Zellkontakten (Gap Junctions, Tight Junctions) defekt sind. Aufgrund der Bindung an Fibronectin bzw. Kollagen IV besitzt pVHL die Fähigkeit, die Formation der extrazellulären Matrix und somit auch Zell-Zell-Adhäsionen zu modifizieren³³⁵.

In dieser Arbeit wurde, soweit mir bekannt, zum ersten Mal beschrieben, welche Auswirkungen ein heterozygoter Verlust von VHL für den Phänotyp und für Funktionen von DCs hat. Hierfür wurden zwei verschiedene VHL ko Mäuse generiert. Die für die Erzeugung des jeweiligen VHL ko verwendeten Mäuse, wurden freundlicherweise von Dr. D. Reutzel und Dr. E. Lausch, Kinderklinik Mainz zur Verfügung gestellt. Während VHL1^{wt/ko}-Mäuse eine heterozygote Deletion von Exon 1 aufweisen, sind VHL2^{wt/ko}-Mäuse durch eine heterozygote Deletion von Exon 2 charakterisiert. Da Mäuse mit einem homozygoten VHL-Verlust bereits im Embryonalstadium aufgrund vaskulärer Anomalien der Plazenta sterben¹¹², wurde in der vorliegenden Arbeit von VHL nur ein Allel deletiert. Die heterozygote Deletion des VHL-Gens imitiert besser die genotypischen Eigenschaften eines Patienten mit VHL-Syndrom, das durch eine inaktivierende Keimbahnmutation im VHL-Gen gekennzeichnet ist, als eine homozygote VHL-Deletion³³⁶.

Während die Migrationsaktivität durch den heterozygoten Verlust von Exon 1 bzw. Exon 2 des VHL-Gens in vitro nicht beeinflusst wird, zeigte sich interessanterweise in vivo ein Unterschied in der Migration von VHL2^{wt/ko}-DCs im Vergleich zu Kontroll-DCs. In vivo migrieren DCs mit einer heterozygoten Deletion von Exon 2 des VHL Gens schlechter als Kontroll-DCs. In Übereinstimmung mit diesem Befund wurde in Transwell-Experimenten von Qu und Kollegen³³⁷ ebenfalls eine verringerte Migration von Mo-DCs, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, im Vergleich zu Kontroll-DCs beobachtet³³⁷. Im Gegensatz dazu beschrieben Köhler und Kollegen³³⁸ eine HIF-abhängige Steigerung der Migration durch Hypoxie. Die Ursachen für die auftretenden Diskrepanzen zwischen den beiden Arbeiten^{337,338} können möglicherweise durch die Verwendung von DCs unterschiedlicher Spezies und durch die Unterschiede in der Durchführung des Migrationsexperiments erklärt werden.

Ein charakteristisches Merkmal immaturer DCs ist ihre hohe phagozytotische Aktivität²²⁹. Abgesehen von immaturren DCs besitzen auch Neutrophile die Fähigkeit zur Phagozytose^{339,340}. Walmsley und Kollegen¹⁹⁵ zeigten in ihrer Studie, dass Neutrophile aus Patienten mit einer heterozygoten Keimbahn-Mutation im VHL-Gen eine höhere

Phagozytosekapazität als Neutrophile gesunder Probanden aufwiesen. Dieser Effekt war bei Durchführung der Experimente unter Hypoxie noch weiter gesteigert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein distinkter Effekt einer heterozygoten Deletion des Exon 2 des *VHL*-Gens auf die Phagozytoseaktivität nachgewiesen werden. Unterdessen wurde gezeigt, dass hypoxische Bedingungen während der letzten 24 h der DC-Kultur zu einer Herabsetzung der Phagozytosekapazität von BM-DCs führen²⁷⁵.

Weder der Verlust von Exon 1, noch von Exon 2 des *VHL*-Gens auf einem Chromosom hatte eine Auswirkung auf die Oberflächenexpression von MHCII und der kostimulatorischen Moleküle immaturer BM-DCs. Auch die stimulierungsassoziierte erhöhte Expression dieser Oberflächenmarker zeigte keine Unterschiede zwischen Kontroll-DCs und *VHL1^{wt/ko}*-DCs, was wiederum durch das unveränderte T-Zellaktivierungspotential unstimulierter und stimulierter *VHL1^{wt/ko}*-DCs gegenüber Kontroll-DCs reflektiert wird. Dagegen zeigten BM-DCs aus *VHL2^{wt/ko}*-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen eine verminderte Aufregulation der Oberflächenmarker CD86 und MHCII infolge LPS-Stimulierung. Jantsch et al.²⁷⁵ zeigten in ihrer Arbeit, dass Hypoxie in immaturren BM-DCs zu keiner Veränderung der Oberflächenmarkerexpression von CD80, CD86 und MHCII führt. Demgegenüber zeigten LPS-stimulierte, Hypoxie-exponierte BM-DCs eine Aufregulation der DC-Aktivierungsmarker im Vergleich zu maturaen Kontroll-DCs. Diesen synergistischen Effekt von LPS und Hypoxie konnten Jantsch und Kollegen²⁷⁵ auch im Hinblick auf das T-Zellstimulierungspotential von BM-DCs beobachten. Im Gegensatz dazu wurde von Köhler et al.³³⁸ eine gesteigerte Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle und von MHCII durch unstimulierte BM-DCs nach Hypoxie-Exposition demonstriert, während eine Ausreifung mit LPS unter hypoxischen Bedingungen zu keiner gesteigerten Expression der DC-Aktivierungsmarker führte³³⁸. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Köhler konnten Qu et al.³³⁷ ebenfalls keinen Unterschied in der Oberflächenexpression von CD80, CD83 und CD86 humaner Mo-DCs nach Kultivierung unter Hypoxie versus Normoxie beobachten³³⁷. Die Diskrepanz zwischen den Arbeiten könnte möglicherweise auf die unterschiedlichen Expositionszeiten zurückzuführen sein. Jantsch et al.²⁷⁵ setzten in ihrer Studie BM-DCs erst während der Maturierungsphase für 24 h einer reduzierten Sauerstoffkonzentration aus, im Gegensatz zu Köhler et al.³³⁸ und Qu et al.³³⁷, die die gesamte DC-Kultivierung unter Hypoxie durchführten. Während die unveränderte Oberflächenexpression der DC-Aktivierungsmarker immaturer *VHL2^{wt/ko}*-DCs gegenüber Kontroll-DCs mit einem unveränderten allogenen T-Zellaktivierungspotential korrespondiert, scheint die partiell inhibierte Aufregulation von MHCII und CD86 maturaer *VHL2^{wt/ko}*-DCs im Vergleich zu Kontroll-DCs nicht im Einklang mit dem unveränderten allogenen T-Zellaktivierungspotential zu stehen. Möglicherweise wirken hier andere kostimulatorische Moleküle wie z.B. OX40L³⁴¹ oder 4-1BBL³⁴² kompensierend. Während die allogene T-Zellaktivierungskapazität heterozygoter *VHL2^{wt/ko}*-DCs im Vergleich

zu Kontroll-DCs unverändert blieb, zeigten mature VHL2^{wt/ko}-DCs ein signifikant vermindertes antigenspezifisches T-Zellstimulierungspotential für OT-II T-Zellen verglichen mit maturaen Kontroll-DCs. Eine Erklärung für diesen Befund ist möglicherweise die verminderte Aufregulation der MHC-II-Expression, da OT-II T-Zellen OVA-Peptid im Kontext von MHCII spezifisch erkennen¹⁹⁹. Im Gegensatz dazu war die Proliferation von OT-I T-Zellen nach Stimulation mit VHL2^{wt/ko}-DCs im Vergleich mit Kontroll-DCs nahezu unverändert.

Basierend auf der Tatsache, dass DCs die Fähigkeit besitzen, T-Zellen zu polarisieren, gehören sie zu den wichtigsten Immunmodulatoren. Wie schon zuvor erwähnt, konnte bei Krebspatienten beobachtet werden, dass sie im Vergleich mit gesunden Probanden weniger Th1-Zytokine wie z.B. IFN- γ aufweisen, während Th2-Zytokine unverändert oder vermehrt exprimiert wurden^{280,281}. Übereinstimmend mit diesen Studien wurde in den DC/T-Zell-Kokulturüberständen mit VHL2^{wt/ko}-DCs eine höhere Konzentration des Th2-Markerzytokins IL-5 im Vergleich zu DC/T-Zell-Kokulturüberständen mit Kontroll-DCs detektiert. Der Gehalt an IFN- γ blieb jedoch unverändert. Neben Th1 und Th2 können CD4⁺ T-Zellen auch zu Th-17-Zellen differenzieren, die durch eine hohe IL-17 Produktion gekennzeichnet sind³⁴³. Th-17-Zellen spielen eine wichtige proinflammatorische Rolle bei verschiedenen Infektionen, Tumoren und Autoimmunerkrankungen³⁴⁴. In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Einfluss von VHL auf die IL-17- bzw. IL-10-Konzentration in den DC/T-Zell-Kokulturüberständen beobachtet werden.

Die Aktivierung und Induktion der Gentranskription von HIF erfolgt durch Hypoxie. HIF kann aber auch unter normoxischen Bedingung aktiviert werden, bspw. durch TGF- β , LPS, und Wachstumsfaktoren sowie durch eine Deletion von VHL^{4,345-347}. Einige Studien haben gezeigt, dass eine Aktivierung von HIF-1 α mit der Entstehung von allergischen Atemwegsentzündungen korreliert³⁴⁸⁻³⁵¹. Desweiteren demonstrierten Lee und Kollegen³⁵¹, dass nach einer Allergen-Provokation die HIF-1 α -Expression im Lungengewebe sowie in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit Asthma erhöht waren. Kim et al.³⁵⁰ und Crotty Alexander et al.³⁵², haben gezeigt, dass eine Inhibierung von HIF-1 α zu einer verminderten antigeninduzierten Atemwegsinfammation und -hyperreaktion führt. Im Gegensatz dazu resultierte in der vorliegenden Arbeit eine heterozygote Deletion von Exon 2 des *VHL*-Gens ebenfalls in einer Verminderung des erhöhten Atemwegswiderstandes bei Mäusen, die mit OVA sensibilisiert und provoziert wurden. Eine allergische Atemwegsentzündung ist oftmals mit einem massiven Einwandern von inflammatorischen Zellen in die Lunge assoziiert^{353,354}. Neben Eosinophilen können auch Neutrophile, DCs, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten im Lungengewebe bzw. in der BAL gefunden werden³⁵². Um den verminderten Atemwegswiderstand der VHL2^{wt/ko}-Mäuse erklären zu können, sollte als nächster Schritt die Zellzusammensetzung der BAL untersucht werden. Hier ergibt sich auch möglicherweise ein Hinweis, um die bestehenden Diskrepanzen

zwischen der vorliegenden Arbeit und den Arbeiten von Kim et al.³⁵⁰ und Crotty Alexander et al.³⁵² zu verstehen. Während der Sensibilisierung wird das Allergen von DCs aufgenommen, prozessiert und naiven Th-Zellen präsentiert, was zu einer Aktivierung von allergen-spezifischen Effektorzellen führt³⁵³. Infolge eines zweiten Kontakts (Provokation) mit dem Allergen kommt es zur Auslösung einer Th2-vermittelten Immunantwort^{353,355}. Interessanterweise zeigten VHL2^{wt/ko}-DCs ein vermindertes OVA-spezifisches T-Zellstimulierungspotential für OT-II Zellen im Vergleich zu Kontroll-DCs. Die verringerte Fähigkeit der VHL2^{wt/ko}-DCs antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren, ist möglicherweise die Ursache für den beobachteten verminderten Atemwegswiderstand der VHL2^{wt/ko}-Mäuse im OVA-Asthma-Modell. Desweiteren könnte dabei auch die verminderte Migration der VHL2^{wt/ko}-DCs eine Rolle spielen. Da jedoch nicht nur DCs von der partiellen Deletion des Exon 2 des VHL-Gens betroffen sind sondern auch weitere Zellen, die im allergischen Asthma eine Rolle spielen, muss diese Hypothese durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Zusammenfassend scheint ein partieller Verlust von VHL kaum eine Rolle in der Ausprägung des Phänotyps und der Funktion von BM-DCs zu spielen. Vielmehr zeigt sich die Auswirkung der heterozygoten Deletion von VHL bei in vivo-Experimenten. Besonders hervorzuheben ist hierbei die verminderte Atemwegshyperreaktion von VHL2^{wt/ko} Mäusen nach Immunisierung und Provokation mit dem Modellallergen OVA im Vergleich zu Kontrollmäusen.

Zwischen der heterozygoten Deletion von Exon 1 bzw. Exon 2 scheint sich kein Unterschied in ihrer Auswirkung auf den Phänotyp und die Funktion von BM-DCs herauszukristallisieren. Einzig im Expressionsniveau von MHCII und CD86 konnte ein Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen beobachtet werden. Um jedoch eine genaue Aussage treffen zu können, wären weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der beiden Mausstämme sinnvoll. Desweiteren müsste geklärt werden, inwieweit die HIF-Expression durch die heterozygote Deletion von VHL beeinflusst wird. Denn während die Deletion von Exon 1 zu einem Verlust des Proteins führt, da eine der loxP-Stellen im Promotorbereich liegt, könnte bei der Deletion von Exon 2 ein funktionelles Protein entstehen. Somit könnte eine heterozygote Deletion von Exon 1 zu einer reduzierten Proteinmenge von VHL führen, die mit einer vermehrten HIF-Akkumulation einhergehen könnte. Das bei Deletion von Exon 2 entstehende VHL-Protein könnte eine Stabilisierung von HIF-1 α unterbinden.

Aufgrund des kaum veränderten Phänotyps der VHL ko-DCs wäre es interessant zu untersuchen, ob und wie kompensatorische Mechanismen dabei eine Rolle spielen. Außerdem wäre es interessant, welche Auswirkungen die heterozygote Deletion von VHL auf den Phänotyp von T-Zellen hat. Desweiteren könnte in zusätzlichen Studien untersucht werden, inwieweit sich die Funktion der BM-DCs aus VHL ko Mäusen im Vergleich zu

Kontrollmäusen unter Hypoxie verändert, da HIF eine entscheidende Rolle bei Sauerstoffmangel spielt.

Für weitere in vivo-Experimente ist es empfehlenswert, die beiden Mausstämme auf einen einheitlichen genetischen Hintergrund zurück zu kreuzen, um stammspezifische Unterschiede ausschließen zu können.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) gibt dem Organismus die Möglichkeit, sich auf zellulärer Ebene an unterschiedliche Sauerstoffverhältnisse anzupassen. Vor allem Tumorzellen weisen aufgrund ihres unregulierten Wachstums und der daraus resultierenden unzureichenden Durchblutung (hypoxisches Milieu) eine erhöhte HIF-Expression auf. Die erhöhte HIF-Expression stellt somit ein interessantes Ziel in der Tumorthherapie dar. Dendritische Zellen (DCs) besitzen eine bedeutende Rolle in der Generierung und Modulierung von Antitumor-Immunantworten. Aus diesem Grund ist es überaus wichtig zu wissen, welche Effekte Antitumor-Agenzien, im Besonderen HIF-Inhibitoren, auf DCs und somit auch auf die Generierung von adäquaten Immunantworten besitzen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde aus diesem Grund der Einfluss der Antitumor-Agenzien Geldanamycin (GA) und Topotecan (TPT) auf den Phänotyp und die Funktion von DCs untersucht. Hierfür wurden Monozyten aus humanen, mononukleären, peripheren Blutzellen isoliert und unter DC-differenzierenden Konditionen kultiviert. Diese immaturen monozytenabgeleiteten DCs (Mo-DCs) wurden mithilfe eines Reifungscocktails ausgereift. Die Applikation der Antitumor-Agenzien erfolgte während der Differenzierungs- bzw. Ausreifungsphase. Abhängig vom Reifungsgrad der Mo-DCs konnte ein differentieller Einfluss von GA bzw. TPT auf die DC-Aktivierung beobachtet werden. Eine Behandlung von unstimulierten Mo-DCs mit GA resultierte in einer partiellen DC-Aktivierung basierend auf einem noch unbekanntem Mechanismus. Ebenso führte eine Behandlung von unstimulierten Mo-DCs mit TPT zu einer funktionellen Aktivierung der DCs, die mit einer vermehrten AKT-Expression korrelierte. Die jeweilige Koapplikation der Antitumor-Agenzien mit dem DC-Reifungscocktail führte zu einer reduzierten DC-Aktivierung, die sich in einer verminderten NF- κ B-Aktivierung, einer verringerten Oberflächenexpression der getesteten kostimulatorischen Moleküle, einer verringerten Migrationsfähigkeit und einem reduzierten T-Zellstimulierungspotential widerspiegelte.

Die autosomal dominant vererbte Tumorerkrankung von Hippel-Lindau (VHL) wird häufig durch genetische Mutationen des als HIF-Negativregulator fungierenden *VHL*-Gens hervorgerufen. Patienten, die an dem VHL-Syndrom erkrankt sind, weisen oft benigne oder maligne Tumore und Zysten in den verschiedensten Organsystemen auf. Wie schon zuvor erwähnt, besitzen DCs eine essentielle Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung von Antitumor-Immunantworten. Deshalb wurde im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit ein partieller Verlust von VHL Auswirkungen auf die Ausprägung des Phänotyps und der Funktion von DCs hat. Mittels Cre/lox-Technologie wurden transgene Mäuse mit einem heterozygoten Verlust von Exon 1 bzw. Exon 2 des *VHL*-Gens generiert.

Aus diesen Mäusen wurden Knochenmarkszellen isoliert und unter DC-differenzierenden Konditionen kultiviert. Die immaturen knochenmarkabgeleiteten DCs (BM-DCs) wurden mit LPS ausgereift. Weder der heterozygote Verlust von Exon 1 noch von Exon 2 des *VHL*-Gens bewirkte eine Veränderung der Oberflächenmarkerexpression, der in vitro-Migrations- und Endozytosekapazität, sowie der allogenen T-Zellstimulierungskapazität. Allerdings zeigten Mäuse mit einem partiellen Verlust von Exon 2 im Vergleich zu Kontrollmäusen nach Immunisierung und Provokation mit dem Modellallergen OVA eine verminderte Atemwegshyperreaktion, die möglicherweise auf die beobachtete Abnahme der Migrationsfähigkeit in vivo und die verminderte OVA-spezifische T-Zellstimulierungskapazität der DCs zurückzuführen ist.

6 Abstract

The transcription factor hypoxia-induced factor (HIF) is essential for organisms to adapt to different oxygen tensions on cellular level. In particular, cells of solid tumors exhibit an increased expression of HIF due to limited oxygen concentrations in tumor-microenvironments. Thus, increased HIF expression is an interesting therapeutic target for antitumor-therapy. Dendritic cells (DCs) play a fundamental role in the initiation and shaping of antitumor responses. Based on that, it is important to know which effects antitumor-agents, particular HIF inhibitors, may have on DCs and the generation of an adequate immune response.

The first part of this study focussed on the investigation of the impact of the antitumor-agents geldanamycin (GA) and topotecan (TPT) on the phenotype and function of DCs. Therefore, monocytes were isolated from human peripheral blood mononuclear cells and cultivated under DC-differentiating conditions. These immature Mo-DCs were matured by addition of a maturation cocktail. During the differentiation or the maturation phase the antitumor-agents were applied to the cells. It became apparent that both GA and TPT had a differential impact on DC activation, dependent of the maturation state of the Mo-DCs. Unstimulated DCs exhibit a more mature phenotype after treatment with GA based on an unknown mechanism. The treatment of unstimulated DCs with TPT resulted also in a more active state of the DCs, probably due to the increased expression of AKT after exposure to TPT. Coapplication of the maturation cocktail and either antitumor-agent resulted in an impairment of DC-activation, based on lowered NF- κ B activation, decreased surface expression of the costimulatory molecules tested, decreased migratory capacity, and attenuated T-cell-stimulatory capacity.

Von Hippel-Lindau (VHL) disease, inherited in an autosomal dominant manner, evolves due to germline mutations of the *VHL* gene, the product of which functions as a negative regulator of HIF. Patients suffering from the VHL syndrome display benign or malignant tumors and cysts in many organ systems. As mentioned above DCs play a critical role in initiation and maintenance of antitumor immune responses. Therefore, the second part of this study dealt with the impact of a partial deletion of *VHL* on the phenotype and function of DCs. Thus, transgenic mice with a heterozygous loss of either Exon 1 or Exon 2 of the *VHL* gene were generated using the Cre/lox technology. Bone marrow derived-DCs of heterozygous *VHL* knockout mice were generated and matured with LPS. The surface marker expression, in vitro-migratory and endocytotic activity and the allogenic T-cell stimulatory capacity was not affected by the partial loss of *VHL*. However, mice with a heterozygous loss of Exon 2 showed a diminished airway hyperresponsiveness after immunization and provocation with the model allergen OVA, which is presumable due to the observed impaired in vivo migratory capacity and reduced OVA-specific T-cell stimulatory capacity of DCs.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Semenza, G. L. (2007) Life with oxygen. *Science* 318(5847), 62–64
- 2 Mole, D. R., Ratcliffe, P. J. (2008) Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr Nephrol* 23(5), 681–694
- 3 Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., Semenza, G. L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271(30), 17771–17778
- 4 Ke, Q., Costa, M. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70(5), 1469–1480
- 5 Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256(5060), 1193–1195
- 6 Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12), 5510–5514
- 7 Semenza, G. L., Rue, E. A., Iyer, N. V., Pang, M. G., Kearns, W. G. (1996) Assignment of the Hypoxia-Inducible Factor 1 α Gene to a Region of Conserved Synteny on Mouse Chromosome 12 and Human Chromosome 14q. *Genomics* 34(3), 437–439
- 8 Luo, G., Gu, Y. Z., Jain, S., Chan, W. K., Carr, K. M., Hogenesch, J. B., Bradfield, C. A. (1997) Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus. *Gene Expr* 6(5), 287–299
- 9 Tian, H., McKnight, S. L., Russell, D. W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11(1), 72–82
- 10 Maynard, M. A., Qi, H., Chung, J., Lee, E. H. L., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Ohh, M. (2003) Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem* 278(13), 11032–11040
- 11 Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272(17), 11205–11214
- 12 Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18(7), 1905–1914
- 13 Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11), 5667–5672
- 14 Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20(18), 5197–5206
- 15 Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H., Caro, J. (1999) Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 260(2), 557–561
- 16 Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., Ratcliffe, P. J. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107(1), 43–54

- 17 Schofield, C. J., Ratcliffe, P. J. (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(5), 343–354
- 18 Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., Kaelin, W. G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2(7), 423–427. 10.1038/35017054
- 19 Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., Ratcliffe, P. J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399(6733), 271–275
- 20 Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., Whitelaw, M. L. (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295(5556), 858–861
- 21 Wenger, R. H., Stiehl, D. P., Camenisch, G. (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005(306), re12
- 22 Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., Livingston, D. M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23), 12969–12973
- 23 Semenza, G. L., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B. H., Leung, S., Roe, R., Wiener, C., Yu, A. (1997) Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* 51(2), 553–555
- 24 Rankin, E. B., Giaccia, A. J. (2008) The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15(4), 678–685
- 25 Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Harris, A. L. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157(2), 411–421
- 26 Hockel, M., Vaupel, P. (2001) Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 93(4), 266–276
- 27 Semenza, G. L. (2007) Hypoxia and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26(2), 223–224
- 28 Gao, P., Zhang, H., Dinavahi, R., Li, F., Xiang, Y., Raman, V., Bhujwalla, Z. M., Felsner, D. W., Cheng, L., Pevsner, J., Lee, L. A., Semenza, G. L., Dang, C. V. (2007) HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 12(3), 230–238
- 29 Quintero, M., Brennan, P. A., Thomas, G. J., Moncada, S. (2006) Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res* 66(2), 770–774
- 30 Powis, G., Kirkpatrick, L. (2004) Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 3(5), 647–654
- 31 Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10(8), 789–799
- 32 Semenza, G. L. (2009) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29(5), 625–634
- 33 Cosse, J.-P., Michiels, C. (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* 8(7), 790–797
- 34 Shannon, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., Condron, C. M., Toomey, D. (2003) Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 29(4), 297–307
- 35 Unruh, A., Ressel, A., Mohamed, H. G., Johnson, R. S., Nadrowitz, R., Richter, E., Katschinski, D. M., Wenger, R. H. (2003) The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 22(21), 3213–3220
- 36 Brown, J. M. (2007) Tumor Hypoxia in Cancer Therapy, in: Helmut Sies and Bernhard Brüne (ed.) *Methods in Enzymology Oxygen Biology and Hypoxia*, pp. 295–321: Academic Press

- 37 Onnis, B., Rapisarda, A., Melillo, G. (2009) Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13(9a), 2780–2786
- 38 Hur, E., Kim, H.-H., Choi, S. M., Kim, J. H., Yim, S., Kwon, H. J., Choi, Y., Kim, D. K., Lee, M.-O., Park, H. (2002) Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 α /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol* 62(5), 975–982
- 39 Mabweesh, N. J., Post, D. E., Willard, M. T., Kaur, B., van Meir, E. G., Simons, J. W., Zhong, H. (2002) Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1 α protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 62(9), 2478–2482
- 40 Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Sordet, O., Pommier, Y., Shoemaker, R. H., Melillo, G. (2004) Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. *Cancer Res* 64(4), 1475–1482
- 41 Chang, H., Shyu, K.-G., Lee, C.-C., Tsai, S.-C., Wang, B.-W., Hsien Lee, Y., Lin, S. (2003) GL331 inhibits HIF-1 α expression in a lung cancer model. *Biochem Biophys Res Commun* 302(1), 95–100
- 42 Carbonaro, M., O'Brate, A., Giannakakou, P. (2011) Microtubule disruption targets HIF-1 mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *The Journal of Cell Biology* 192(1), 83–99
- 43 Mabweesh, N. J., Escuin, D., LaVallee, T. M., Pribluda, V. S., Swartz, G. M., Johnson, M. S., Willard, M. T., Zhong, H., Simons, J. W., Giannakakou, P. (2003) 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 3(4), 363–375
- 44 Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W., Semenza, G. L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60(6), 1541–1545
- 45 Blancher, C., Moore, J. W., Robertson, N., Harris, A. L. (2001) Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res* 61(19), 7349–7355
- 46 Yonekura, S., Itoh, M., Okuhashi, Y., Takahashi, Y., Ono, A., Nara, N., Tohda, S. (2013) Effects of the HIF1 inhibitor, echinomycin, on growth and NOTCH signalling in leukaemia cells. *Anticancer Res* 33(8), 3099–3103
- 47 Lee, K., Qian, D. Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J. O., Semenza, G. L. (2009) Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(7), 2353–2358
- 48 Richardson, P. G., Hideshima, T., Anderson, K. C. (2003) Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 10(5), 361–369
- 49 Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D. A., Selby, M., Sausville, E. A., Shoemaker, R. H., Melillo, G. (2002) Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 62(15), 4316–4324
- 50 Rothenberg, M. L. (1997) Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol* 8(9), 837–855
- 51 Alagoz, M., C. Gilbert, D., El-Khamisy, S., J. Chalmers, A. (2012) DNA Repair and Resistance to Topoisomerase I Inhibitors: Mechanisms, Biomarkers and Therapeutic Targets. *CMC* 19(23), 3874–3885
- 52 DeBoer, C., Meulman, P. A., Wnuk, R. J., Peterson, D. H. (1970) Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 23(9), 442–447
- 53 Blagg, B. S. J., Kerr, T. D. (2006) Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation. *Med Res Rev* 26(3), 310–338

- 54 Fukuyo, Y., Hunt, C. R., Horikoshi, N. (2010) Geldanamycin and its anti-cancer activities. *Cancer Lett* 290(1), 24–35
- 55 Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J., Michiels, C. (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 460(2), 251–256
- 56 Roe, S. M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., Pearl, L. H. (1999) Structural Basis for Inhibition of the Hsp90 Molecular Chaperone by the Antitumor Antibiotics Radicicol and Geldanamycin. *J. Med. Chem.* 42(2), 260–266. 10.1021/jm980403y
- 57 Whitesell, L., Lindquist, S. L. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5(10), 761–772
- 58 Aoki, D., Katsumata, N., Nakanishi, T., Kigawa, J., Fujiwara, K., Takehara, K., Kamiura, S., Hiura, M., Hatae, M., Sugiyama, T., Ochiai, K., Noda, K. (2011) A Phase II Clinical Trial of Topotecan in Japanese Patients with Relapsed Ovarian Carcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 41(3), 320–327
- 59 Suzuki, H., Hirashima, T., Kobayashi, M., Sasada, S., Okamoto, N., Uehara, N., Matsuura, Y., Tamiya, M., Morishita, N., Higashiguchi, M., Tsumori, T., Kawase, I. (2011) Effect of topotecan as second-line chemotherapy for small cell lung cancer patients with interstitial lung disease. *J Chemother* 23(6), 367–370
- 60 Ge, X.-h., Lin, Q., Ren, X.-c., Liu, Y.-e., Chen, X.-j., Wang, D.-y., Wang, Y.-q., Cao, B., Li, Z.-g., Liu, M.-l. (2013) Phase II clinical trial of whole-brain irradiation plus three-dimensional conformal boost with concurrent topotecan for brain metastases from lung cancer. *Radiat Oncol* 8(1), 238
- 61 Verweij, J., Lund, B., Beijnen, J., Planting, A., Boer-Dennert, M. de, Koier, I., Rosing, H., Hansen, H. (1993) Phase I and pharmacokinetics study of topotecan, a new topoisomerase I inhibitor. *Ann Oncol* 4(8), 673–678
- 62 Gruenigen, V. E. von, Frasure, H. E., Smith, D. A., Fusco, N. L., Eaton, S. M., DeBernardo, R. L., Heugel, A. M., Waggoner, S. E. (2012) Toxicity of weekly oral topotecan in relation to dosage for gynecologic malignancies. *Anti-Cancer Drugs* 23(7), 724–730
- 63 Supko, J. G., Hickman, R. L., Grever, M. R., Malspeis, L. (1995) Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol* 36(4), 305–315
- 64 Oki, Y., Copeland, A., Romaguera, J., Fayad, L., Fanale, M., Faria, S. d. C., Medeiros, L. J., Ivy, P., Younes, A. (2012) Clinical experience with the heat shock protein-90 inhibitor, tanespimycin, in patients with relapsed lymphoma. *Leuk Lymphoma* 53(5), 990–992
- 65 Saif, M. W., Erlichman, C., Dragovich, T., Mendelson, D., Toft, D., Burrows, F., Storgard, C., Hoff, D. (2013) Open-label, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered CNF1010 (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin [17-AAG]) in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 71(5), 1345–1355
- 66 Gartner, E. M., Silverman, P., Simon, M., Flaherty, L., Abrams, J., Ivy, P., LoRusso, P. M. (2012) A phase II study of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in metastatic or locally advanced, unresectable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 131(3), 933–937
- 67 Pacey, S., Wilson, R. H., Walton, M., Eatock, M. M., Hardcastle, A., Zetterlund, A., Arkenau, H.-T., Moreno-Farre, J., Banerji, U., Roels, B., Peachey, H., Aherne, W., Bono, J. S. de, Raynaud, F., Workman, P., Judson, I. (2011) A Phase I Study of the Heat Shock Protein 90 Inhibitor Alvelespimycin (17-DMAG) Given Intravenously to Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* 17(6), 1561–1570. 10.1158/1078-0432.CCR-10-1927
- 68 Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F., Orcutt, M., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., et. a. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260(5112), 1317–1320
- 69 Maher, E. R., Kaelin, W. G., JR (1997) von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)* 76(6), 381–391

- 70 Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., Kaelin, W. G., JR (1995) Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1(8), 822–826
- 71 Iliopoulos, O., Ohh, M., Kaelin, W. G., JR (1998) pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20), 11661–11666
- 72 Gnarr, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F. M. (1994) Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7(1), 85–90
- 73 Richards, F. M., Schofield, P. N., Fleming, S., Maher, E. R. (1996) Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet* 5(5), 639–644
- 74 Blankenship, C., Naglich, J. G., Whaley, J. M., Seizinger, B., Kley, N. (1999) Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene* 18(8), 1529–1535. 10
- 75 Los, M., Jansen, G. H., Kaelin, W. G., Lips, C. J., Blijham, G. H., Voest, E. E. (1996) Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab Invest* 75(2), 231–238
- 76 Corless, C. L., Kibel, A. S., Iliopoulos, O., Kaelin, W. G., JR (1997) Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum Pathol* 28(4), 459–464
- 77 Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G. N., Klausner, R. D. (1999) Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 19(2), 1486–1497
- 78 Stebbins, C. E., Kaelin, W. G., JR, Pavletich, N. P. (1999) Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284(5413), 455–461
- 79 Kaelin, W. G., Iliopoulos, O., Lonergan, K. M., Ohh, M. (1998) Functions of the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. *J Intern Med* 243(6), 535–539
- 80 Kishida, T., Stackhouse, T. M., Chen, F., Lerman, M. I., Zbar, B. (1995) Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res* 55(20), 4544–4548
- 81 Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J. A., Kaelin, W. G., JR (1995) Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 269(5229), 1444–1446
- 82 Pause, A., Lee, S., Worrell, R. A., Chen, D. Y., Burgess, W. H., Linehan, W. M., Klausner, R. D. (1997) The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6), 2156–2161
- 83 Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Klausner, R. D., Pause, A. (1999) Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(22), 12436–12441
- 84 Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79(1), 13–21
- 85 Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405–439
- 86 Pickart, C. M., Eddins, M. J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3), 55–72
- 87 Linehan, W. M., Srinivasan, R., Schmidt, L. S. (2010) The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol* 7(5), 277–285
- 88 Aso, T., Haque, D., Barstead, R. J., Conaway, R. C., Conaway, J. W. (1996) The inducible elongin A elongation activation domain: structure, function and interaction with the elongin BC complex. *EMBO J* 15(20), 5557–5566
- 89 Duan, D., Pause, A., Burgess, W., Aso, T., Chen, D., Garrett, K., Conaway, R., Conaway, J., Linehan, W., Klausner, R. (1995) Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* 269(5229), 1402–1406

- 90 Conaway, J. W., Kamura, T., Conaway, R. C. (1998) The Elongin BC complex and the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1377(2), M49
- 91 Lonergan, K. M., Iliopoulos, O., Ohh, M., Kamura, T., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Kaelin, W. G., JR (1998) Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 18(2), 732-741
- 92 Kipreos, E. T., Lander, L. E., Wing, J. P., He, W. W., Hedgecock, E. M. (1996) *cul-1* Is Required for Cell Cycle Exit in *C. elegans* and Identifies a Novel Gene Family. *Cell* 85(6), 829-839
- 93 Sufan, R. I., Ohh, M. (2006) Role of the NEDD8 modification of Cul2 in the sequential activation of ECV complex. *Neoplasia* 8(11), 956-963
- 94 Liakopoulos, D., Busgen, T., Brychzy, A., Jentsch, S., Pause, A. (1999) Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10), 5510-5515
- 95 Kamura, T., Koepp, D. M., Conrad, M. N., Skowyra, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O., Lane, W. S., Kaelin, W. G., JR, Elledge, S. J., Conaway, R. C., Harper, J. W., Conaway, J. W. (1999) Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284(5414), 657-661
- 96 Roe, J.-S., Youn, H.-D. (2006) The positive regulation of p53 by the tumor suppressor VHL. *Cell Cycle* 5(18), 2054-2056
- 97 Yang, H., Minamishima, Y. A., Yan, Q., Schlisio, S., Ebert, B. L., Zhang, X., Zhang, L., Kim, W. Y., Olumi, A. F., Kaelin, W. G., JR (2007) pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol Cell* 28(1), 15-27
- 98 Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., Krek, W. (2003) Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol* 5(1), 64-70
- 99 Thoma, C. R., Toso, A., Meraldi, P., Krek, W. (2009) Double-trouble in mitosis caused by von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein inactivation. *Cell Cycle* 8(22), 3619-3620
- 100 Kurban, G., Duplan, E., Ramlal, N., Hudon, V., Sado, Y., Ninomiya, Y., Pause, A. (2008) Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene* 27(7), 1004-1012
- 101 Tang, N., Mack, F., Haase, V. H., Simon, M. C., Johnson, R. S. (2006) pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition. *Mol Cell Biol* 26(7), 2519-2530
- 102 Ohh, M., Yauch, R. L., Lonergan, K. M., Whaley, J. M., Stemmer-Rachamimov, A. O., Louis, D. N., Gavin, B. J., Kley, N., Kaelin, W. G., JR, Iliopoulos, O. (1998) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1(7), 959-968
- 103 Hippel, E. von (1904) Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. *Klinische Beobachtungen. Archiv für Ophthalmologie*(59), 83-106
- 104 Lindau Arvid (1927) Zur Frage der Angiomatosis Retinae und ihrer Hirncomplication. *Acta Ophthalmol.* 4, 193-226.(4), 193-226
- 105 Maher, E. R., Iselius, L., Yates, J. R., Littler, M., Benjamin, C., Harris, R., Sampson, J., Williams, A., Ferguson-Smith, M. A., Morton, N. (1991) Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet* 28(7), 443-447
- 106 Chen, F., Kishida, T., Yao, M., Hustad, T., Glavac, D., Dean, M., Gnarr, J. R., Orcutt, M. L., Duh, F. M., Glenn, G. (1995) Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* 5(1), 66-75
- 107 Kaelin, W. G. (2007) von Hippel-Lindau Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2(1), 145-173
- 108 McNeill, A., Rattenberry, E., Barber, R., Killick, P., MacDonald, F., Maher, E. R. (2009) Genotype-phenotype correlations in VHL exon deletions. *Am. J. Med. Genet.* 149(10), 2147-2151

- 109 Barontini, M., Dahia, P. L. (2010) VHL Disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24(3), 401–413. 10.1016/j.beem.2010.01.002
- 110 Kapitsinou, P. P., Haase, V. H. (2008) The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* 15(4), 650–659
- 111 Haase, V. H. (2005) The VHL tumor suppressor in development and disease: functional studies in mice by conditional gene targeting. *Semin Cell Dev Biol* 16(4-5), 564–574
- 112 Gnarr, J. R., Ward, J. M., Porter, F. D., Wagner, J. R., Devor, D. E., Grinberg, A., Emmert-Buck, M. R., Westphal, H., Klausner, R. D., Linehan, W. M. (1997) Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17), 9102–9107
- 113 Schwartz, C. J., Sadowski, P. D. (1989) FLP recombinase of the 2 microns circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* bends its DNA target. Isolation of FLP mutants defective in DNA bending. *J Mol Biol* 205(4), 647–658
- 114 Sadowski, P. D. (1995) The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51, 53–91
- 115 Dymecki, S. M. (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12), 6191–6196
- 116 Sauer, B. (2004) DNA recombination with a heterospecific Cre homolog identified from comparison of the *pac-c1* regions of P1-related phages. *Nucleic Acids Research* 32(20), 6086–6095
- 117 Sternberg, N., Hamilton, D., Hoess, R. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between *loxP* and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* 150(4), 487–507
- 118 Sauer, B., Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14), 5166–5170
- 119 Sternberg, N. (1979) Demonstration and analysis of P1 site-specific recombination using lambda-P1 hybrid phages constructed in vitro. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 2, 1143–1146
- 120 Sternberg, N., Sauer, B., Hoess, R., Abremski, K. (1986) Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J Mol Biol* 187(2), 197–212
- 121 Hochman, L., Segev, N., Sternberg, N., Cohen, G. (1983) Site-specific recombinational circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology* 131(1), 11–17
- 122 Austin, S., Ziese, M., Sternberg, N. (1981) A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25(3), 729–736
- 123 Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J. B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R. H., Kahn, M. L., Kalionis, B., Narayana, S. V., Pierson, L. S. 3. (1986) The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J* 5(2), 433–440
- 124 Sauer, B. (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/*lox* system. *Methods* 14(4), 381–392
- 125 Nagy, A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26(2), 99–109
- 126 Hall, B., Limaye, A., Kulkarni, A. B. Overview: Generation of Gene Knockout Mice
- 127 Hayashi, S., McMahon, A. P. (2002) Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244(2), 305–318.
- 128 Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., Chambon, P. (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237(3), 752–757
- 129 Utomo, A. R., Nikitin, A. Y., Lee, W. H. (1999) Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 17(11), 1091–1096
- 130 Friedel, R. H., Wurst, W., Wefers, B., Kühn, R. Generating Conditional Knockout Mice, pp. 205–231

- 131 Haase, V. H., Glickman, J. N., Socolovsky, M., Jaenisch, R. (2001) Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(4), 1583–1588
- 132 Ma, W., Tessarollo, L., Hong, S.-B., Baba, M., Southon, E., Back, T. C., Spence, S., Lobe, C. G., Sharma, N., Maher, G. W., Pack, S., Vortmeyer, A. O., Guo, C., Zbar, B., Schmidt, L. S. (2003) Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs, and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the VHL gene. *Cancer Res* 63(17), 5320–5328
- 133 Bader, H. L., Hsu, T. (2012) Systemic VHL gene functions and the VHL disease. *FEBS Lett* 586(11), 1562–1569
- 134 Rankin, E. B., Tomaszewski, J. E., Haase, V. H. (2006) Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 66(5), 2576–2583
- 135 Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S. R., Bouxsein, M. L., Faugere, M.-C., Guldberg, R. E., Gerstenfeld, L. C., Haase, V. H., Johnson, R. S., Schipani, E., Clemens, T. L. (2007) The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117(6), 1616–1626
- 136 Biju, M. P., Neumann, A. K., Bensinger, S. J., Johnson, R. S., Turka, L. A., Haase, V. H. (2004) Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol Cell Biol* 24(20), 9038–9047
- 137 Doedens, A. L., Phan, A. T., Stradner, M. H., Fujimoto, J. K., Nguyen, J. V., Yang, E., Johnson, R. S., Goldrath, A. W. (2013) Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8+ T cells to persistent antigen. *Nat Immunol* 14(11), 1173–1182
- 138 Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V. H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G. S., Gerber, H. P., Ferrara, N., Johnson, R. S. (2003) HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112(5), 645–657
- 139 Steinman, R. M., Cohn, Z. A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137(5), 1142–1162
- 140 Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673), 245–252
- 141 Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767–811
- 142 Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., Palucka, A. K., Banchereau, J. (2007) Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 219(1), 118–142. 10.1111
- 143 Liu, K., Nussenzweig, M. C. (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews* 234(1), 45–54
- 144 Shortman, K., Liu, Y.-J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3), 151–161
- 145 Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81(1), 1–5
- 146 Kushwah, R., Hu, J. (2011) Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 133(4), 409–419
- 147 Janeway, C. A., Medzhitov, R. (2002) Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20(1), 197–216
- 148 Schwarz, K., Storni, T., Manolova, V., Didierlaurent, A., Sirard, J.-C., Röthlisberger, P., Bachmann, M. F. (2003) Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 33(6), 1465–1470
- 149 Pulendran, B. (2001) Sensing Pathogens and Tuning Immune Responses. *Science* 293(5528), 253–256

- 150 Trombetta, E. S., Mellman, I. (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23, 975–1028
- 151 Flutter, B., Gao, B. (2004) MHC class I antigen presentation--recently trimmed and well presented. *Cell Mol Immunol* 1(1), 22–30
- 152 Weenink, S. M., Gautam, A. M. (1997) Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol* 75(1), 69–81
- 153 Heemels, M. T., Ploegh, H. (1995) Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 64, 463–491
- 154 Melief, C. J. M. (2003) Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol* 33(10), 2645–2654
- 155 Oizumi, S., Strbo, N., Pahwa, S., Deyev, V., Podack, E. R. (2007) Molecular and cellular requirements for enhanced antigen cross-presentation to CD8 cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 179(4), 2310–2317
- 156 Heath, W. R., Carbone, F. R. (2001) Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1(2), 126–134
- 157 Carbone, F. R., Kurts, C., Bennett, S. R., Miller, J. F., Heath, W. R. (1998) Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 19(8), 368–373
- 158 Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., Kosaka, H. (1996) Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184(3), 923–930
- 159 Chen, L., Flies, D. B. (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13(4), 227–242
- 160 Reid, S. D., Penna, G., Adorini, L. (2000) The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 12(1), 114–121
- 161 Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R., Reske, K. (1992) Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* 154(2), 253–264
- 162 Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., Schuler, G. (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196(2), 137–151
- 163 Jonuleit, H., Knop, J., Enk, A. H. (1996) Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 289(1), 1–8
- 164 Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Pagnanik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A. H. (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27(12), 3135–3142
- 165 Bellinghausen, I., Brand, U., Steinbrink, K., Enk, A. H., Knop, J., Saloga, J. (2001) Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 108(2), 242–249
- 166 Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., Schreiber, R. D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11), 991–998
- 167 Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121(1), 1–14. 10
- 168 Talmadge, J. E. (2011) Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: Mechanisms and clinical impact. *Seminars in Cancer Biology* 21(2), 131–138
- 169 Smyth, M. J., Godfrey, D. I., Trapani, J. A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2(4), 293–299

- 170 Sensi, M. (2006) Unique Tumor Antigens: Evidence for Immune Control of Genome Integrity and Immunogenic Targets for T Cell-Mediated Patient-Specific Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 12(17), 5023–5032
- 171 Higgins, J. P., Bernstein, M. B., Hodge, J. W. (2009) Enhancing immune responses to tumor-associated antigens. *Cancer Biol Ther* 8(15), 1440–1449
- 172 Garg, A. D., Dudek, A. M., Agostinis, P. (2013) Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *Biofactors* 39(4), 355–367
- 173 Petersen, T. R., Dickgreber, N., Hermans, I. F. (2010) Tumor Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Crit Rev Immunol* 30(4), 345–386
- 174 Zitvogel, L., Terme, M., Borg, C., Trinchieri, G. (2006) Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 298, 157–174
- 175 Palucka, K., Banchereau, J. (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 12(4), 265–277
- 176 Palucka, K., Ueno, H., Fay, J., Banchereau, J. (2011) Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med* 269(1), 64–73
- 177 Dunn, G. P., Old, L. J., Schreiber, R. D. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21(2), 137–148
- 178 Bernstorff, W. von, Voss, M., Freichel, S., Schmid, A., Vogel, I., Johnk, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B., Kalthoff, H. (2001) Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 7(3 Suppl), 925s-932s
- 179 Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Arihiro, K. (2006) Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 66(11), 5527–5536
- 180 Gabrilovich, D. (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4(12), 941–952
- 181 Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C., Rodriguez, P. C. (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13(2 Pt 2), 721s-726s
- 182 Umansky, V., Sevko, A. (2013) Tumor Microenvironment and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Microenvironment* 6(2), 169–177
- 183 Kusmartsev, S., Gabrilovich, D. I. (2006) Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25(3), 323–331
- 184 Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H., Jonuleit, H. (2002) Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80(5), 477–483
- 185 Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., Zitvogel, L. (2005) Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202(7), 919–929
- 186 Mocellin, S., Nitti, D. (2008) Therapeutics targeting tumor immune escape: towards the development of new generation anticancer vaccines. *Med Res Rev* 28(3), 413–444.
- 187 Schuette, W. (2001) Chemotherapy as treatment of primary and recurrent small cell lung cancer. *Lung Cancer* 33 Suppl 1, S99-107
- 188 Ménard, C., Martin, F., Apetoh, L., Bouyer, F., Ghiringhelli, F. (2008) Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 57(11), 1579–1587
- 189 Califano, R., Abidin, A. Z., Peck, R., Faivre-Finn, C., Lorigan, P. (2012) Management of Small Cell Lung Cancer. *Drugs* 72(4), 471–490
- 190 Ehrke, M. J. (2003) Immunomodulation in cancer therapeutics. *Int Immunopharmacol* 3(8), 1105–1119

- 191 Shurin, G. V., Tourkova, I. L., Kaneno, R., Shurin, M. R. (2009) Chemotherapeutic Agents in Noncytotoxic Concentrations Increase Antigen Presentation by Dendritic Cells via an IL-12-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology* 183(1), 137–144
- 192 Shurin, M. R., Naiditch, H., Gutkin, D. W., Umansky, V., Shurin, G. V. (2012) ChemImmunoModulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem* 19(12), 1792–1803
- 193 Landreneau, J. P., Shurin, M. R., Agassandian, M. V., Keskinov, A. A., Ma, Y., Shurin, G. V. (2013) Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer Microenvironment*.
- 194 Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2008) Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Current Opinion in Immunology* 20(5), 504–511
- 195 Walmsley, S. R., Cowburn, A. S., Clatworthy, M. R., Morrell, N. W., Roper, E. C., Singleton, V., Maxwell, P., Whyte, M. K. B., Chilvers, E. R. (2006) Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis. *Blood* 108(9), 3176–3178
- 196 Unkeless, J. C. (1979) Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 150(3), 580–596
- 197 Zal, T., Volkman, A., Stockinger, B. (1994) Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 180(6), 2089–2099
- 198 Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., Carbone, F. R. (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76(1), 17–27
- 199 Barnden, M. J., Allison, J. A., Heath, W. R., Carbone, F. R. (1998) Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76(1), 34–40
- 200 Lewandoski, M., Meyers, E. N., Martin, G. R. (1997) Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 159–168
- 201 Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1), 59–74
- 202 Benard, J., Da Silva, J., Blois, M. C. de, Boyer, P., Duvillard, P., Chiric, E., Riou, G. (1985) Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 45(10), 4970–4979
- 203 Lutz, M. B., Kukulski, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223(1), 77–92
- 204 Julius, M. H., Simpson, E., Herzenberg, L. A. (1973) A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 3(10), 645–649
- 205 Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R. K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16(15), 7351–7367
- 206 Pior, J., Vogl, T., Sorg, C., MacHer, E. (1999) Free hapten molecules are dispersed by way of the bloodstream during contact sensitization to fluorescein isothiocyanate. *J Invest Dermatol* 113(6), 888–893
- 207 Glaab, T., Taube, C., Braun, A., Mitzner, W. (2007) Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir Res* 8, 63

- 208 Tanaka, H., Matsushima, H., Nishibu, A., Clausen, B. E., Takashima, A. (2009) Dual Therapeutic Efficacy of Vinblastine as a Unique Chemotherapeutic Agent Capable of Inducing Dendritic Cell Maturation. *Cancer Research* 69(17), 6987–6994
- 209 Lake, R. A., Robinson, B. W. (2005) Opinion: Immunotherapy and chemotherapy — a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 5(5), 397–405
- 210 Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G. (2008) Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8(1), 59–73
- 211 Hu, J., Kinn, J., Zirakzadeh, A. A., Sherif, A., Norstedt, G., Wikström, A.-C., Winqvist, O. (2013) The effects of chemotherapeutic drugs on human monocyte-derived dendritic cell differentiation and antigen presentation. *Clin Exp Immunol* 172(3), 490–499
- 212 Sakai, H., Kokura, S., Ishikawa, T., Tsuchiya, R., Okajima, M., Matsuyama, T., Adachi, S., Katada, K., Kamada, K., Uchiyama, K., Handa, O., Takagi, T., Yagi, N., Naito, Y., Yoshikawa, T. (2013) Effects of anticancer agents on cell viability, proliferative activity and cytokine production of peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 52(1), 64–71
- 213 Lorusso, D., Pietragalla, A., Mainenti, S., Masciullo, V., Di Vagno, G., Scambia, G. (2010) Review role of topotecan in gynaecological cancers: current indications and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 74(3), 163–174
- 214 Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6(10)
- 215 Ochel, H. J., Eichhorn, K., Gademann, G. (2001) Geldanamycin: the prototype of a class of antitumor drugs targeting the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* 6(2), 105–112
- 216 Lesko, E., Gozdzik, J., Kijowski, J., Jenner, B., Wiecha, O., Majka, M. (2007) HSP90 antagonist, geldanamycin, inhibits proliferation, induces apoptosis and blocks migration of rhabdomyosarcoma cells in vitro and seeding into bone marrow in vivo. *Anticancer Drugs* 18(10)
- 217 Ziegler-Heitbrock, H. W., Ulevitch, R. J. (1993) CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 14(3), 121–125
- 218 Ruppert, J., Friedrichs, D., Xu, H., Peters, J. H. (1991) IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunobiology* 182(5), 449–464
- 219 Spisek, R., Bretaudeau, L., Barbieux, I., Meflah, K., Gregoire, M. (2001) Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 50(8), 417–427
- 220 Trinchieri, G. (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 251–276
- 221 Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J. P., Bates, E. E. M., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y.-J., Trinchieri, G., O'Garra, A. (2006) Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 177(11), 7551–7558
- 222 Jong, E. C. de, Smits, H. H., Kapsenberg, M. L. (2005) Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 26(3), 289–307
- 223 Diehl, S., Rincon, M. (2002) The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 39(9), 531–536
- 224 Trinchieri, G., Gerosa, F. (1996) Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 59(4), 505–511
- 225 Smits, H. H., Jong, E. C. de, Wierenga, E. A., Kapsenberg, M. L. (2005) Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 26(3), 123–129

- 226 Ross, R., Ross, X. L., Schwing, J., Langin, T., Reske-Kunz, A. B. (1998) The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 160(8), 3776–3782
- 227 Ross, R., Jonuleit, H., Bros, M., Ross, X. L., Yamashiro, S., Matsumura, F., Enk, A. H., Knop, J., Reske-Kunz, A. B. (2000) Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell differentiation. *J Invest Dermatol* 115(4), 658–663
- 228 Bros, M., Ross, X.-L., Pautz, A., Reske-Kunz, A. B., Ross, R. (2003) The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *J Immunol* 171(4), 1825–1834
- 229 Lanzavecchia, A. (1996) Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 8(3), 348–354
- 230 Thomas, R., Lipsky, P. E. (1996) Dendritic Cells: Origin and Differentiation. *Stem Cells* 14(2), 196–206
- 231 Mosmann, T. R. (1991) Regulation of immune responses by T cells with different cytokine secretion phenotypes: role of a new cytokine, cytokine synthesis inhibitory factor (IL10). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 94(1-4), 110–115
- 232 Maher, E. R., Neumann, H. P. H., Richard, S. (2011) von Hippel–Lindau disease: A clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 19(6), 617–623
- 233 Lonser, R. R., Glenn, G. M., Walther, M., Chew, E. Y., Libutti, S. K., Linehan, W. M., Oldfield, E. H. (2003) von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 361(9374), 2059–2067
- 234 Yee Koh, M., Spivak-Kroizman, T. R., Powis, G. (2008) HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 33(11), 526–534
- 235 Gao, J., Naglich, J. G., Laidlaw, J., Whaley, J. M., Seizinger, B. R., Kley, N. (1995) Cloning and characterization of a mouse gene with homology to the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: implications for the potential organization of the human von Hippel-Lindau disease gene. *Cancer Res* 55(4), 743–747
- 236 Meyers, E. N., Lewandoski, M., Martin, G. R. (1998) An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18(2), 136–141
- 237 Szabo, P., Mann, J. R. (1994) Expression and methylation of imprinted genes during in vitro differentiation of mouse parthenogenetic and androgenetic embryonic stem cell lines. *Development* 120(6), 1651–1660
- 238 Vidal, F., Sage, J., Cuzin, F., Rassoulzadegan, M. (1998) Cre expression in primary spermatocytes: a tool for genetic engineering of the germ line. *Mol Reprod Dev* 51(3), 274–280
- 239 Mueller, D. L., Jenkins, M. K., Schwartz, R. H. (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7, 445–480
- 240 Autenrieth, S. E., Autenrieth, I. B. (2009) Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* 127(4), 523–529
- 241 Dalglish, A., Pandha, H. (2007) Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines. *Adv Cancer Res* 96, 175–190
- 242 Parmiani, G., Filippo, A. de, Novellino, L., Castelli, C. (2007) Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol* 178(4), 1975–1979
- 243 Breckpot, K., Escors, D. (2009) Dendritic cells for active anti-cancer immunotherapy: targeting activation pathways through genetic modification. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9(4), 328–343
- 244 Multhoff, G., Gaipl, U. S., Niedermann, G. (2012) Die Rolle der Strahlentherapie bei der Induktion von Antitumor-Immunantworten. *Strahlenther Onkol* 188(S3), 312–315

- 245 Nagaraj, S., Gabrilovich, D. I. (2008) Tumor Escape Mechanism Governed by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research* 68(8), 2561–2563
- 246 Sehouli, J., Oskay-Ozcelik, G. (2009) Current role and future aspects of topotecan in relapsed ovarian cancer. *Curr Med Res Opin* 25(3), 639–651
- 247 Wang, J. C. (1987) Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 909(1), 1–9
- 248 Cormio, G., Loizzi, V., Gissi, F., Camporeale, A., Mitri, P. de, Leone, L., Putignano, G., Selvaggi, L. (2011) Long-term topotecan therapy in recurrent or persistent ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 32(2), 153–155
- 249 Chen, A. Y., Chen, P. M. T., Chen, Y.-J. (2012) DNA topoisomerase I drugs and radiotherapy for lung cancer. *J Thorac Dis* 4(4), 390–397
- 250 Bączek, T., Konieczna, L., Belka, M., Maciejka-Kapuścińska, L., Wiśniewski, J., Niedźwiecki, M., Balcerska, A., Adamkiewicz-Drożyńska, E., Wachowiak, J. (2012) Topotecan exposure estimation in pediatric acute myeloid leukemia supported by LC–MS-based drug monitoring and pharmacokinetic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70, 330–336
- 251 Agelaki, S., Kontopodis, E., Kotsakis, A., Chandrinou, V., Bompolaki, I., Zafeiriou, Z., Papadimitraki, E., Stolidis, D., Kalbakis, K., Georgoulas, V. (2013) A phase I clinical trial of weekly oral topotecan for relapsed small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 72(1), 45–51
- 252 Curtis, K. K., Hartney, J. T., Jewell, R. C., Park, J. W., Lebowitz, P. F., Griffin, P. P., Borad, M. J., Fitch, T. R., Northfelt, D. W. (2010) A Phase I Study to Characterize the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Topotecan at 4 mg/m² Administered Weekly as a 30-Minute Intravenous Infusion in Patients With Cancer. *The Journal of Clinical Pharmacology* 50(3), 268–275
- 253 Sehouli, J., Stengel, D., Harter, P., Kurzeder, C., Belau, A., Bogenrieder, T., Markmann, S., Mahner, S., Mueller, L., Lorenz, R., Nugent, A., Wilke, J., Kuznik, A., Doering, G., Wischnik, A., Sommer, H., Meerpohl, H.-G., Schroeder, W., Lichtenegger, W., Oskay-Ozcelik, G. (2011) Topotecan Weekly Versus Conventional 5-Day Schedule in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer: A Randomized Multicenter Phase II Trial of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology Ovarian Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 29(2), 242–248
- 254 Santana, M. A., Rosenstein, Y. (2003) What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol* 195(3), 392–401
- 255 Lin, S.-s., Sun, L., Zhang, Y.-k., Zhao, R.-p., Liang, W.-l., Yuan, S.-t., Zhang, L.-y. (2009) Topotecan inhibits cancer cell migration by down-regulation of chemokine CC motif receptor 7 and matrix metalloproteinases. *Acta Pharmacol Sin* 30(5), 628–636
- 256 Nakashio, A., Fujita, N., Tsuruo, T. (2002) Topotecan inhibits VEGF- and bFGF-induced vascular endothelial cell migration via downregulation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Int J Cancer* 98(1), 36–41
- 257 Adams, J. C. (2004) Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol* 16(5), 590–596
- 258 Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M. B., Layton, G. T., Rainer, C., Senior, R. M., Shipley, J. M., Fritsch, P., Schuler, G., Romani, N. (2002) Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* 168(9), 4361–4371
- 259 Kis-Toth, K., Bacskai, I., Gogolak, P., Mazlo, A., Szatmari, I., Rajnavolgyi, E. (2013) Monocyte-derived dendritic cell subpopulations use different types of matrix metalloproteinases inhibited by GM6001. *Immunobiology*. 10
- 260 Perkins, N. D. (2012) The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*.

- 261 Neumann, M., Fries, H., Scheicher, C., Keikavoussi, P., Kolb-Maurer, A., Brocker, E., Serfling, E., Kampgen, E. (2000) Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 95(1), 277–285
- 262 Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. (1998) NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16(1), 225–260. 263 Baldwin, A. S. (1996) THE NF- κ B AND I κ B PROTEINS: New Discoveries and Insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14(1), 649–681
- 264 Scott, M. L., Fujita, T., Liou, H. C., Nolan, G. P., Baltimore, D. (1993) The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes & Development* 7(7a), 1266–1276
- 265 Sato, K., Nagayama, H., Tadokoro, K., Juji, T., Takahashi, T. A. (1999) Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 162(7), 3865–3872
- 266 Arrighi, J. F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., Hauser, C. (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166(6), 3837–3845
- 267 Puig-Kroger, A., Relloso, M., Fernandez-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabeu, C., Corbi, A. L. (2001) Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98(7), 2175–2182
- 268 Yanagawa, Y., Iijima, N., Iwabuchi, K., Onoe, K. (2002) Activation of extracellular signal-related kinase by TNF-alpha controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J Leukoc Biol* 71(1), 125–132
- 269 Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., Moroi, Y. (2004) Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 16(12)
- 270 Xie, J., Qian, J., Yang, J., Wang, S., Freeman, M. E. 3., Yi, Q. (2005) Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp Hematol* 33(5), 564–572
- 271 Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquin, C., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y., Pockley, G. (2008) Supernatant from Bifidobacterium Differentially Modulates Transduction Signaling Pathways for Biological Functions of Human Dendritic Cells. *PLoS ONE* 3(7)
- 272 Semenza, G. L. (2010) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development* 20(1), 51–56
- 273 Semenza, G. L. (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 33(4), 207–214
- 274 Rama, I., Bruene, B., Torras, J., Koehl, R., Cruzado, J. M., Bestard, O., Franquesa, M., Lloberas, N., Weigert, A., Herrero-Fresneda, I., Gullias, O., Grinyó, J. M. (2008) Hypoxia stimulus: An adaptive immune response during dendritic cell maturation. *Kidney Int* 73(7), 816–825
- 275 Jantsch, J., Chakravorty, D., Turza, N., Prechtel, A. T., Buchholz, B., Gerlach, R. G., Volke, M., Glasner, J., Warnecke, C., Wiesener, M. S., Eckardt, K.-U., Steinkasserer, A., Hensel, M., Willam, C. (2008) Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol* 180(7), 4697–4705
- 276 Muraille, E., Leo, O. (1998) Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol* 47(1), 1–9
- 277 Pulendran, B., Tang, H., Manicassamy, S. (2010) Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol* 11(8), 647–655
- 278 Shurin, G. V., Ouellette, C. E., Shurin, M. R. (2012) Regulatory dendritic cells in the tumor immunoenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 61(2), 223–230.

- 279 Sato, M., Goto, S., Kaneko, R., Ito, M., Sato, S., Takeuchi, S. (1998) Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. *Anticancer Res* 18(5D), 3951–3955
- 280 Shurin, M. R., Lu, L., Kalinski, P., Stewart-Akers, A. M., Lotze, M. T. (1999) Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 21(3), 339–359
- 281 Kidd, P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8(3), 223–246
- 282 Polancec, D. S., Munic Kos, V., Banjanac, M., Vrancic, M., Cuzic, S., Belamaric, D., Parnham, M. J., Polancec, D., Haber, V. E. (2012) Azithromycin drives in vitro GM-CSF/IL-4-induced differentiation of human blood monocytes toward dendritic-like cells with regulatory properties. *Journal of Leukocyte Biology* 91(2), 229–243
- 283 Kushwah, R., Hu, J. (2011) Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci* 1(1), 20
- 284 Takei, M., Umeyama, A., Arihara, S. (2005) Epicubenol and Ferruginol induce DC from human monocytes and differentiate IL-10-producing regulatory T cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 337(2), 730–738
- 285 Pratt, W. B. (1998) The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 217(4), 420–434
- 286 Pearl, L. H., Prodromou, C. (2000) Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol* 10(1), 46–51
- 287 Cheng, Q., Chang, J. T., Geradts, J., Neckers, L. M., Haystead, T., Spector, N. L., Lyster, H. K. (2012) Amplification and high-level expression of heat shock protein 90 marks aggressive phenotypes of human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 14(2)
- 288 Workman, P. (2004) Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol Med* 10(2), 47–51
- 289 Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., Pearl, L. H. (1998) ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J* 17(16), 4829–4836
- 290 Kamal, A., Burrows, F. J. (2004) Hsp90 inhibitors as selective anticancer drugs. *Discov Med* 4(23), 277–280
- 291 Du, X., Mi, R., Qu, Q., Qu, Y., Yue, T. (2008) Effects of geldanamycin on expression of Bcl-2 in human cervical cancer HeLa cells. *Chin. J. Clin. Oncol.* 5(2), 113–117
- 292 Korsmeyer, S. J. (1995) Regulators of cell death. *Trends Genet* 11(3), 101–105
- 293 Nopora, A., Brocker, T. (2002) Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol* 169(6), 3006–3014
- 294 Buchner, J., Li, J. (2013) Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Biomed J* 36(3), 106
- 295 Franke, J., Eichner, S., Zeilinger, C., Kirschning, A. (2013) Targeting heat-shock-protein 90 (Hsp90) by natural products: geldanamycin, a show case in cancer therapy. *Nat. Prod. Rep.* 30(10), 1299
- 296 Park, D., Lapteva, N., Seethammagari, M., Slawin, K. M., Spencer, D. M. (2006) An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol* 24(12), 1581–1590
- 297 Sato, S., Fujita, N., Tsuruo, T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20), 10832–10837
- 298 Bae, J., Mitsiades, C., Tai, Y.-T., Bertheau, R., Shammas, M., Batchu, R. B., Li, C., Catley, L., Prabhala, R., Anderson, K. C., Munshi, N. C. (2007) Phenotypic and functional effects of heat shock protein 90 inhibition on dendritic cell. *J Immunol* 178(12), 7730–7737

- 299 Pacey, S., Gore, M., Chao, D., Banerji, U., Larkin, J., Sarker, S., Owen, K., Asad, Y., Raynaud, F., Walton, M., Judson, I., Workman, P., Eisen, T. (2012) A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs* 30(1), 341–349
- 300 Hopkins, R. A., Connolly, J. E. (2012) The specialized roles of immature and mature dendritic cells in antigen cross-presentation. *Immunol Res* 53(1-3), 91–107
- 301 Alvarez, D., Vollmann, E. H., Andrian, U. H. von (2008) Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. *Immunity* 29(3), 325–342
- 302 Randolph, G. J. (2001) Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol* 13(5), 267–274
- 303 Taiyab, A., Rao, C. M. (2011) HSP90 modulates actin dynamics: Inhibition of HSP90 leads to decreased cell motility and impairs invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813(1), 213–221
- 304 Wang, Z., Kumamoto, Y., Wang, P., Gan, X., Lehmann, D., Smrcka, A. V., Cohn, L., Iwasaki, A., Li, L., Wu, D. (2009) Regulation of immature dendritic cell migration by RhoA guanine nucleotide exchange factor Arhgef5. *J Biol Chem* 284(42), 28599–28606.
- 305 Shurin, G. V., Tourkova, I. L., Shurin, M. R. (2008) Low-dose chemotherapeutic agents regulate small Rho GTPase activity in dendritic cells. *J Immunother* 31(5), 491–499.
- 306 Swetman, C. A., Leverrier, Y., Garg, R., Gan, C. H. V., Ridley, A. J., Katz, D. R., Chain, B. M. (2002) Extension, retraction and contraction in the formation of a dendritic cell dendrite: distinct roles for Rho GTPases. *Eur J Immunol* 32(7), 2074–2083
- 307 Powers, M. V., Workman, P. (2006) Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocrine Related Cancer* 13(Supplement 1)
- 308 Hsu, H.-Y., Wu, H.-L., Tan, S.-K., Li, V. P.-H., Wang, W.-T., Hsu, J., Cheng, C.-H. (2007) Geldanamycin interferes with the 90-kDa heat shock protein, affecting lipopolysaccharide-mediated interleukin-1 expression and apoptosis within macrophages. *Mol Pharmacol* 71(1), 344–356
- 309 Baeuerle, P. A., Baltimore, D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242(4878), 540–546
- 310 Hayden, M. S., West, A. P., Ghosh, S. (2006) NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25(51), 6758–6780
- 311 Zanetti, M., Castiglioni, P., Schoenberger, S., Gerloni, M. (2003) The role of relB in regulating the adaptive immune response. *Ann N Y Acad Sci* 987, 249–257
- 312 Carrasco, D., Ryseck, R. P., Bravo, R. (1993) Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development* 118(4), 1221–1231
- 313 Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., Lo, D. (1995) Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373(6514), 531–536
- 314 Qing, G., Yan, P., Xiao, G. (2006) Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of IκB kinase (IKK). *Cell Res* 16(11), 895–901
- 315 Qing, G., Yan, P., Qu, Z., Liu, H., Xiao, G. (2007) Hsp90 regulates processing of NF-κB2 p100 involving protection of NF-κB-inducing kinase (NIK) from autophagy-mediated degradation. *Cell Res* 17(6), 520–530
- 316 Bai, L., Xu, S., Chen, W., Li, Z., Wang, X., Tang, H., Lin, Y. (2011) Blocking NF-κB and Akt by Hsp90 inhibition sensitizes Smac mimetic compound 3-induced extrinsic apoptosis pathway and results in synergistic cancer cell death. *Apoptosis* 16(1), 45–54
- 317 Li, Q., Verma, I. M. (2002) NF-κB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(10), 725–734

- 318 Shimp, S. K., Parson, C. D., Regna, N. L., Thomas, A. N., Chafin, C. B., Reilly, C. M., Nichole Rylander, M. (2012) HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor- κ B pathways. *Inflamm. Res.* 61(5), 521–533
- 319 Haupt, A., Joberty, G., Bantscheff, M., Fröhlich, H., Stehr, H., Schweiger, M. R., Fischer, A., Kerick, M., Boerno, S. T., Dahl, A., Lappe, M., Lehrach, H., Gonzalez, C., Drewes, G., Lange, B. M. H. (2012) Hsp90 inhibition differentially destabilises MAP kinase and TGF-beta signalling components in cancer cells revealed by kinase-targeted chemoproteomics. *BMC Cancer* 12(1), 38
- 320 Schulte, T. W., Blagosklonny, M. V., Romanova, L., Mushinski, J. F., Monia, B. P., Johnston, J. F., Nguyen, P., Trepel, J., Neckers, L. M. (1996) Destabilization of Raf-1 by geldanamycin leads to disruption of the Raf-1-MEK-mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Mol Cell Biol* 16(10), 5839–5845
- 321 Kummar, S., Raffeld, M., Juwara, L., Horneffer, Y., Strassberger, A., Allen, D., Steinberg, S. M., Rapisarda, A., Spencer, S. D., Figg, W. D., Chen, X., Turkbey, I. B., Choyke, P., Murgo, A. J., Doroshow, J. H., Melillo, G. (2011) Multihistology, Target-Driven Pilot Trial of Oral Topotecan as an Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* 17(15), 5123–5131
- 322 Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., Farokhzad, O. C. (2014) Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews* 66, 2–25
- 323 Patankar, N. A., Waterhouse, D., Strutt, D., Anantha, M., Bally, M. B. (2013) Topophore C: a liposomal nanoparticle formulation of topotecan for treatment of ovarian cancer. *Invest New Drugs* 31(1), 46–58
- 324 Souza, L., Silva, E., Martins, A., Mota, M., Braga, R., Lima, E., Valadares, M., Taveira, S., Marreto, R. (2011) Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79(1), 189–196
- 325 Chandran, T., Katragadda, U., Teng, Q., Tan, C. (2010) Design and evaluation of micellar nanocarriers for 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG). *International Journal of Pharmaceutics* 392(1-2), 170–177
- 326 Saxena, V., Naguib, Y., Hussain, M. D. (2012) Folate receptor targeted 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric nanoparticles for breast cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94, 274–280
- 327 Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. von, Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292(5516), 468–472
- 328 Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Lowe, S. W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108(2), 153–164
- 329 Sanchez-Puig, N., Veprintsev, D. B., Fersht, A. R. (2005) Binding of natively unfolded HIF-1 α ODD domain to p53. *Mol Cell* 17(1), 11–21
- 330 An, W. G., Kanekal, M., Simon, M. C., Maltepe, E., Blagosklonny, M. V., Neckers, L. M. (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 392(6674), 405–408
- 331 Roe, J.-S., Kim, H., Lee, S.-M., Kim, S.-T., Cho, E.-J., Youn, H.-D. (2006) p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell* 22(3), 395–405
- 332 An, J., Rettig, M. B. (2005) Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* 25(17), 7546–7556
- 333 Li, M., Kim, W. Y. (2011) Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15(2), 187–195

- 334 Hergovich, A., Lisztwan, J., Thoma, C. R., Wirbelauer, C., Barry, R. E., Krek, W. (2006) Priming-dependent phosphorylation and regulation of the tumor suppressor pVHL by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 26(15), 5784–5796
- 335 Calzada, M. J., Esteban, M. A., Feijoo-Cuaresma, M., Castellanos, M. C., Naranjo-Suarez, S., Temes, E., Mendez, F., Yanez-Mo, M., Ohh, M., Landazuri, M. O. (2006) von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Res* 66(3), 1553–1560
- 336 Prowse, A. H., Webster, A. R., Richards, F. M., Richard, S., Olschwang, S., Resche, F., Affara, N. A., Maher, E. R. (1997) Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am J Hum Genet* 60(4), 765–771
- 337 Qu, X., Yang, M.-X., Kong, B.-H., Qi, L., Lam, Q. L. K., Yan, S., Li, P., Zhang, M., Lu, L. (2005) Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 83(6), 668–673
- 338 Köhler, T., Reizis, B., Johnson, R. S., Weighardt, H., Förster, I. (2012) Influence of hypoxia-inducible factor 1 α on dendritic cell differentiation and migration. *Eur. J. Immunol.* 42(5), 1226–1236
- 339 Kobayashi, S. D., DeLeo, F. R. (2009) Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *WIREs Syst Biol Med* 1(3), 309–333
- 340 Borregaard, N. (2010) Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33(5), 657–670
- 341 Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P., Sugamura, K. OX40–OX40 Ligand Interaction in T-Cell-Mediated Immunity and Immunopathology, pp. 63–98
- 342 Vinay, D. S., Kwon, B. S. (1998) Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* 10(6), 481–489
- 343 Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11), 1133–1141
- 344 Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. K. (2008) Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453(7198), 1051–1057
- 345 McMahan, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D. E., Dubois, C. M. (2006) Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem* 281(34), 24171–24181
- 346 Abdul-Hafez, A., Shu, R., Uhal, B. D. (2009) JunD and HIF-1 mediate transcriptional activation of angiotensinogen by TGF- 1 in human lung fibroblasts. *The FASEB Journal* 23(6), 1655–1662
- 347 Kuschel, A., Simon, P., Tug, S. (2012) Functional regulation of HIF-1 α under normoxia-is there more than post-translational regulation? *J. Cell. Physiol.* 227(2), 514–524
- 348 Baek, K. J., Cho, J. Y., Rosenthal, P., Alexander, L. E. C., Nizet, V., Broide, D. H. (2013) Hypoxia potentiates allergen induction of HIF-1 α , chemokines, airway inflammation, TGF- β 1, and airway remodeling in a mouse model. *Clin Immunol* 147(1), 27–37
- 349 Huerta-Yepez, S., Baay-Guzman, G. J., Bebenek, I. G., Hernandez-Pando, R., Vega, M. I., Chi, L., Riedl, M., Diaz-Sanchez, D., Kleerup, E., Tashkin, D. P., Gonzalez, F. J., Bonavida, B., Zeidler, M., Hankinson, O. (2011) Hypoxia Inducible Factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy* 66(7), 909–918
- 350 Kim, S. R., Lee, K. S., Park, H. S., Park, S. J., Min, K. H., Moon, H., Puri, K. D., Lee, Y. C. (2010) HIF-1 α inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium. *Eur. J. Immunol.* 40(10), 2858–2869
- 351 Lee, S. Y., Kwon, S., Kim, K. H., Moon, H. S., Song, J. S., Park, S. H., Kim, Y. K. (2006) Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 97(6), 794–799

- 352 Crotty Alexander, L. E., Akong-Moore, K., Feldstein, S., Johansson, P., Nguyen, A., McEachern, E. K., Niciatia, S., Cowburn, A. S., Olson, J., Cho, J. Y., Isaacs, H., Johnson, R. S., Broide, D. H., Nizet, V. (2013) Myeloid cell HIF-1 α regulates asthma airway resistance and eosinophil function. *J Mol Med* 91(5), 637–644
- 353 Kudo, M., Ishigatsubo, Y., Aoki, I. (2013) Pathology of asthma. *Front Microbiol* 4, 263
- 354 Naclerio, R. M., Barody, F. (1998) Understanding the inflammatory processes in upper allergic airway disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 101(2 Pt 2), S345-51
- 355 Lloyd, C. M., Saglani, S. (2013) T cells in asthma: Influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(5), 1267–1274

8 Anhang

8.1 Danksagung

8.2 Lebenslauf

8.3 Veröffentlichungen

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Trojandt S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Geldanamycin-mediated inhibition of heat shock protein 90 partially activates dendritic cells, but interferes with their full maturation, accompanied by impaired upregulation of RelB.

J Exp Clin Cancer Res. 2014 Feb 13;33:16.

Trojandt S, Knies D, Pektor S, Ritz S, Mailänder V, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

The chemotherapeutic agent topotecan differentially modulates the phenotype and function of dendritic cells

Cancer Immunol Immunother. 2013 62:1315–1326

Weitere Publikationen

Lausch E, Janecke A, Bros M, **Trojandt S**, Alanay Y, De Laet C, Hübner CA, Meinecke P, Nishimura G, Matsuo M, Hirano Y, Tenoutasse S, Kiss A, Rosa RF, Unger SL, Renella R, Bonafé L, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A.

Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia, cerebral calcifications and autoimmunity.

Nat Genet. 2011 Feb, 43(2):132-7. Epub 2011 Jan 9.

Bros M, Dexheimer N, Ross R, **Trojandt S**, Höhn Y, Tampe J, Sutter A, Jährling F, Grabbe S, Reske-Kunz AB.

Differential gene expression analysis identifies murine Cacnb3 as strongly upregulated in distinct dendritic cell populations upon stimulation.

Gene. 2011 Feb 1, 472(1-2):18-27. Epub 2010 Oct 30.

Bros M, Dexheimer N, Besche V, Masri J, **Trojandt S**, Hövelmeyer N, Reissig S, Massoumi R, Grabbe S, Waisman A, Reske-Kunz AB.

Mutated cylindromatosis gene affects the functional state of dendritic cells.

Eur J Immunol. 2010 Oct, 40(10):2848-57.

Besche V, Wiechmann N, Castor T, **Trojandt S**, Höhn Y, Kunkel H, Grez M, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Dendritic cells lentivirally engineered to overexpress interleukin-10 inhibit contact hypersensitivity responses, despite their partial activation induced by transduction-associated physical stress.

J Gene Med. 2010 Mar, 12(3):231-43.

Kongressbeiträge

Vorträge

Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB , Bros M

Der Einfluss des Antitumoragens Geldanamycin auf humane Monozyten-abgeleitete Dendritische Zellen.

24. Mainzer Allergie Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 22.-23.03.2012, Mainz, Allergo Journal (Abstract V05)

Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB , Bros M

Der Einfluss des Antitumoragens Topotecan auf humane monozytenabgeleitete Dendritische Zellen.

23. Mainzer Allergie Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 10.-11.03.2011, Mainz, Allergo Journal 20: 26 (Abstract V02)

Bros M, Dexheimer N, **Trojandt S**, Besche V, Keppler R, Grabbe S, Lausch E, Reske-Kunz AB

Cobalt Chloride as a chemical inducer of hypoxia-induced factor (HIF) augments the T cell stimulatory capacity of murine unstimulated bone marrow-derived DCs, but not counteracted by the prototypic HIF inhibitor YC-1.

23. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) 10.-11.03.2011, Mainz, Allergo Journal 20: 26 (Abstract V03)

Besche V, Dexheimer N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Properties of murine dendritic cells genetically engineered with the aim to overexpress immunomodulatory molecules.

51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 23.-25.03.2010, Mainz, Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology 381 (Suppl. 1): 38 (Abstract 158)

Besche V, Dexheimer N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

Comparative analysis of murine DCs genetically engineered to overexpress immunomodulatory molecules.

22. Mainzer Allergie Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 11.-12.03.2010, Mainz, Allergo Journal 19: 33 (Abstract V14)

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Comparative analysis of the properties of murine DCs genetically engineered to overexpress a panel of antiinflammatory molecules.

2nd European Congress of Immunology, 13. – 16. 09.2009, Berlin, European Journal of Immunology 39 (Suppl. 1): 330 (Abstract WSD19/3)

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros

Murine dendritic cells genetically engineered to overexpress the immunomodulatory cytokines IL-10, IL-21 or IL-1RA display a protolerogenic status.

World Immune Regulation Meeting III, 22. - 28. März 2009 Davos, Switzerland, Abstractband.

Trojandt S, Wiechmann N, Bovensiepen C, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Molekulare Charakteristika differentiell tolerogener humaner antigenpräsentierender Zellen.

21. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 19.-20.03.2009, Mainz. Allergo-Journal 18: 37 (Abstract V19)

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros

Eine lentiviral vermittelte Überexpression der immunmodulatorischen Zytokine IL-10, IL-21 und IL-1RA in murinen dendritischen Zellen induziert einen protolerogenen DC-Status.

21. Mainzer Allergie-Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 19.-20.03.2009, Mainz. Allergo-Journal 18: 36 (Abstract V18).

Trojandt S, Wiechmann N, Bovensiepen C, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Molekulare Charakteristika differentiell tolerogener humaner antigenpräsentierender Zellen.

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 10.-12.03.2009, Mainz, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 379 (Suppl. 1): 39 (Abstract 173).

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Genetically modified murine dendritic cells engineered to overexpress immunomodulatory cytokines display a protolerogenic status.

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 10.-12.03.2009, Mainz, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 379 (Suppl. 1): 38 (Abstract 171).

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Tolerogenic potential of lentivirally transduced murine DC overexpressing antiinflammatory molecules.

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfi), 03.-06.09.2008, Wien, Austria, Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine 120 (Suppl. 1): 45 (Abstract 138).

Trojandt S, Wiechmann N, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Characteristics of human antigen presenting cells derived from myeloid dendritic cell progenitors cultured in the presence of agents with antiinflammatory potential.

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. 11.-13.03.2008, Mainz, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 377 (Suppl. 1): 44 (Abstract 199).

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, **Trojandt S**, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

The synthetic glucocorticoid dexamethasone mediates induction of tolerogenic antigen presenting cells.

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. 11.-13.03.2008, Mainz, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 377 (Suppl. 1): 44 (Abstract 197)

Bros M, Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Castor T, Bellinghausen I, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB.

In Anwesenheit von Glucocorticoid generierte myeloide dendritische Zellen üben tolerogene Funktion aus.

20. Mainzer Allergie-Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 07.-08.03.2008, Mainz, Allergo Journal 17: 39 (Abstract V12).

Bros M, Boissel JP, Gödtel-Armbrust J, **Trojandt S**, Reske-Kunz AB, Förstermann U.
The untranslated region of exon 2 of the human neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene exerts regulatory activity.

3rd International Symposium of the Collaborative Research Center (SFB) 553 and 12th NO Forum of the German-speaking Countries Conference Venue, 04.10-06.10.2007, Mainz

Poster

Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

Effects of anti-cancer agents with proposed HIF inhibitory activity on human monocyte-derived dendritic cells

Keystone Symposium: Advances in Hypoxic Signaling: From Bench to Bedside; Banff, Canada

Abstractband (Abstract 333), 2011

Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

The HSP90 inhibitor geldanamycin alters the activation state of human dendritic cells.

2011 Joint Annual Meeting, Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA) and German Society for Immunology (DGfI), 28.9.-01.10.2011, Riccione, Italy, Minerva Medica, Vol. 102, Suppl. 1, No. 5 (Abstract WS13-169)

Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

The anti-tumor agent topotecan has an impact on the activation of human monocyte derived dendritic cells.

77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. 30.03.-01.04.2011, Frankfurt am Main, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 383 (Suppl. 1): 78 (Abstract P335)

Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

Human monocyte-derived dendritic cells are affected by the antitumour agent topotecan.

BSI Annual Congress, 06.-10.12.2010, Liverpool, UK, Abstractband (Abstract 308)

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

Comparative analysis of the tolerogenic properties of murine myeloid dendritic cells which overexpress different kinds of immunomodulatory molecules.

DC2010: Forum on Vaccine Science, 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, 26.-30.09.2010, Lugano, Switzerland, Abstractband.

Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

Effects of the anti-cancer agent topotecan on human monocyte-derived dendritic cells.

CIMT Cancer Immunotherapy, 8th Annual Meeting, 26.-28.05.2010, Mainz, Abstractband (Abstract 118).

Trojandt S, Wiechmann N, Bovensiepen C, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Tolerogenic human antigen presenting cells derived from monocytic dc progenitors by coapplication of immunomodulatory agents show partially overlapping gene expression signatures.

2nd European Congress of Immunology, 13.-16.09 2009, Berlin, European Journal of Immunology 39 (Suppl. 1): 650 (Abstract PA10/19).

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Differentiation of murine myeloid DC progenitors in the presence of glucocorticoid results in the induction of tolerogenic APCs.

2nd European Congress of Immunology, 13.-16.09.2009, Berlin, European Journal of Immunology 39 (Suppl. 1): 649 (Abstract PA10/16).

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Murine myeloid dendritic cells genetically engineered to overexpress immunomodulatory cytokines display a protolerogenic status.

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology - Dendritic Cells, 29.03.-03.04.2009, Banff, Alberta, Canada, Abstractband.

Trojandt S, Wiechmann N, Bovensiepen C, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M

Characteristics of human antigen presenting cells derived from monocytic DC progenitors cultured in the presence of tumour-derived immunomodulatory agents.

World Immune Regulation Meeting III, 22.-28.03.2009, Davos, Switzerland, Abstractband.

Besche V, Wiechmann N, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Lentivirally transduced murine DC engineered to overexpress antiinflammatory molecules exert tolerogenic function.

The 10th International Symposium on Dendritic Cells, 01.-05.10.2008, Kobe, Japan, Abstractband.

Trojandt S, Wiechmann N, Bovensiepen C, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Molecular characteristics of human antigen presenting cells derived from monocytic DC progenitors cultured in the presence of antiinflammatory agents.

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfi), 03.-06.09.2008; Wien, Austria, Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine 120 (Suppl. 1): 126 (Abstract P220)

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, **Trojandt S**, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

The synthetic glucocorticoid dexamethasone mediates induction of tolerogenic murine DC.

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfi), 03.-06.09.2008, Wien, Austria, Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine 120 (Suppl. 1): 126 (Abstract P219)

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, **Trojandt S**, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M.

Dendritic cells generated in the presence of glucocorticoid induce regulatory T cells.

World Immune Regulation Meeting II, 17.-20.03.2008, Davos, Switzerland, Abstractband

8.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mainz, den

Stefanie Trojandt