

# **Einfluss des Tumormilieus auf die Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen und Evaluation von Maßnahmen zur Prävention bzw. Revertierung von Funktionsdefiziten**

Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Angefertigt am  
Institut für Molekulare Immunologie  
Helmholtz-Zentrum München  
unter der Leitung von Prof. Dr. Dolores J. Schendel  
und der Betreuung von Prof. Dr. Elfriede Nößner

vorgelegt von  
**Anna N. Mendler**  
München, den 27.02.2012

Erstgutachter:

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss

Zweitgutachter:

Herr Prof. Dr. Josef Mautner

Mitgutachter:

Herr Prof. Dr. Michael Schleicher

Herr Prof. Dr. Heinrich Jung

Abgabe der Dissoziation:

27. Februar 2012

Tag der mündlichen Prüfung:

11. Juni 2012



*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1 Das Immunsystem in der Tumorabwehr .....	3
2.1.1 Effektorfunktionen zytotoxischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	4
2.1.2 Signaltransduktion in T-Zellen .....	5
2.2 Die Immunreaktion im Tumormilieu .....	7
2.3 Tumorthherapie .....	13
2.4 Adoptiver T-Zell-Transfer .....	14
<b>3 Aufgabenstellung .....</b>	<b>15</b>
<b>4 Material .....</b>	<b>16</b>
4.1 Geräte.....	16
4.2 Verbrauchsmaterial.....	17
4.3 Reagenzien.....	18
4.3.1 Reagenzien für die Zellkultur .....	18
4.3.2 Sonstige Reagenzien .....	19
4.3.3 Medien.....	20
4.3.4 Puffer und Lösungen .....	21
4.4 Testkits .....	22
4.5 Zelllinien .....	22
4.6 Vektoren .....	24
4.7 Antikörper .....	25
4.7.1 Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	25
4.7.2 Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	26
4.7.3 Antikörper zur Stimulation von T-Zellen.....	26
4.8 Blutproben .....	26
<b>5 Methoden .....</b>	<b>27</b>
5.1 Zellkultur .....	27
5.1.1 Allgemein.....	27
5.1.2 Auftauen der Zellen .....	27
5.1.3 Bestimmung der Zellzahl .....	27
5.1.4 Einfrieren von Zellen.....	28
5.1.5 Kultivierung von adhärenenten Zellen .....	28

5.1.6 Kultivierung von Suspensionszellen .....	29
5.1.7 Fixierung von Zellen .....	29
5.1.8 Färbung von PBMZ mit PKH26 .....	29
5.1.9 Restimulation und Kultivierung des T-Zell-Klons ZTL-JB4 .....	30
5.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMZ).....	31
5.3 In-vitro-Modelle zur Nachahmung des Tumormilieus.....	32
5.3.1 Das komplexe Tumormodell in Anwesenheit extrazellulärer Tumormilieufaktoren .....	32
5.3.2 Tumormodell ohne etabliertes Milieu.....	33
5.3.3 Zellfreies etabliertes Tumormilieu.....	33
5.3.4 Herstellung des zellfreien Tumormilieus (zTM) .....	33
5.3.5 Herstellung von „Milchsäure-Medium“ und „Natriumlaktat- Medium“ .....	34
5.3.6 Messung des pH-Werts .....	35
5.3.7 Ultrazentrifugation zur Abtrennung von Zellmembranvesikel ....	35
5.3.8 Hitzebehandlung zur Ausfällung von Proteinen.....	36
5.3.9 Kynureninmessung.....	36
5.3.10 Adenosinmessung.....	36
5.3.11 Laktatmessung .....	37
5.4 Retrovirale Transduktion von T-Lymphozyten .....	37
5.4.1 Generierung von viralen Partikeln .....	37
5.4.2 Retrovirale Transduktion und anschließende Kultur von transduzierten T-Zellen .....	38
5.5 Durchflusszytometrie .....	40
5.5.1 Prinzip .....	40
5.5.2 Markierung der toten Zellen.....	41
5.5.3 Oberflächenfärbung.....	42
5.5.4 Intrazelluläre Färbung.....	43
5.5.5 Messung der Proben und Auswertung der Daten.....	44
5.5.5.1 Strategie der Auswahlfensterpositionierung zur Identifikation der T-Zellen .....	44
5.6 Stimulation von T-Zellen zur Degranulation und Zytokinproduktion...	47
5.6.1 Stimulation mit TZR-Ligand-positiven Zellen .....	47
5.6.2 Stimulation mit PMA plus Ionomycin .....	47

5.6.3 Stimulation von TZR-D115- bzw. -T58-positiven T-Zellen mit tyrosinasepeptidbeladenen T2-Zellen .....	48
5.7 Nachweis der Effektorfunktion von T-Zellen .....	48
5.7.1 Nachweis der Degranulation .....	48
5.7.2 Nachweis der Zytokinproduktion .....	49
5.7.2.1 Durchflusszytometrischer Nachweis der Degranulation bzw. der Zytokinproduktion von T-Zellen.....	50
5.8 Nachweis von Signalmolekülen mittels Multiplex.....	50
5.8.1 Phosphoprotein- und Gesamtprotein-Multiplex .....	51
5.8.1.1 Stimulation von T-Zellen zur Phosphorylierung von Signalmolekülen der TZR-Kaskade.....	51
5.8.1.2 Ermittlung der Proteinkonzentration nach BCA.....	52
5.8.1.3 Durchführung des Phosphoprotein- und Gesamtprotein-Multiplexes .....	53
5.8.1.4 Messung und Auswertung.....	54
5.8.2 Zytokin-Multiplex .....	54
5.8.2.1 Durchführung des Zytokin-Multiplexes .....	55
5.8.2.2 Messung und Auswertung.....	56
5.8.3 Nachweis von TGF- $\beta$ mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA).....	57
5.8.3.1 Durchführung des TGF- $\beta$ -ELISA.....	57
5.8.3.2 Messung und Auswertung des ELISA.....	58
5.8.4 Chromfreisetzungstest.....	59
5.8.4.1 <sup>51</sup> Cr-Markierung der Zielzellen.....	59
5.8.4.2 Durchführung der CML.....	59
5.8.4.3 Messung und Auswertung.....	60
5.9 Statistische Analysen.....	60
5.9.1 Mann-Whitney-U Test.....	60
5.9.2 Kruskal-Wallis-Test.....	61
5.9.3 Post-Hoc-Test (ANOVA).....	61
5.9.4 Korrelationsanalyse nach Spearman.....	61
<b>6 Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
6.1 Einfluss des Tumormilieus auf die Funktion zytotoxischer T-Zellen...	63

6.1.1	Beeinflussung der ZTL-Funktion durch zelluläre Interaktionen zwischen ZTL und Tumorzellen in Anwesenheit eines etablierten extrazellulären löslichen Tumormilieus. ....	64
6.1.1.1	Bedeutung zellulärer Interaktionen zwischen Tumorzellen und T-Zellen für die Inhibition der ZTL-Funktion.....	68
6.1.1.2	Einfluss des zellfreien Tumormilieus auf die Funktion von T-Zellen .....	69
6.1.2	Untersuchung des zellfreien Tumorüberstands .....	71
6.1.2.1	Zytokine im zellfreien Tumormilieu.....	71
6.1.2.2	Einfluss hitzelabiler Faktoren im zellfreien Tumormilieu auf die Funktion von ZTL.....	72
6.1.2.3	Einfluss von Membranvesikel im zellfreien Tumormilieu auf die Funktion von ZTL.....	73
6.1.2.4	Einfluss von Kynurenin auf die T-Zell-Funktion von ZTL .	74
6.1.2.5	Adenosin im zellfreien Tumormilieu .....	76
6.1.2.6	Laktatkonzentration und pH-Wert im zellfreien Tumormilieu und deren Einfluss auf die T-Zell-Funktion .....	77
6.1.2.7	Zusammenspiel von Laktat und pH-Wert bei der Inhibition der T-Zell-Funktion .....	86
6.1.3	Einfluss des zellfreien Tumormilieus auf therapeutisch relevante T-Zellen.....	89
6.1.4	TZR-Signaltransduktion im Tumormilieu .....	94
6.1.4.1	Untersuchung der Phosphorylierung von Signalproteinen .....	95
6.1.5	Reversibilität der Inhibition .....	101
6.1.5.1	Reversibilität der funktionellen Inhibition.....	101
6.1.5.2	Reversibilität der Inhibition der Phosphorylierung der Signalproteine .....	101
6.2	Folgen einer langfristigen Exposition der T-Zellen im Tumormilieu .	103
6.2.1	Einfluss des Tumormilieus auf die Zytotoxizität von ZTL.....	103
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>109</b>
7.1	Dem Tumormilieu ausgesetzte Effektor-T-Zellen weisen funktionelle Defizite auf .....	110



7.2 Laktat inhibiert die Phosphorylierung von Signalproteinen in T <sub>EFF</sub> -Zellen .....	117
7.3 Reversibilität der beobachteten Defizienzen.....	120
7.4 Relevanz der erzielten Ergebnisse .....	121
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>144</b>
<b>10 Anhang .....</b>	<b>149</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>151</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>154</b>

### 1 Zusammenfassung

Berichte aus der Literatur zeigen, dass im Tumormilieu verschiedene Faktoren akkumuliert werden, die Einfluss auf T-Zellen ausüben können. Sollte das Tumormilieu inhibitorisch auf infiltrierende Effektor-T-Zellen ( $T_{EFF}$ -Zellen) wirken, würde es nicht nur die natürliche Tumorantwort dämpfen, sondern auch Erfolge der adoptiven T-Zell-Therapie mindern. In dieser Arbeit wurden verschiedene In-vitro-Modelle genutzt, um die durch das Tumormilieu induzierten Funktionsdefizite der  $T_{EFF}$ -Zellen zu charakterisieren und die inhibitorischen Faktoren des Tumormilieus zu identifizieren. Es wurde gezeigt, dass das Tumormilieu die T-Zell-Rezeptor (TZR)-stimulierte Produktion des  $IFN\gamma$  inhibierte und die Exozytose lytischer Granula reduzierte. Die Inhibition der Zytokinproduktion erfolgte hauptsächlich durch tumorproduzierte Faktoren in Kombination mit extrazellulärer Azidose und war weniger von Zell-Zell-Interaktionen getrieben. Dagegen erfolgte die Reduktion der Degranulation im Wesentlichen durch  $T_{EFF}$ -Zell-Tumorzell-Interaktionen und weniger durch das zellfreie Tumormilieu (zTM). Die Inhibitionskapazität des zTM war von der Tumorzelldichte, welche zu dessen Generierung verwendet wurde, abhängig. Die Inhibition trat sehr schnell ein und bedurfte keiner vorherigen Inkubation der  $T_{EFF}$ -Zellen im Tumormilieu. Das Inhibitionspotential des zTM war direkt proportional zur gemessenen Laktatkonzentration und indirekt proportional zum pH-Wert. Durch Zugabe von Milchsäure zu normalem Medium („Milchsäure-Medium“) wurde auch dieses inhibitorisch und induzierte dieselben Defizite wie die zTM mit vergleichbaren Laktatkonzentrationen. Damit wurde Laktat als kausale Ursache für die inhibitorische Aktivität des zTM identifiziert. Diese war nur in Kombination mit saurem pH-Wert wirksam: So zeigte Natriumlaktat supplementiertes Medium („Natriumlaktat-Medium“) mit neutralem pH keine inhibitorische Wirkung und auch saures „Milchsäure-Medium“ bzw. zTM war nach Neutralisation kaum inhibitorisch.

Nicht nur T-Zell-Klone, sondern auch TZR-transduzierte T-Zellen, wie sie für die adoptive T-Zell-Therapie eingesetzt werden, wurden durch das zTM sowie durch „Milchsäure-Medium“ inhibiert. T-Zellen mit einem hoch-aviden TZR konnten dem negativen Einfluss etwas besser widerstehen als T-Zellen mit einem niedrig-aviden TZR. Als Mechanismus der Inhibition wurde die

spezifische Suppression bestimmter Komponenten der TZR-Signalkaskade identifiziert. Es stellte sich heraus, dass bei Stimulation der T<sub>EFF</sub>-Zellen in zTM und in „Milchsäure-Medium“ die Phosphorylierung der MAPK JNK und p38 sowie des distalen Transkriptionsfaktors c-Jun inhibiert war, und möglicherweise auch die Phosphorylierung von GSK3 eingeschränkt war. Die Phosphorylierung von MEK1, ERK1/2 und AKT war nicht beeinflusst. Nach Entfernung des inhibitorischen Milieus war die Inhibition der Phosphorylierung der Signalmoleküle sowie der T-Zell-Funktion aufgehoben. Eine langfristige Kultur der T-Zellen über 40 Stunden im Tumormilieu führte zu einem Verlust von Perforin und Granzym B, welcher mit einem Verlust der Zytotoxizität der T-Zellen einherging. Der Verlust von Perforin und der Zytotoxizität war unabhängig von Zell-Zell-Interaktionen, während Granzym B nur dann reduziert war, wenn die T<sub>EFF</sub>-Zellen in Kontakt mit Tumorzellen kultiviert wurden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem in der Tumorabwehr

Das Immunsystem ist für das Überleben unabdingbar, da es den Menschen vor Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten schützt. Aber nicht nur Pathogene, die den Körper von außen angreifen, sondern auch körpereigene Zellen können eine Gefahr darstellen, wenn diese krankhaft verändert sind, so wie es beispielsweise bei der Tumorentstehung geschieht. 1909 postulierte Paul Ehrlich, dass die Tumorzinzidenz größer wäre, wenn das Immunsystem entstehende Tumorzellen nicht identifizieren und eliminieren würde (Ehrlich, 1909). Das Immunsystem ist im Kampf gegen Tumoren jedoch weit weniger effizient als im Kampf gegen Pathogene. Trotz Immunabwehr können sich Tumoren manifestieren. Es gibt verschiedene Immunevasionsmechanismen des Tumors, die noch im Detail diskutiert werden.

Zunächst soll jedoch auf die verschiedenen Komponenten des Immunsystems eingegangen werden. Das Immunsystem besteht aus einem komplizierten Netzwerk aus Organen, Zellen und Molekülen. Das zelluläre Immunsystem lässt sich in angeborene und erworbene (adaptive) Immunantwort einteilen. Komponenten der angeborenen Immunität werden innerhalb der ersten vier Stunden nach Infektion aktiviert. Die Erkennung der Pathogene erfolgt dabei unselektiv. Komponenten des angeborenen Immunsystems sind Dendritische Zellen (DZ), Makrophagen, Granulozyten (Neutrophile, Basophile, Eosinophile), Mastzellen, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und das Komplementsystem. Die Erkennung der Pathogene erfolgt über spezielle Rezeptoren, die sogenannten „pattern-recognition-receptors“ (PRR), die bestimmte pathogene Strukturen, die „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP), erkennen. Daneben sezernieren die Zellen des angeborenen Immunsystems bei Aktivierung verschiedene Chemokine und Zytokine, mit denen andere Zellen des Immunsystems angelockt und aktiviert werden.

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind B- (generiert im Bone Marrow = Knochenmark) und T-Lymphozyten (generiert im Thymus). Es unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem dadurch, dass Zellen

des adaptiven Immunsystems Rezeptoren tragen, welche spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind.

T-Lymphozyten (auch T-Zellen) tragen einen T-Zell-Rezeptor (TZR), welchen sie durch Gensegmentumlagerung generieren, wodurch jeder TZR einzigartig ist. Mit diesem ausgestattet, wandern die T-Zellen als „naive“ T-Lymphozyten durch die Lymphknoten, in welchen sie Antigene, im Regelfall im Komplex mit einem MHC-Molekül (Major Histocompatibility Complex; deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex), durch eine DZ präsentiert bekommen.  $CD4^+$  T-Helferzellen (auch  $CD4^+$  T-Zellen) erkennen MHC-Klasse-II-Moleküle in Kombination mit einem Antigen, welche nur von professionell antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert werden. Es sind mehrere Subpopulationen der  $CD4^+$  T-Zellen beschrieben (Wan und Flavell, 2009). Abhängig vom Zytokinmilieu und der Stärke der Bindung von MHC/Peptid-TZR entstehen  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H3$ ,  $T_H17$ , oder regulatorische T-Zellen.  $CD4^+$  T-Zellen sezernieren Zytokine, wie Interferon $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), zur Immunstimulation oder TGF- $\beta$ , welches im Allgemeinen inhibitorisch wirkt.  $CD8^+$  T-Zellen (auch zytotoxische T-Zelle, ZTL) erkennen Antigene, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Erkennt die T-Zelle ihren zum TZR passenden TZR-Liganden ( $TZR-L^+$ ), so wird die Interaktion über eine interne Signalkaskade in das Zellinnere vermittelt und je nach Typ der T-Zelle und dem umgebenden Milieu wird eine spezifische Effektorfunktion ausgelöst. Die Spezialisierung der T-Zellen ermöglicht eine auf die jeweilige Infektion angepasste Immunantwort.

### **2.1.1 Effektorfunktionen zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen**

ZTL können proinflammatorische Zytokine ausschütten, z.B.  $IFN\gamma$ , welches die MHC-Expression hoch reguliert, sowie die Aktivität von Makrophagen und NK-Zellen fördert (Martini et al., 2010). Gleichzeitig wird die Zielzelle durch die ZTL in die Apoptose geführt. Dies kann zum einen durch die Interaktion des Todesrezeptors Fas auf der Zielzelle mit dem Fas Liganden auf der ZTL induziert werden, zum anderen durch die gerichtete Exozytose von zytotoxischen Granula in die immunologische Synapse. Bei der Exozytose werden Granzyme und Perforin ausgeschüttet, welche nach Eindringen in die Zielzelle Apoptose induzieren. Experimente zeigen, dass Perforin das

Eindringen der Granzyme in die Zielzelle vermittelt, indem es Löcher in der Zellmembran erzeugt (Fan und Zhang, 2005; Law et al., 2010). Andere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die in vitro beobachtete Porenbildung in der Zellmembran in vivo bei physiologischen Konzentrationen des Perforins nicht stattfindet. Stattdessen wurde gezeigt, dass Perforin und Granzym B über Endozytose in die Zielzelle gelangen. Perforin verändert die Membran der Endosomen, so dass die Granzyme in das Zytosol der Zielzelle gelangen und dort über eine Signalkaskade Apoptose induzieren können (Rousalova und Krepela, 2010).

Perforin und Granzyme werden in den T-Zellen in zytotoxischen Granula gespeichert. Werden die Granula ausgeschüttet, so verschmilzt die Membran des Granulums mit der Zellmembran, wodurch die lysosomalen Membranglykoproteine CD107a und CD107b (auch LAMP1 und LAMP2) an die Oberfläche gelangen und dort mit Hilfe von Antikörpern abgegriffen werden können. So ist es möglich die Exozytose der Granula durchflusszytometrisch zu ermitteln (Betts und Koup, 2004).

### **2.1.2 Signaltransduktion in T-Zellen**

Erkennt ein TZR seinen spezifischen Liganden, so werden Signalkaskaden initiiert, die zur Ausführung der Effektorfunktionen führen. Eine vereinfachte Darstellung der Signalkaskade ist in Abbildung 2-1 dargestellt. Der TZR verfügt selbst über keine intrazelluläre Signaldomäne. Die Signalinitiierung erfolgt über den CD3-Komplex, der mit dem TZR assoziiert ist. Der CD3-Komplex setzt sich aus sechs Ketten (zwei  $\epsilon$ , eine  $\delta$ , eine  $\gamma$ , zwei  $\zeta$ ) zusammen. Die  $\zeta$ -Ketten enthalten in ihrer intrazellulären Domäne ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), welche für die Signaltransduktion essentiell sind. Des Weiteren spielen die Korezeptoren CD4 bzw. CD8, welche an die MHC-Moleküle binden, eine wichtige Rolle in der Signalvermittlung, indem sie mit dem TZR interagieren und dabei die gebundenen Kinasen Lck und Fyn an den TZR-CD3 Komplex heranführen und die ITAM der CD3 $\zeta$ -Ketten phosphorylieren. Die Aktivierung der Src-Kinasen Lck und Fyn erfolgt davor durch die Proteintyrosinphosphatase CD45. Sind die ITAM der CD3 $\zeta$ -Ketten phosphoryliert, so wird ZAP70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) über die Bindung seiner zwei Src-

Homologie-2(SH2)-Domänen an die Phosphotyrosine der ITAM rekrutiert und ebenfalls durch Lck phosphoryliert. Es folgt die Aktivierung des Transmembranproteins LAT (Linker aktivierter T-Zellen), welches über SH2-Domänen das Signal an distale Signalproteine weiterleitet. LAT spielt eine zentrale Rolle als Schaltstelle, von welcher verschiedene Signalwege abzweigen. Zum einen wird die PLC (Phospholipase C) aktiviert. Zum anderen können kleine G-Proteine aktiviert werden. PLC katalysiert die Hydrolyse des Phospholipids, Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), wodurch die Botenstoffe Diacetylglycerol (DAG) und Inositol-3-Phosphat (IP<sub>3</sub>) entstehen. IP<sub>3</sub> führt zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Kalzium im Komplex mit Calmodulin führt zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, welche den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) dephosphoryliert und somit dessen Translokation in den Zellkern erlaubt. NFAT wird durch GSK3 (Glykogensynthase 3) phosphoryliert und dadurch aus dem Zellkern heraus transportiert. NFAT initiiert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (activating protein 1) die Transkription verschiedener Zytokine. DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum über die PI3K (PI3-Kinase) und AKT den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt über die Phosphorylierung und anschließende Degradierung von IκB (inhibitor of kappa B) und ermöglicht damit die Translokation von NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) in den Zellkern. AKT phosphoryliert und inhibiert GSK3 und verhindert somit den Transport von NFAT aus dem Zellkern.

Über LAT werden kleine G-Proteine, wie Ras und Rac, rekrutiert, wodurch Signalkaskaden aktiviert werden, welche über mehrere MAP-Kinasen (Mitogen-activated protein kinase) verlaufen. Drei Beispiele dieser MAP-Kinasen sind JNK (c-Jun N-terminal Kinase), p38 und ERK (extracellular-regulated kinase-1). JNK und p38 aktivieren über c-Jun und c-Fos den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher die Produktion verschiedener Zytokine initiiert (Samten et al., 2008). ERK kann in den Zellkern translozieren und dort Transkriptionsfaktoren phosphorylierung und ist außerdem an der Auslösung der Degranulation beteiligt (Berg et al., 1998; Puente et al., 2006).

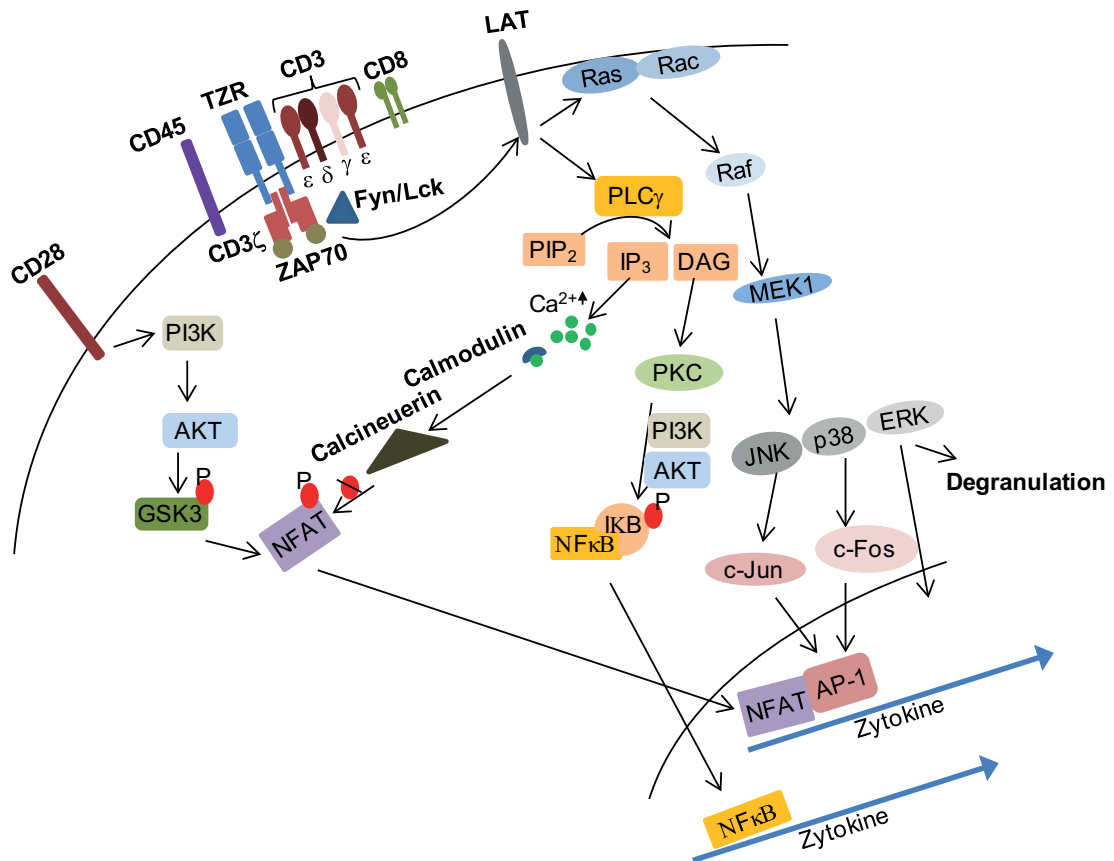


Abbildung 2-1: Vereinfachte schematische Darstellung der Signalkaskade vom TZR einer CD8<sup>+</sup> T-Zelle (Beschreibung siehe Text)

## 2.2

### 2.3 Die Immunreaktion im Tumormilieu

1951 wurde erstmals gezeigt, dass in Mäuse transplantierte Tumoren abgestoßen wurden (Snell, 1952). Später wurde diese Beobachtung allerdings darauf zurückgeführt, dass es sich bei dem Tumor um ein fremdartiges Gewebe handelte. Die Abstoßung war nicht spezifisch für den Tumor, sondern es handelte sich hierbei um eine Transplantatabstoßung, welche durch die Expression allogener MHC-Moleküle zustande kommt. 1991 wurde erstmals ein tumorspezifisches Antigen charakterisiert, welches von ZTL eines Melanompatienten erkannt wurde (van der Bruggen et al., 1991). Dieser Fund war der Beweis, dass Tumoren doch Zielstrukturen exprimieren, welche vom Immunsystem erkannt werden können.

Histologische Befunde an humanen Tumorproben zeigen, dass Tumoren in der Regel von Immunzellen infiltriert sind und sich im Infiltrat auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen befinden, die TZR besitzen, welche Tumorantigen erkennen können



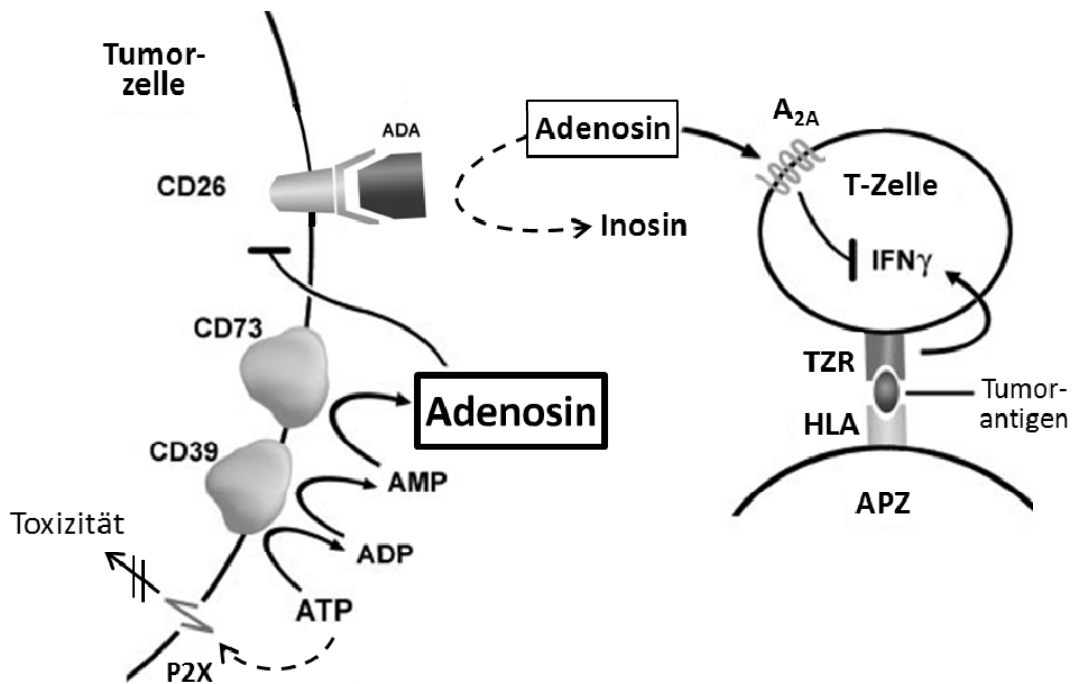
(Saito et al., 1988; Boon et al., 1994; Rosenberg, 1996; Balkwill und Mantovani, 2001; Parmiani, 2005; Prinz et al., 2012). Trotzdem kommt es zur Tumorentstehung. Wurden die Immunzellen aus dem Tumor isoliert und in vitro auf zytotoxische Funktion getestet, so zeigten sie bei Stimulation über den TZR erst dann Funktion, wenn sie über eine gewisse Zeit in vitro mit IL-2 kultiviert wurden. Dies ließ vermuten, dass das Tumormilieu einen supprimierenden Einfluss hatte. Mehrere Befunde aus Maus-Tumormodellen bestärken diese Vermutung. So waren beispielsweise T-Zellen, welche den gleichen TZR exprimieren, funktionell, wenn diese aus der peripheren Zirkulation isoliert wurden. Wurden sie jedoch aus dem Tumorgewebe isoliert, so wiesen sie funktionelle Inhibitionen auf (Zippelius et al., 2004). Verschiedene Mausmodelle zeigten ferner, dass die Größe des Tumors bei der Inhibition der T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt (Hanson et al., 2000; Blohm et al., 2002; Anderson et al., 2007; Imai et al., 2009).

Mittlerweile sind verschiedenste „Escape“-Mechanismen bekannt, welche der Tumor nutzt, um der Zerstörung durch das Immunsystem zu entkommen (Zou, 2005; Gajewski et al., 2006; Kroemer und Pouyssegur, 2008). Tumorzellen können MHC-Moleküle und/oder Antigene herunter regulieren und somit der Erkennung durch T-Zellen entkommen. Zusätzlich können Tumoren inhibitorische Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-10 und VEGF sezernieren (Taga und Tosato, 1992; Zou, 2005; Gajewski et al., 2006; Jarnicki et al., 2006; Rabinovich et al., 2007; Wahl, 2007; Terman, 2011). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass viele Tumoren Galektine exprimieren, welche ein Netzwerk aus Glykoproteinen auf der Zelloberfläche bilden, wodurch es zur Dissoziation des TZR vom Korezeptor CD4 bzw. CD8 kommt (Barrow et al., 2011). All diese Faktoren liefern den Tumorzellen Überlebensvorteile, sei es durch die Förderung der Proliferation oder aber durch die Inhibition von infiltrierenden Immunzellen (Mantovani et al., 2008).

Ein weiterer in vielen Tumoren erhöhter Faktor istIDO (Indoleamine 2, 3-Dioxygenase) (Uyttenhove et al., 2003; Gajewski et al., 2006; Riesenberget al., 2007). Es handelt sich hierbei um eine Oxidoreduktase, welche den Abbau von Tryptophan über L-Formylkynurenin zu Kynurenin katalysiert. Die Folge sind Tryptophanmangel und erhöhte Kynureninkonzentrationen. Tryptophanmangel führt in T-Zellen zum Zellzyklusarrest und Kynurenin kann Apoptose induzieren (Fallarino et al., 2002).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Tumorzellen Mikrovesikel, sogenannte Exosomen, sezernieren (Taylor und Gercel-Taylor, 2005). Sie können immunosuppressiv wirken, indem sie beispielsweise den apoptoseinduzierenden Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen, oder aber Monozyten in ihrer Entwicklung zu DZ stören (Huber et al., 2008). Es wurde auch gezeigt, dass Exosomen durch die Expression der Ecto-Enzyme CD39 und CD73 zur Akkumulation von Adenosin im Tumormilieu beitragen (Clayton et al., 2011).

Im Tumor herrscht oftmals Sauerstoffmangel als Folge unzureichender Durchblutung (Vaupel et al., 1989; 2007). Eine Folge der Hypoxie ist die Hochregulation von HIF1 $\alpha$  (engl. Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ), ein Transkriptionsfaktor für über 200 Gene (Giaccia et al., 2004). HIF1 $\alpha$  induziert auch die Expression der Ecto-Enzyme CD39 und CD73, welche den Abbau von ATP zu Adenosin vermitteln (Synnestvedt et al., 2002). Mit Konzentrationen von 0,2  $\mu$ M - 2,4  $\mu$ M in murinen Tumoren ist Adenosin um das 10- bis 20-fache höher als in dem das Karzinom umgebenden gesunden Gewebe (Blay et al., 1997). Hoskin et al. konnten sogar Konzentrationen von mehr als 300  $\mu$ M in großen Tumoren in Mausmodellen nachweisen (Hoskin et al., 1994). Diese erhöhte Adenosinkonzentration im Tumormilieu ist nicht nur die Folge der gesteigerten Expression der Ecto-Enzyme CD39 und CD73 auf Tumorzellen, sondern auch auf den verminderten Abbau von Adenosin zu Inosin zurückzuführen. Dieser Abbau wird durch die Adenosindeaminase katalysiert. In normalem Gewebe bindet CD26 die lösliche Adenosindeaminase. Im Tumor wird CD26 allerdings herunter reguliert, wodurch Adenosin nicht abgebaut wird und es zur Akkumulation im Tumormilieu kommt (siehe Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2: Generierung von Adenosin im Tumormilieu und Implikationen für T-Zellen**

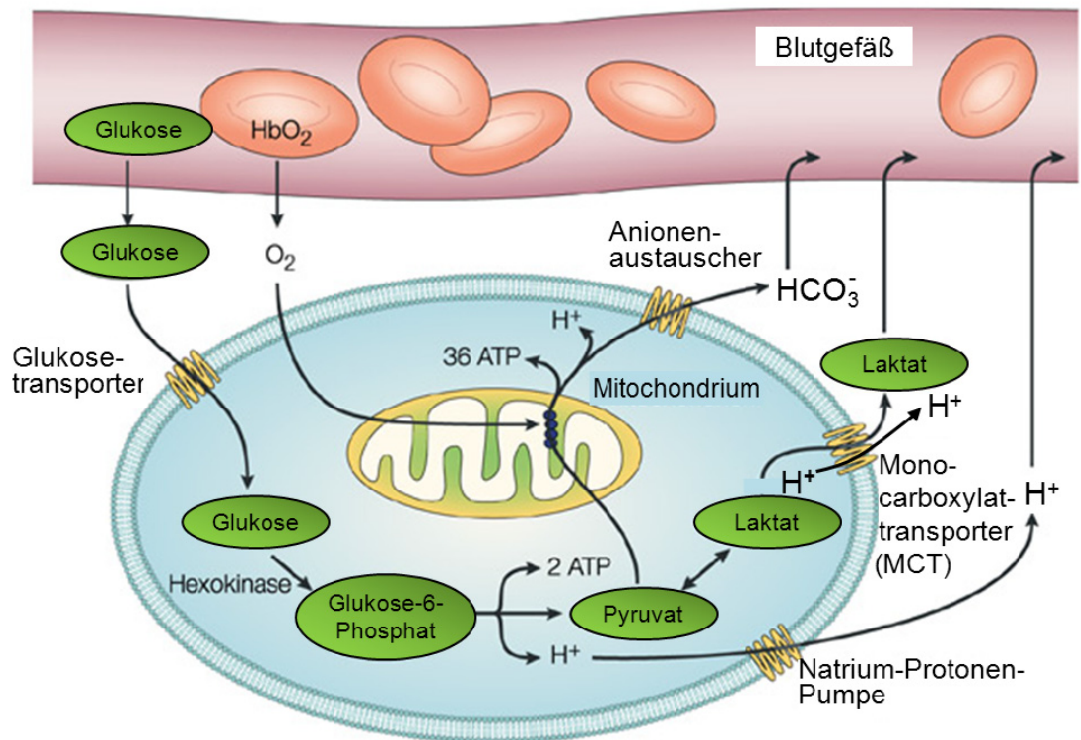
Die Expression der Ecto-Enzyme CD39 und CD73 führt zum Abbau von ATP zu Adenosin. ATP wirkt toxisch, indem es über die Bindung an P2X-Kanäle zu deren Öffnung führt und eine Depolarisierung der Zellmembran bewirkt. Adenosin wird über den Rezeptor  $A_{2A}$  von T-Zellen aufgenommen und unterdrückt TZR-vermittelte Signale wodurch die T-Zell-Funktion inhibiert wird. Der Adenosinspiegel wird im normalen Gewebe durch die Ecto-Adenosindeaminase (ADA) niedrig gehalten. ADA wird über CD26 gebunden und baut Adenosin zu Inosin ab. Allerdings ist CD26 in vielen Tumoren herunter reguliert, was eine Akkumulation von Adenosin zur Folge hat. Abbildung modifiziert nach Linden, 2006.

Adenosin wirkt inhibitorisch auf T-Zellen, indem es die Proliferation, die Produktion von IL-2,  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$ , die Hochregulation von CD25, die Expression von Perforin und Fas-Ligand, die Adhäsion an Tumorzellen und die Exozytose inhibieren kann (Huang et al., 1997; Hoskin et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Adenosinrezeptoren auf adoptiv transferierten T-Zellen in Mausmodellen die Tumorabstoßung signifikant verbesserte, was für eine inhibitorische Rolle des Adenosins im Tumormilieu spricht (Ohta et al., 2006).

ATP wirkt durch die Aktivierung der P2X-Rezeptoren toxisch. P2X-Rezeptoren sind kationenpermeable Ionenkanäle, welche sich durch die Bindung von ATP öffnen, wodurch Kationen wie  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  in die Zelle eindringen und zu einer Depolarisation der Membran führen. Durch den

Abbau von ATP zu Adenosin schützen sich Tumorzellen also nicht nur vor der Zerstörung durch das Immunsystem, sondern auch vor der toxischen Wirkung des ATPs (Linden, 2006).

HIF1 $\alpha$  reguliert auch die Expression von Genen, die für die anaerobe Atmung benötigt werden (Giaccia et al., 2004; Matsumoto et al., 2010). Obwohl im Tumor oftmals Sauerstoffmangel herrscht, beobachtete Otto Warburg bereits 1924, dass Tumorzellen, trotz der Anwesenheit von Sauerstoff, ihre Energie durch Glykolyse anstelle der oxidativen Phosphorylierung generieren (Warburg, 1924; Gatenby und Gillies, 2004). Das Endprodukt der Glykolyse ist Pyruvat, welches zu Milchsäure reduziert wird. Milchsäure wird im wässrigen Milieu deprotoniert, wodurch das Säureanion Laktat und H<sup>+</sup>-Ionen entstehen. Unter physiologischem pH liegt mehr als 99 % der Milchsäure im unprotoniertem Zustand als Laktat vor (Roth und Brooks, 1990; Lane et al., 2009). Monocarboxylattransporter (MCT) transportieren Monocarboxylate, wie Laktat und Pyruvat zusammen mit Protonen in einer Stöchiometrie von 1:1 über die Zellmembran, was zu einer Azidifikation des Milieus führt (siehe Abbildung 2-3). Der Transport ist ATP unabhängig und kann je nach Konzentrationsgefälle der Wasserstoffionen in beide Richtungen erfolgen (Garcia et al., 1994; Juel, 1996; Halestrap und Price, 1999; Pierre und Pellerin, 2005). Dadurch kommt es nicht nur zu einer Akkumulation des Laktats im Tumormilieu, sondern auch zu einer Azidifizierung. In soliden Tumoren werden Konzentrationen bis zu 40 mM Laktat gemessen (Walenta et al., 2000).



Nature Reviews | Cancer

**Abbildung 2-3: Oxydative Phosphorylierung und (an-) aerobe Glykolyse**

Glukose wird über Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen und über Pyruvat zu Milchsäure verstoffwechselt (Glykolyse). Dabei werden 2 ATP gebildet. Laktat wird über die Monocarboxylattransporter (MCT) von der Zelle abgegeben. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird Pyruvat in den Mitochondrien zu H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> oxidiert, was als HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> abgegeben wird. Bei der oxidativen Phosphorylierung entstehen pro Glukose-Molekül 38 Moleküle ATP. Protonen werden über die Natrium-Protonen-Pumpe sowie über den MCT-Transporter aus der Zelle transportiert. Abbildung modifiziert nach Gatenby und Gillies, 2004.

Es gibt auch weitere H<sup>+</sup>-Iontentransporter, wie die H<sup>+</sup>-ATPasen und die Natrium-Protonen-Pumpen, welche unabhängig von Milchsäure zur Azidifizierung des extrazellulären Milieus beitragen (Webb et al., 2011). In Tumoren werden extrazelluläre pH-Werte zwischen 6,15 und 7,4 gemessen, welche damit deutlich saurer als Normalgewebe sind (pH 7,0 - 7,4) (Vaupel et al., 1989). Der saure pH-Wert im Milieu stellt einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen dar, da in normalen Zellen durch den Zusammenbruch des transmembranen Protonengradienten Apoptose induziert wird. Zusätzlich wird durch die Abgabe von Cathepsin B und anderen proteolytischen Enzymen die Degradation der extrazellulären Matrix und damit die Metastasierung gefördert (Gatenby et al., 2006; Robey et al., 2009).

Verschiedene Zellen des Immunsystems werden durch das saure laktathaltige Milieu verändert, wodurch der Tumor vor deren Angriff geschützt ist. DZ produzieren in Anwesenheit von Laktat und einem sauren Milieu weniger IL-12 und TNF $\alpha$  und sind in ihrer Antigenpräsentation eingeschränkt (Gottfried et al., 2006; Dietl et al., 2010). Aktivierte T-Zellen schalten ihren Metabolismus ebenfalls von der aeroben Phosphorylierung auf die Glykolyse um (Frauwirth und Thompson, 2004). So steigt die Glukoseaufnahme innerhalb der ersten Stunde nach Stimulation um das 20-fache an. 85 % der aufgenommenen Glukose wird zu Milchsäure verstoffwechselt und von der Zelle abgegeben (Fox et al., 2005). Da der Transport des Laktats protonenabhängig ist, können aktivierte T-Zellen das Laktat in einem extrazellulären sauren Milieu nicht sezernieren, wodurch es zu einem intrazellulären Anstieg der Laktatkonzentration kommt. Die intrazelluläre Akkumulation wird durch eine hohe extrazelluläre Laktatkonzentration verstärkt und führt zu einer Blockade der Glykolyse (Fischer et al., 2007). Daher werden aktivierte T-Zellen durch ein laktathaltiges saures Milieu funktionell inhibiert (Cham und Gajewski, 2005; 2008).

Der Tumor produziert nicht nur inhibitorische Faktoren, durch den hohen Metabolismus und die unzureichende Blutversorgung kommt es auch zu einem Mangel an Nährstoffen. Es wurde gezeigt, dass der Mangel an Glukose und Aminosäuren die T-Zell-Aktivierung und -Funktion inhibieren sowie zum Zellzykelarrest führen kann. (Fallarino et al., 2002; Cham und Gajewski, 2005; Cham et al., 2008; Rodriguez et al., 2010; Srivastava et al., 2010).

### **2.4 Tumorthherapie**

Die operative Entfernung bei lokal abgegrenzten Tumoren hat die besten Therapieerfolge. Oft wird die Diagnose jedoch spät gestellt, der Tumor ist bereits invasiv und/oder es haben sich Metastasen an verschiedenen Orten im Körper ausgebildet, so dass eine vollständige Entfernung nicht mehr möglich ist. Standardtherapien bei nicht resektablen Tumoren sind die Chemotherapie und die Bestrahlung des Tumors. Zudem werden Strategien verfolgt, welche versuchen, das Immunsystem für die Bekämpfung des Tumors zu nutzen. Dazu gehört die Gabe von Zytokinen (IL-2, IFN $\alpha$ , etc.), gegen Tumorantigene gerichteten Antikörpern oder tumorreaktiven T-Zellen.

Antikörper können auf verschiedenste Weisen in der Tumorbekämpfung wirken: Sie können Zell- oder Komplement-vermittelte Lyse induzieren oder bei Kopplung an Agenzien, diese spezifisch zum Tumor transportieren (Oldham und Dillman, 2008).

### **2.5 Adoptiver T-Zell-Transfer**

Beim adoptiven T-Zell-Transfer (ATT) werden dem Patienten T-Zellen infundiert, die den Tumor angreifen sollen. Solche Therapien wurden bereits in den 80er Jahren von Rosenberg durchgeführt (Rosenberg, 1984). Dazu wurden patienteneigene periphere Blutlymphozyten mit hohen Dosen an IL-2 aktiviert. In diesen ersten Therapieansätzen wurden nur geringe Erfolge erzielt. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass nur wenige der infundierten T-Zellen tumorreaktiv waren, womit die geringen Erfolgsquoten erklärt werden können. In späteren Therapieansätzen wurden Tumorfiltrierende Lymphozyten (TIL) eingesetzt, welche ex vivo auf Tumorspezifität getestet worden waren (Dudley et al., 2002). Mit diesen selektierten TIL konnten v.a. bei Patienten mit Melanomen gute Erfolge erzielt werden (Rosenberg et al., 2008). Dennoch kommt es nicht bei allen Patienten zum Tumorrückgang und nur bei wenigen erzielt die Therapie langanhaltende Tumorkontrolle. Verschiedenste Beobachtungen können die geringe Effektivität der transferierten T-Zellen erklären, wie kurzes Überleben der adoptiv transferierten T-Zellen im Patienten, Funktionsverlust der T-Zellen im Tumormilieu und schlechte Migration der T-Zellen zum Tumor (Fisher et al., 1989; Dudley et al., 2001; Ngo et al., 2011).

### 3 Aufgabenstellung

In der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Nößner am Institut für Molekulare Immunologie am Helmholtz Zentrum München werden die Tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) am Modell des Nierenzellkarzinoms untersucht, um Ursachen zu identifizieren, warum Tumoren trotz Infiltration mit T-Zellen nicht abgestoßen werden. Das humane Nierenzellkarzinom dient als Modellsystem, weil es in der Regel stark von Lymphozyten infiltriert wird, aber trotzdem keine Abstoßung stattfindet. Untersuchungen des Tumorgewebes mittels Immunhistologie und Analysen von aus Tumorgewebe isolierten TIL zeigten, dass TIL weniger Perforin-positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen enthalten und Defizite in der lytischen Granulaexozytose, der Zytotoxizität und der Zytokinproduktion aufweisen. Wurden die Lymphozyten für eine gewisse Zeit außerhalb des Tumormilieus kultiviert, so konnten sie Tumorzellen lysieren und IFN $\gamma$  produzieren. Weil sich die Funktion der TIL außerhalb des Tumormilieus verbesserte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Tumormilieu einen negativen Einfluss auf die TIL ausübt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand verschiedener In-vitro-Modelle das Tumormilieu nachgestellt und dessen Einfluss auf Effektor-T-Zellen untersucht werden. Durch eine schrittweise Vereinfachung der Modelle sollten Faktoren, welche die beobachteten Defizite der T-Zellen auslösten, identifiziert werden. Ferner sollten die Mechanismen der Inhibition aufgeklärt und Maßnahmen entwickelt werden, um die Inhibition zu verhindern oder zu revertieren.



## 4 Material

### 4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Beckman Counter (LS5000TA)	Beckman Coulter, Krefeld
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: 137 Cäsium)	GammaCell 40, Ottawa, Kanada
Bioplex System	Bio-Rad, München
Bioplex-Array-Reader	Bio-Rad, München
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus Instruments, Hanau
Deckgläschen	IDL, Nidderau
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
ELISA reader <i>sunshine</i>	Tecan, Crailsheim
Elektrode (Ultra Micro M)	Lazar, Los Angeles, UDA
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskope (Leica DMLS)	Leica Microsystems, Heidelberg
Mehrkanalpipette	Dunn Labortechnik, Asbach
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
TopCount NXT (Microplate Scintillation)	Canberra Packard, Dreieich
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
pH-Meter (Model 60)	Jenco, San Diego, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Rührer (Ika Labortechnik)	Fröbel Labortechnik, Lindau
Sterilbank	BDK, Sonnenbrühl- Genkingen
Stickstofftank Messer	Griesheim, Krefeld
Spektrophotometer Sunrise	Tekan, Männedorf, Schweiz
Schüttler (Ika Schüttler MTS4)	Fröbel Labortechnik, Lindau
Vakuumpumpe	Bio-Rad, München

## Material

Vortexer	NeoLab, Heidelberg/ VWR, Darmstadt
Wasserbad	Julabo, Seelbach/ Köttermann Labortechnik, Uetze
Waage PC 440	Mettler, Gießen
<b>Zentrifugen:</b>	
Megafuge 2.0R	Thermo scientific, Heraeus Instruments, Hanau
Rotanta 460 R (S2-Arbeiten)	Hettich, Tuttlingen
Eppendorfszentrifuge (Galaxy) Ministar	VWR, Darmstadt
Ultrazentrifuge (TL-100 Ultrazentrifuge)	Beckman Coulter, Krefeld

### 4.2 Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
5 ml Spritzen (für Multistepper)	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einfrierröhrchen (1,5 ml)	Nunc, Wiesbaden
Luma PlattenTM96	Canberra, Packard, Dreieich
Mehrloch-Platten (6-, 12-, 24-Loch)	Becton Dickinson (BD), Heidelberg/Nunc, Wiesbaden /TPP, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
Polypropylen Röhrchen (1,5 ml) (FACS- Röhrchen)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polypropylen Röhrchen (5 ml mit Deckel)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reagenzröhrchen (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

## Material

Rundbodenplatten (96-Loch)	PAA Laboratories, Cölbe
Spritzen (50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfiltrationseinheiten	Millipore, Schwalbach
Transwell 24-Loch-Platten, Porengröße 0,4 µm	Costar, Corning (USA)
Zellkulturflaschen (25/75/175 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsieb Cellstrainer, 100 µM	Biosciences, Heidelberg

### 4.3 Reagenzien

#### 4.3.1 Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ficoll (Pancoll, Dichte 1,077 g/ml)	Pan Biotech, Aidenbach
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin 25000 IE	Essex Pharma, München
Hepes	Invitrogen, Karlsruhe
Humanes Serum (HS)	Gemisch gesunder Spender; IMI eigene Herstellung
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen, Karlsruhe
MEM (nicht essentielle Aminosäuren) 100 x	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat 100 mM	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 100 x	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe

Rekombinantes humanes IL-2 (Proleukin)	Cancernova GmbH, Reute
Rekombinantes humanes IL-15	PromoCell GmbH, Heidelberg
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe

#### 4.3.2 Sonstige Reagenzien

Produkt	Hersteller
4-(Dimethylamino)-benzaldehyd (Ehrlich Reagenz)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
7-Aminoactinomycin D	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen
CompBeads (anti Maus IgG, κ)	BD Biosciences, Heidelberg
<sup>51</sup> Cr Natriumchromat (5 mCi/ml)	Hartmann Analytic
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ionomyzin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kynurenin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Milchsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Monensin (Golgi-Stop)	Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumazid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumlaktat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phosphorsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PKH26	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Saponin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tyrosinase-Peptid (YMDGTMSQV)	Metabion, Martinsried
Trypanblau ICN	Biomedicals GmbH

### **4.3.3 Medien**

#### CML-Medium (für den Chromfreisetzungstest)

RPMI-Basis-Medium

15 % FKS

#### Einfrier-Medium (für eukaryotische Zellen)

RPMI-Basis-Medium

20 % DMSO

#### HEK293T-Medium

DMEM (4,5 g/L Glukose)

2 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

1 mM nicht essentielle Aminosäuren

12 % FKS

#### LCL-Medium

RPMI-Basis-Medium

10 % FKS

#### RCC-Medium

RPMI-Basis-Medium

12 % FKS

#### RPMI-Basis-Medium

RPMI 1640 (GibcoBRL)

2 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

1 mM nicht essentielle Aminosäuren

#### Transduktionsmedium

RPMI-Basis-Medium

10 % FKS

10 mM HEPES

100 IE/ml Penicillin, Streptomycin

T-Zell-Medium (bezeichnet als Medium)

RPMI-Basis-Medium

7,5 % FKS

7,5 % HS

**4.3.4 Puffer und Lösungen**

2 x HBSS

1,6 g NaCl

74 mg KCl

50 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1 g Hepes

Ad 100 ml H<sub>2</sub>O

Mit NaOH auf pH 6,76 einstellen

steril filtrieren

FACS-Puffer

1 % FKS

2 mM EDTA

0,1 % Natriumazid in PBS

Lysepuffer

Cell lysis buffer, factor 1 (250x) (Phosphoplex, Bio-Rad)

Cell lysis buffer, factor 2 (500x) (Phosphoplex, Bio-Rad)

2 mM PMSF

Paraformaldehydlösung

1 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS

Saponinlösung

0,1 % bzw. 0,35 % Saponin in PBS

#### 4.4 Testkits

Kit	Hersteller
BCA Proteinassay	Thermo Fisher Scientific Inc.; Rockford, USA
Gesamtprotein-Multiplex	Bio-Rad; München
Phosphoprotein-Multiplex	Bio-Rad; München
TGF- $\beta$ ELISA	ebioscience; San Diego, USA
Zytokin-Multiplex	Bio-Rad; München

#### 4.5 Zelllinien

Zellen	Charakteristika	Medium	Herkunft
<b>786-0</b>	humane Nierenzellkarzinomzell- linie, HLA-A2-negativ	RCC-Medium	ATCC (CRL- 1932)
<b>A498</b>	humane Nierenzellkarzinomzell- linie, HLA-A2-positiv	RCC-Medium	ATCC (HTB 44)
<b>A673</b>	Rhabdomyosarkomzell- line	RCC-Medium	P. J. Nelson (München)
<b>B-LCL-LAZ388</b>	Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie	LCL-Medium	Mackensen, A. (Erlangen)
<b>HBMEC</b>	Zelllinie aus mikro- vaskulären Endothel- Zellen des hum. Gehirns	RCC-Medium	S. Grau (München)
<b>HEK293T</b>	Humane embryonale Nierenzelllinie SV40LT transformiert	HEK293T- Medium	H. Engelmann (Berlin)
<b>HeLa</b>	Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	RCC-Medium	Prof. Kolb (München)

## Material

<b>KT195</b>	humane Nierenzellkarzinomzell- linie, HLA-A2-negativ	RCC-Medium	DKFZ, Heidelberg
<b>T2</b>	Lymphoblastoide Zelllinie	LCL-Medium	ATCC (CRL- 1992)
<b>Mel624.38</b>	Melanoma, Tyrosinase- positiv, HLA-A2-positiv	RCC-Medium	M. C. Panelli (Pennsylvania)
<b>NN50</b>	Humane Nierenzell- Primärkultur; Passage 4	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München
<b>PBMZ</b>	Isoliert aus Vollblut		Gesunde Spender
<b>PBMZ-Pool (periphere Blut mononukleäre Zellen)</b>	Gemisch von PBMZ von vier Spendern		Gesunde Spender
<b>RCC26</b>	humane Nierenzellkarzinomzell- linie HLA-A2-positiv	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München
<b>RCC53</b>	humane Nierenzellkarzinomzell- linie, HLA-A2-positiv	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München
<b>ZTL Klon JB4</b>	humane klonale ZTL Linie, allo-HLA-A2- reaktiv	T-Zell- Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München

ATCC = American type culture collection



## 4.6 Vektoren

Vektor	Charakteristika	Herkunft
pcDNS 3.1- MLV g/p („gag-pol“)	Gag kodiert für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine; pol kodiert für die reverse Transkriptase	W. Uckert (Berlin)
pMP71- TCR53m	Retroviraler Vektor mit der TZR53 Sequenz in der Abfolge $\beta$ -Kette-P2A- $\alpha$ -Kette. Die konstanten Ketten der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette wurden durch murine konstanten Ketten ersetzt. Das erkannte antigene Epitop ist unbekannt.	W. Uckert (Berlin)
MP71PRE- T58-GFP	Retroviraler Vektor mit der TZR-T58 Sequenz in der Abfolge $\beta$ -Kette-P2A- $\alpha$ -Kette. Die konstanten Ketten der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette wurden durch murine konstanten Ketten ersetzt. Dem Vektor wurde die Sequenz von GFP integriert. Spezifität: Melanoma-assoziiertes Antigen Tyrosinase, HLA-A2-restringiert.	W. Uckert (Berlin)
MP71PRE- D115-GFP	Retroviraler Vektor mit der TZR-D115 Sequenz in der Abfolge $\beta$ -Kette-P2A- $\alpha$ -Kette. Die konstanten Ketten der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette wurden durch murine konstanten Ketten ersetzt. Dem Vektor wurde die Sequenz von GFP integriert. Spezifität: Melanoma-assoziiertes Antigen Tyrosinase, HLA-A2-restringiert.	W. Uckert (Berlin)

## 4.7 Antikörper

### 4.7.1 Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Markierung	Spezies/ Isotyp	Klon	Hersteller	Einsatz
CD3	V500	Maus, IgG1, κ	UCHT1	BD	1:10
CD3	Pacific Blue	Maus IgG1, κ	UCHT1	BD	1:20
CD8 $\alpha$	V500	Maus IgG1, κ	RPA-T8	BD	1:20
CD8 $\alpha$	PE	Maus IgG1, κ	RPA-T8	BD	1:50
CD19	Pacific Blue	Maus, IgG1, κ	HD37	Dako	1:20
CD45	PeCy7	Maus IgG1, κ	HI30	BD	1:50
CD107a	FITC	Maus IgG1, κ	H4A3	BD	1:20
CD107b	FITC	Maus IgG1, κ	H4B4	BD	1:20
Granzym B	PE	Maus IgG1, κ	GB11	AbD Serotec	1:50
IFN $\gamma$	APC	Maus IgG2b, κ	25723.11	BD	1:10
IFN $\gamma$	PeCy7	Maus IgG1, κ	4S.B3	BD	1:25
IL2	APC	Ratte IgG2a, κ	MQ1- 17H12	BD	1:20
muriner TZR	APC	Hamster IgG2	H57-597	BD	1:100
muriner TZR	PE	Hamster IgG2	H57-597	BD	1:100

## Material

MIP1 $\beta$	FITC	Mouse IgG2b	24006	R&D	1:10
TNF $\alpha$	Alexa Fluor 700	Maus IgG1, $\kappa$	Mab11	BD	1:20
Perforin	unmarkiert	Maus IgG2b, $\kappa$	$\delta$ G9	BD	1:100

### 4.7.2 Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Markierung	Spezies	Klon	Hersteller	Einsatz
Maus – IgG2b	A488	Ziege	polyklonal	Molecular Probes	1:500
Maus – IgG2b	A647	Ziege	polyklonal	Molecular Probes	1:500

### 4.7.3 Antikörper zur Stimulation von T-Zellen

Spezifität	Spezies	Klon	Hersteller	Einsatz
CD3	Maus IgG2a	OKT3	eigene Herstellung E. Kremmer	1 $\mu$ g/ $\mu$ l
F(ab) <sub>2</sub> anti- Maus IgG	Ziege	polyklonal	Serotec	10 $\mu$ g/ml

## 4.8 Blutproben

Die in der Arbeit verwendeten Vollblutproben wurden von gesunden Spendern zur Verfügung gestellt. Die Abnahme erfolgte von einem zur Blutabnahme berechtigten Mediziner. Die Zustimmung der Spender und der lokalen Ethikkommission lag vor.

## **5 Methoden**

### **5.1 Zellkultur**

#### **5.1.1 Allgemein**

Alle Arbeitsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 6,5 % CO<sub>2</sub>.

#### **5.1.2 Auftauen der Zellen**

Die gefrorenen Zellsuspensionen wurden solange im Wasserbad bei 37 °C erhitzt, bis etwa 2/3 der Zellsuspension aufgetaut war. Anschließend wurde 1 ml FKS zu der Zellsuspension pipettiert und die gesamte Lösung in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, welches ebenfalls 1 ml FKS enthält.

Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet im gewünschten Medium aufgenommen.

#### **5.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein bestimmtes Volumen der zuvor gut gemischten Zellsuspension mit Trypanblau bzw. bei der Blutaufräufung in Trypanblau mit 1 % Essigsäure verdünnt. Essigsäure lässt die Erythrozyten platzen, wodurch vermieden wird, dass diese fälschlicherweise als Lymphozyten bewertet werden. Trypanblau kann nur in toten Zellen die Plasmamembran überwinden, wodurch die lebenden Zellen von den toten, bläulich schimmernden, Zellen unterschieden werden können.

Die Zellen der vier Großquadrate wurden einzeln ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Das Volumen zwischen Deckglas und Neubauer Zählkammer beträgt 0,1 µl (Fläche eines Eckquadrates = 1 mm<sup>2</sup> x Kammerhöhe = 0,1 mm → 0,1 mm<sup>3</sup>). Multipliziert man die ermittelte Zellzahl pro Großquadrat mit 10<sup>4</sup> so erhält man die Zellzahl pro ml.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert aus den Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 5.1.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert und jeweils ca.  $5 \times 10^6$  bis  $10 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l FKS aufgenommen. Die Einfrierröhrchen wurden mit jeweils 500  $\mu$ l befüllt. Im nächsten Schritt wurde das gleiche Volumen an 20 % DMSO in RPMI-Medium zugegeben.

DMSO dient bei der Kryokonservierung von Zellen als Gefrierschutzmittel, indem es diese vor der mechanischen Zerstörung durch Kristalle schützt. Da es allerdings für die Zellen toxisch ist, wurden alle Schritte auf Eis und möglichst rasch durchgeführt.

Die Röhrchen wurden zum schonenden Einfrieren in Zellstoff gewickelt und zunächst bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach drei Tagen wurden die Zellen zur Kryokonservierung in Tanks mit flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  transferiert. Der Transport zum Tank erfolgte auf Trockeneis.

### 5.1.5 Kultivierung von adhärennten Zellen

Adhärennt wachsende Zellen wurden in liegenden Zellkulturflaschen mit Filterdeckel je nach Größe der Zellkulturflasche (T75 mit  $75\text{ cm}^2$  oder T175 mit  $175\text{ cm}^2$  Adhärennzfläche) in 10 ml bzw. 25 ml des für die Zellen jeweils optimalen Kulturmediums kultiviert. Da die Nährstoffe des Kulturmediums nach einer gewissen Zeit von den Zellen aufgebraucht wurden, wurde dieses alle drei bis vier Tage ausgewechselt. Dazu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und 10 ml bzw. 25 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Wurde mikroskopisch ein konfluenter Zellrasen ermittelt (80 % bis 100 % Zellkonfluenz), so war es nötig die Zellen zu splitten um ein Überwachsen zu verhindern. Dabei wurde zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült um noch verbleibende Medienreste sowie tote Zellen, die nicht mehr am Zellkulturboden angeheftet waren, zu entfernen. Anschließend wurden 1 ml (T75) bzw. 2 ml (T175) Trypsin-EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben und für ca. 2 bis 5 min inkubiert. Dabei wurde die Zellkulturflasche immer wieder leicht geschwenkt, um die Trypsin-EDTA-Lösung gleichmäßig zu verteilen. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, v.a. Kalzium, welches für die Salzbrücken der Zellen mit dem Substrat nötig ist. Trypsin spaltet die Bindeproteine zwischen Zelle und Substrat. Konnte mikroskopisch eine

Lösung der Zellen von der Zellkulturflasche festgestellt werden, so wurden 5 ml bis 10 ml Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Das im Medium enthaltene FKS inaktiviert das Trypsin und stoppt somit die Reaktion. Anschließend wurde ein Teil der Zellsuspension entfernt und je nach Bedarf auf mehrere Flaschen aufgeteilt oder verworfen bzw. eingefroren. Die zur weiteren Kultur in der Kulturflasche verbleibende Zellsuspension wurde mit entsprechendem Medium auf 10 ml bzw. 25 ml aufgefüllt.

### **5.1.6 Kultivierung von Suspensionszellen**

Die jeweiligen Suspensionszellen wurden in für sie optimalem Medium in einer T75-Zellkulturflasche (20 - 25 ml Zellsuspension) mit Filterdeckel stehend kultiviert. Sie wurden gesplittet, indem ein Teil der Zellsuspension abgenommen und die Zellkulturflasche mit frischem Medium aufgefüllt wurde. T2-Zellen wurden zwei Tage vor einem Experiment geerntet, abzentrifugiert und gezählt. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von  $0,3 \times 10^6$  Zellen/ml in einer T75 wieder ausgesät.

### **5.1.7 Fixierung von Zellen**

$5 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml 4 % PFA in PBS für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und vor ihrem Einsatz in einem Versuch über Nacht bei 37 °C in Kultur gehalten.

### **5.1.8 Färbung von PBMZ mit PKH26**

Bei einigen Versuchen wurden PBMZ zu den ZTL-Klonen gemischt. Um diese bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von den ZTL zu unterscheiden, wurden sie vor Zugabe zu den ZTL mit dem Farbstoff PKH26 gefärbt. Dazu wurden die PBMZ entweder aufgetaut oder aus der Kultur geerntet und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in ca. 5 ml OptiMEM-Medium aufgenommen, gezählt und wiederum abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µl abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 50 µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen „Diluent“-Lösung aufgenommen und mit 50 µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen 1:250 in

„Diluent“-Lösung verdünnter PKH26-Lösung versehen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Färbereaktion mit 200 µl FKS pro  $1 \times 10^6$  Zellen gestoppt. Es folgte eine einminütige Inkubation, worauf 400 µl RCC-Medium, welches ebenfalls FKS enthält, pro  $1 \times 10^6$  Zellen zu den Zellen gegeben wurde. Nachdem die Zellen abzentrifugiert waren, wurden sie dreimal mit ca. 5 ml OptiMEM-Medium gewaschen und anschließend in dem gewünschten Medium aufgenommen und gezählt.

### **5.1.9 Restimulation und Kultivierung des T-Zell-Klons ZTL-JB4**

ZTL-Klone müssen regelmäßig stimuliert werden, um eine kontinuierliche Funktion und Proliferation zu erzielen. Diese Stimulation erfolgt durch die Kultivierung der Zellen mit T-Zell-Rezeptor-Ligand positiven (TZR-L<sup>+</sup>) RCC26-Zielzellen, TZR-L<sup>-</sup> B-LCL-LAZ388-Zellen und einem Gemisch unterschiedlicher PBMZ verschiedener Spender, welche ein für die T-Zellen nötiges Zytokinmilieu schaffen. Bevor die Zellen zu den ZTL-Klonen gegeben wurden, wurden diese in einer Bestrahlungsanlage mit dem Cäsium-Isotop <sup>137</sup>Cs (β- und γ-Strahler) bestrahlt, um ihre Proliferation zu verhindern. Die jeweilige Bestrahlungsdosis sowie die Zellzahl, die zu den ZTL-Klonen gegeben wurde, ist in Tabelle 5-1 aufgelistet. Die Zellen wurden mit  $0,6 \times 10^6$  ZTL-Klonen zusammen in einer 24-Loch-Platte in 1,5 ml T-Zell-Medium mit 50 U/ml IL-2 pro Loch pipettiert. Am Tag 4 wurde mikroskopisch die Zelldichte der ZTL beurteilt und gegebenenfalls die Zellen 1:1 gesplittet, indem die Zellsuspension eines Lochs durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert wurde und anschließend die Hälfte des Volumens (750 µl) in ein leeres Loch überführt wurde. Anschließend wurden 750 µl frisches T-Zell-Medium mit 100 U/ml IL-2 zu den Zellen gegeben, um eine Endkonzentration von 50 U/ml zu erzielen. Die Zellen wurden zwischen Tag 8 und Tag 12 nach Restimulation für Versuche verwendet. Die Restimulation erfolgte alle 10 bis 14 Tage. Jeweils am Tag vor einem Experiment wurde den Zellen frisches Medium mit frischem IL-2 gegeben, um die gleiche Ausgangssituation für alle Versuche zu gewährleisten. Dazu wurde vorsichtig, ohne die ZTL am Boden des Lochs mitzunehmen, die Hälfte des Mediums eines Lochs abgenommen und verworfen. Anschließend

wurde das Loch mit 750 µl frischem T-Zell-Medium mit 100 U/ml IL-2 aufgefüllt. Dabei stellte sich eine Endkonzentration von 50 U/ml IL-2 ein. Während der Kultur der Zellen wurde mehrmals anhand der Färbung des Mediums und der Zelldichte kontrolliert, ob die Zellen frischen Mediums bedurften oder gesplittet werden mussten.

**Tabelle 5-1: Zellzahl und Bestrahlungsdosis der Restimulationszellen für die Stimulation des ZTL-Klons JB4**

Restimulationszellen	Zellzahl/Loch	Bestrahlungsdosis (Gy)
RCC26 (TZR-L <sup>+</sup> )	0,06 x 10 <sup>6</sup>	100
B-LCL-LAZ388 (TZR-L <sup>-</sup> )	0,1 x 10 <sup>6</sup>	150
PBMZ-Gemisch	1 x 10 <sup>6</sup> bis 1,4 x 10 <sup>6</sup>	50

## 5.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMZ)

Alle Isolierungsschritte wurden zügig durchgeführt. Es wurden Einmalpipetten aus Plastik verwendet.

Die Isolierung mononukleärer Zellen erfolgte aus venösem Blut gesunder Spender. Die 50-ml-Spritzen wurden zur Blutabnahme mit 1000 I.E. (100 µl pro Spritze) Heparin versetzt, um eine Gerinnung des Bluts zu verhindern. Das Blut wurde nach Abnahme mit demselben Volumen an RPMI 1640-Medium versetzt und 35 ml dieses Gemisches auf 15 ml Ficoll (Pancoll) in einem 50 ml Falconröhrchen überschichtet. Durch Zentrifugation bei 2000 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) für 25 min ohne Bremse bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten sedimentiert. Die peripheren Blutlymphozyten sammeln sich in der Interphase. Darüber befindet sich das Plasma/Mediumgemisch. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein Falconröhrchen überführt, mit gleichem Volumen an RPMI 1640 Medium gemischt und bei 1900 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) für 12 min zentrifugiert (Waschschritt zum Entfernen des Ficolls). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Medium oder Puffer für die weitere Verwendung aufgenommen.

Die Ausbeute lag spenderabhängig zwischen  $18 \times 10^7$  und  $25 \times 10^7$  Zellen pro 100 ml Vollblut.



### **5.3 In-vitro-Modelle zur Nachahmung des Tumormilieus**

Es wurden verschiedene In-vitro-Modelle verwendet, um das Tumormilieu nachzuahmen. Zunächst wurden Tumorzellkulturen verwendet, die über verschiedene Zeiträume und in verschiedenen Dichten angesetzt waren. In diesem Modell wird die Komplexität eines „realen“ Tumors nachgeahmt, in welchem sowohl multiple Zelloberflächenstrukturen als auch das von den Tumorzellen etablierte extrazelluläre Milieu vorhanden ist und auf zugegebene Immunzellen einwirken kann. Anschließend wurde das Modell schrittweise vereinfacht, um die Bedeutung der verschiedenen Komponenten des Tumormilieus auf die ZTL-Funktionen aufzudecken. Die einzelnen Modelle und deren Verwendung werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

#### **5.3.1 Das komplexe Tumormodell in Anwesenheit extrazellulärer Tumormilieufaktoren**

Um den Einfluss des kompletten Tumormilieus, bestehend aus den Zelloberflächen und dem durch die Tumorzellen etablierten zellfreien Milieu (zTM), herzustellen, wurden Tumorzellkulturen in verschiedener Dichte ( $0,5 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$ ) in 1 ml T-Zell-Medium jeweils für verschiedene Zeiträume (0 h, 5 h, 20 h, 30 h) kultiviert. Zu diesen Kulturen wurden dann  $2 \times 10^5$  ZTL gegen und nach 5 h die Degranulation und Zytokinproduktion der ZTL abgefragt. In diesem Modell sind die T-Zellen sowohl mit multiplen Tumorzelloberflächen als auch dem durch die Tumorzellen konditioniertem extrazellulären Milieu konfrontiert. Dabei sollen die verschiedenen Tumorzellichten und die Kulturlängen jeweils kleine oder große Tumoren widerspiegeln. Die Kultur erfolgte in T-Zell-Medium mit 10 ng/ml IL-15. IL-15 wurde IL-2 vorgezogen, da es ein im Nierenzellkarzinom beschriebenes Zytokin ist, welches das Überleben von T-Zellen unterstützt und so eine wichtige Rolle in der Tumorabwehr spielt (Trinder et al., 1999; Klebanoff et al., 2004).

### **5.3.2 Tumormodell ohne etabliertes Milieu**

Um nur die zellvermittelten Komponenten des Tumormilieus ohne zellfreie, lösliche Komponenten zu generieren, wurden Tumorzellen mit PFA fixiert (siehe 5.1.7) und in verschiedenen Dichten angesetzt. Zu diesem nur aus zellulären Komponenten bestehenden Tumormilieu wurden dann die ZTL zugegeben und die Funktion abgefragt. Die Kokultur erfolgte wie in 5.3.1 beschrieben.

### **5.3.3 Zellfreies etabliertes Tumormilieu**

Um den Einfluss des zTM ohne zellulären Kontakt zu untersuchen, wurden T-Zellen mit Tumorzellen im sogenannten „Transwell“ kultiviert. Beim „Transwell“ handelt es sich um ein Insert, welches in das Loch einer 24-Loch-Platte eingebracht wird. Durch eine Membran mit 0,4 µm Poren wird der Flüssigkeitsaustausch zugelassen, nicht aber der Zellkontakt.

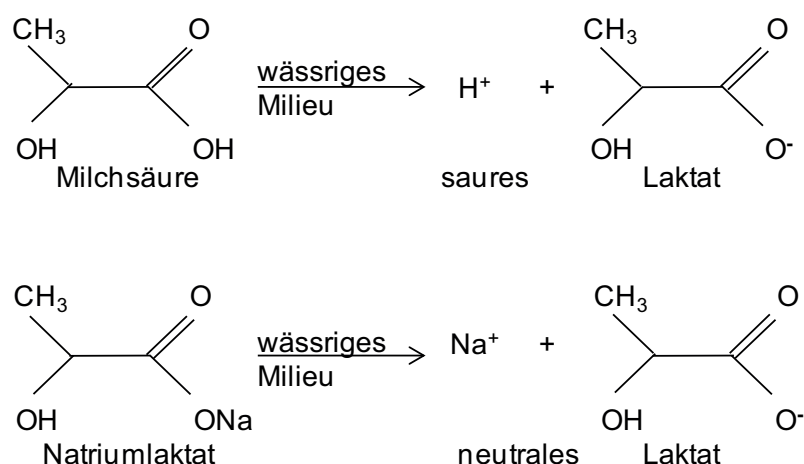
Es wurden  $3,5 \times 10^4$  ZTL in 100 µl in das obere Abteil des „Transwells“ und eine unterschiedliche Anzahl an Tumorzellen in 600 µl in das untere Abteil pipettiert. Damit ergaben sich niedrige (1:1) bis hohe (10:1) Verhältnisse von Tumorzellen zu ZTL. Die Kultur erfolgte jeweils in T-Zell-Medium mit 10 ng/ml IL-15 über 40 h.

### **5.3.4 Herstellung des zellfreien Tumormilieus (zTM)**

Für die Generierung des zTM wurden  $0,5 \times 10^6$  (zTM<sub>1</sub>) -  $5 \times 10^6$  (zTM<sub>10</sub>) für 40 h in T-Zell-Medium in 5 ml Polystyren-Röhrchen kultiviert. Anschließend wurden die Röhrchen für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Um zu gewährleisten, dass sich keine Zellen im Überstand befanden, wurde dieser über einen 0,22 µm Filter filtriert. Der Überstand wurde entweder direkt für einen Versuch eingesetzt oder bis zur Nutzung bei -20 °C eingefroren.

### 5.3.5 Herstellung von „Milchsäure-Medium“ und „Natriumlaktat-Medium“

Um den Effekt des Laktats auf die T-Zell-Funktion zu testen, wurde T-Zell-Medium mit Milchsäure bzw. Natriumlaktat in verschiedenen Konzentrationen supplementiert. Diese werden im Folgenden als „Milchsäure-Medium“ bzw. „Natriumlaktat-Medium“ bezeichnet. Im wässrigen Milieu dissoziiert Milchsäure zum Anion der Milchsäure, welches als Laktat bezeichnet wird, und Protonen. Natriumlaktat dissoziiert zu Laktat und Natrium-Ionen. Im ersten Fall kommt es durch die Akkumulation der Protonen zu einer Ansäuerung des Milieus, im zweiten Fall erfolgt keine Ansäuerung (siehe Abbildung 5-1).



**Abbildung 5-1: Dissoziation der Milchsäure, bzw. des Natriumlaktats**

In wässrigem Milieu dissoziiert das Proton von der Milchsäure, es entsteht das Anion der Milchsäure, Laktat, und Protonen, wodurch das Milieu angesäuert wird. Beim Natriumlaktat entstehen Laktat und Natrium-Ionen, es kommt zu keiner Ansäuerung.

Die Gleichgewichtskonstante  $K_s$  von Milchsäure bzw. Natriumlaktat beträgt  $10^{-3,9}$ . Es wurden 5 mM, 10 mM und 20 mM Milchsäure bzw. Natriumlaktat zu T-Zell-Medium gegeben. Dabei wurde bei der Zugabe der Milchsäure ein pH-Wert von 7,1 (5 mM), 6,8 (10 mM) bzw. 6,1 (20 mM) gemessen. Bei Zugabe von 20 mM Natriumlaktat stellte sich der pH-Wert auf 7,6 ein. Mit Hilfe des Dissoziationsgrads  $\alpha$  kann nach der folgenden Formel ermittelt werden zu wie viel Prozent Milchsäure bzw. Natriumlaktat im verwendeten T-Zell-Medium zu Laktat und Protonen bzw. Natrium-Ionen vorliegt:

Milchsäure (20 mM)

$$K_s = c(H^+) \times \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

$$10^{-3,9} = 10^{-6,1} \times \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

$$10^{-3,9} - 10^{-3,9} \alpha = 10^{-6,1} \alpha$$

$$\alpha = 0,993$$

Natriumlaktat (20 mM)

$$K_s = c(H^+) \times \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

$$10^{-3,9} = 10^{-7,6} \times \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

$$10^{-3,9} - 10^{-3,9} \alpha = 10^{-7,6} \alpha$$

$$\alpha = 0,999$$

$K_s$  = Gleichgewichtskonstante     $\alpha$  = Dissoziationsgrad     $c(H^+) = 10^{-pH}$

Für alle verwendeten Konzentrationen lag Milchsäure und Natriumlaktat zu mehr als 99 % dissoziiert vor. Als Kontroll-Milieu wurde jeweils T-Zell-Medium verwendet. Zur Vereinfachung wird dieses im Folgenden als Medium bezeichnet.

### 5.3.6 Messung des pH-Werts

Die Ansäuerung von T-Zell-Medium und Natriumlaktat erfolgte durch die Zugabe von 1 M Phosphorsäure, die Neutralisierung von sauren Medien erfolgte über 1 M Natronlauge. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer Mikro-M-Kombinationselektrode (Model PHR-146S, Lazar Research Laboratories, USA) gemessen. Zur Einstellung des pH-Werts wurde die Phosphorsäure bzw. die Natronlauge tropfenweise unter Schütteln zu den Medien gegeben, und die Elektrode so lange im Medium belassen, bis der pH-Wert konstant blieb. Der pH-Wert wurde immer kurz vor Versuchsbeginn eingestellt.

### 5.3.7 Ultrazentrifugation zur Abtrennung von Zellmembranvesikel

Der Einfluss von tumorzellproduzierten Zellmembranvesikel, wie z.B. Exosomen, wurde untersucht, indem jeweils 1 ml des zellfreien Überstands pro Zentrifugationsröhrchen bei 100000 g für 70 min ultrazentrifugiert wurde. Der Überstand wurde als „exosomenfreier“ Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Das Sediment, aus Zellmembranvesikel und Proteinen wurde mit 1 ml PBS aufgespült und für 70 min bei 100000 g zentrifugiert (They et al., 2006). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und das Sediment von ursprünglich 5 ml

Überstand in 500 µl T-Zell-Medium vereint. Diese Suspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### **5.3.8 Hitzebehandlung zur Ausfällung von Proteinen**

Um Proteine aus dem zTM zu entfernen, wurde dieses im Heizblock bei 95 °C für 10 min erhitzt. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge Galaxy Ministar, VWR), um die ausgefällten Proteine zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und für den Versuch verwendet.

### **5.3.9 Kynureninmessung**

Zur Konzentrationsmessung von Kynurenin im zTM wurde die Probe 1:1 mit Ehrlich-Reagenz gemischt. Bei Anwesenheit von Kynurenin verfärbt sich die Probe durch das Ehrlich-Reagenz gelb. Die Proben wurden 10 min inkubiert und die Extinktion anschließend am „ELISA reader *sunshine*“ bei 492 nm gemessen. Mit Hilfe einer Standardkurve wurde die Konzentration in den Proben ermittelt (Daubener et al., 1994).

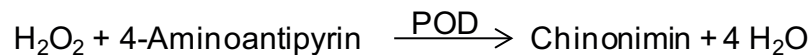
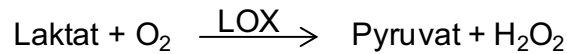
### **5.3.10 Adenosinmessung**

Die Bestimmung der Adenosinkonzentration in zTM erfolgte im Labor der Klinik für Anästhesie der Ludwig-Maximilians-Universität München mittels „dual column switching high affinity performance/reversed phase high performance liquid chromatography“ (HPLC). Die Überstände wurden mit 70 % Perchlorsäure denaturiert und die ausgefällten Proteine durch Zentrifugation bei 10000 g für 3 min abgetrennt. Daraufhin wurden die proteinfreien Überstände durch die Zugabe von KOH neutralisiert und die Probe für 3 min bei 10000 g zentrifugiert. Dieser Überstand wurde auf die HPLC-Säule geladen. Die einzelnen Bestandteile im Überstand wurden mit einem linearen Gradienten von Ammoniumformiat (0,05 M, pH 3,5) und Methanol (60 %) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden photometrisch über ihre Extinktion bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen.

### 5.3.11 Laktatmessung

Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte in der klinischen Chemie am Universitätsklinikum Regensburg mit Hilfe des „Lactat PAP enzymatischen Farbttest“ von mti diagnostics. Dabei handelt es sich um einen Farbumschlagtest, der auf folgendem Prinzip basiert:

Die Laktatoxydase (LOX) spaltet Laktat in Pyruvat und Wasserstoffperoxid. In Anwesenheit einer Peroxidase (POD) bildet das entstandene Wasserstoffperoxid zusammen mit dem 4-Aminoantipyrin einen roten Chinonimin-Farbstoff. Dieser kann mittels Spektrophotometrie nachgewiesen und die ursprüngliche Laktatkonzentration, die direkt proportional zur Intensität der Farbe ist, daraus ermittelt werden.



## 5.4 Retrovirale Transduktion von T-Lymphozyten

### 5.4.1 Generierung von viralen Partikeln

Alle Schritte für die Generierung von viralen Partikeln wurden unter S2-Bedingungen durchgeführt. Für die Generierung von viralen Partikeln wurde die Verpackungszelllinie HEK 293T verwendet. HEK 293 ist eine embryonale Nierenzelllinie, welche mit dem Adenovirus E1A-Genprodukt transformiert wurde (Graham et al., 1977; Louis et al., 1997). Die HEK 293T Zelllinie leitet sich von der HEK 293 Zelllinie ab, wobei in dieser zusätzlich das Affen-Virus 40 T-Antigen (SV40 T-Antigen von engl. simian virus) eingebracht wurde. Daher exprimieren HEK 293T Zellen konstitutiv das SV40 T-Antigen und es kommt zur episomalen Replikation aller Plasmide, welche den Replikationsursprung sowie eine frühe Promotorregion von SV40 enthalten. Der retrovirale Vektor, welcher die Kodierungssequenz von Interesse trägt, wurde zusammen mit den Verpackungskonstrukten mittels  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation in die HEK 293T Zellen eingebracht.

Am Vorabend der Transduktion wurden  $0,5 \times 10^6$  HEK 293T Zellen in 4 ml HEK 293T Kulturmedium in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert. Am Versuchstag wurde eine Plasmidlösung aus 6  $\mu\text{g}$  des zu transduzierenden

Vektors mit der DNS von Interesse, 6 µg pALF10A1 (Verpackungskonstrukt) und 6 µg pcDNS 3.1-MLV gag/pol (gag kodiert für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine; pol kodiert für die Reverse-Transkriptase) zusammen mit 15 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> in ein 15 ml Polyesterolfalcon pipettiert. Auf das Gemisch wurden 150 µl steriles Wasser pipettiert und anschließend unter mildem Vortexen 150 µl 2 x HBSS langsam hinzu getropft. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung auf die HEK 293T Zellen eines Lochs getropft und die Platte leicht geschwenkt, um die Lösung gleichmäßig im Loch zu verteilen. Die Zellen wurden 6 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgenommen ohne die semiadhärenten Zellen mitzunehmen und 4 ml frisches Transduktionsmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun für 48 h im Brutschrank inkubiert und anschließend der Überstand, welcher die retroviralen Partikel enthielt, für die Transduktion der T-Zellen geerntet und frisch verwendet.

### **5.4.2 Retrovirale Transduktion und anschließende Kultur von transduzierten T-Zellen**

Retroviren können ihre virale DNS nur während der Mitose der Wirtszelle in dessen Genom integrieren. Deshalb war es nötig, T-Zellen, die retroviral transduziert werden sollten, zur Proliferation anzuregen. Dies erfolgte durch Aktivierung über CD3 und CD28. Dazu wurden 2,5 µg OKT3 und 0,5 µg anti-CD28-Antikörper in 500 µl PBS in das Loch einer 24-Loch-Platte pipettiert. Nach zwei-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und für 30 min durch 500 µl 2 %-iges FKS in PBS ersetzt. Anschließend wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen und pro Loch 1 x 10<sup>6</sup> frisch aus Blut isolierte PBMZ in 1 ml Transduktionsmedium mit 100 U/ml IL-2 gegeben und 48 h kultiviert. Anschließend wurde 1 ml des frisch geernteten HEK 293T-Überstandes, welcher die Viruspartikel enthielt, über einen 0,45 µm Filter filtriert und mit 100 U/ml IL-2 und 8 µg/ml Protaminsulfat versetzt. Dieser wurde auf ein Loch mit aktivierten T-Zellen gegeben, so dass das Endvolumen 2 ml mit 50 U/ml IL-2 und 4 µg/ml Protaminsulfat betrug. Protaminsulfat ist positiv geladen und neutralisiert die negativ geladene Zellmembran, wodurch den Viren der Eintritt in die Zelle erleichtert wird. Die

T-Zellen wurden zusammen mit den Viruspartikeln bei 800 g für 90 min bei 32 °C zentrifugiert und anschließend bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Auf die im Loch verbliebenen HEK 293T Zellen wurden 3 ml frisches Transduktionsmedium gegeben.

Am Folgetag erfolgte eine zweite Transduktion. Dazu wurden 25 µg Retronektin in 1 ml PBS für 2 h in ein Loch einer 6-Loch-Platte pipettiert. Nach zwei-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und durch 1 ml 2 %-iges FKS in PBS ersetzt. Nach weiteren 30 min Inkubation im Brutschrank wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen. Retronektin ist ein rekombinantes humanes Fibronektin-Fragment CH-296, welches aus drei funktionellen Domänen besteht: Eine zellbindende Domäne (C-Domäne für engl. cell), eine heparinbindende Domäne (H-Domäne) und die CS-1-Sequenz des humanen Fibronektins. Retrovirale Partikel werden über die H-Domäne gebunden. Die T-Zellen werden über die Bindung der Integrinrezeptoren VLA-4 und VLA-5 an die Fibronektin-Domäne CS1 und die C-Domäne gebunden. Dadurch werden die Viruspartikel an die Zielzellen herangeführt und die Transduktion verstärkt. Der Virusüberstand der HEK 293T Zellen wurde wiederum abgenommen, über einen 0,45 µm Filter filtriert und auf die Retronektin-beschichtete Platte transferiert. Um die Viruspartikel an den Boden der Vertiefung zu binden, wurde die 6-Loch-Platte 90 min bei 3200 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die T-Zellen aus 2 Vertiefungen der 24-Loch-Platten in ein Loch der 6-Loch-Platte vereint. Dazu wurde zunächst die Hälfte (1 ml) des Mediums der T-Zellen vorsichtig von oben abgenommen und verworfen. Die T-Zellen wurden anschließend durch Auf- und Ab-pipettieren gut resuspendiert und in die 6-Loch-Platte überführt. Damit ergab sich ein Volumen von 2 ml pro Loch. Anschließend wurde das Loch mit 4 ml frischem Transduktionsmedium auf ein Endvolumen von 6 ml mit einer Endkonzentration von 100 U/ml IL-2 und 4 µg/ml Protaminsulfat aufgefüllt. Der Überstand von nicht-transformierten HEK 293T Zellen wurde verwendet, um nicht-transduzierte T-Zellen (MOCK-Kontrolle) zu generieren. Die T-Zellen wurden wie ZTL-Klone behandelt, indem, wenn nötig, das Medium ausgetauscht wurde bzw. sie gesplittet wurden (siehe 5.1.9). Die IL-2-Konzentration wurde nach dem ersten Split auf 50 U/ml reduziert. Die Transduktionseffizienz wurde am Tag 3 nach Transduktion mittels



Durchflusszytometrie überprüft und die transduzierten T-Zellen etwa am Tag 9 nach Transduktion für Versuche verwendet.

## 5.5 Durchflusszytometrie

### 5.5.1 Prinzip

Oberflächen- sowie intrazelluläre Proteine können mit fluorochrommarkierten Antikörpern oder mit unmarkierten Antikörpern, die dann durch einen fluorochrommarkierten sekundären Antikörper gebunden werden, nachgewiesen werden. Die Emissionen der jeweiligen Fluorochrome werden vom „Fluorescence activated cell sorter“ (FACS) gemessen. Zusätzlich wird das Licht, das durch die Zellen gestreut wird, nachgewiesen, wodurch die Größe sowie die Granularität der Zellen ermittelt werden können.

Beim Messvorgang werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare gesaugt. Dabei wird der Strom durch eine Düse gedrückt, welche einen solch kleinen Durchmesser hat, dass die Flüssigkeit durch Vibration der Düse in so kleine Tropfen geteilt wird, dass jeder Tropfen eine Zelle enthält. Die einzelnen Tropfen passieren einen Lichtstrahl, der durch die Zelle gestreut wird.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) nimmt die Beugung des Lichts im flachen Winkel auf und bestimmt somit die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) nimmt die Streuung des Lichts im rechten Winkel auf und bestimmt die Granularität der Zelle.

Gleichzeitig regt der Laser die verschiedenen Fluorochrome der Antikörper an, deren Emissionen dann durch einen Photonendetektor registriert werden können. Die Anzahl der gemessenen Photonen ist proportional zur Menge der Fluorochrome, also zu der Menge der mit den Antikörpern markierten Moleküle. Mit Hilfe verschiedener Filter werden die verschiedenen Emissionen aufgenommen.

Für die Messungen wurde das Durchflusszytometer LSRII genutzt, welcher vier verschiedene Laser besitzt: Einen UV-Laser (Emissionswellenlänge 350 nm), einen violetten Laser (Emissionswellenlänge 405 nm), einen blauen Laser (Emissionswellenlänge 488 nm) und einen roten Laser (Emissionswellenlänge 633 nm - 635 nm). Diese mit den entsprechenden Filtern

ausgestatteten Laser ermöglichen die gleichzeitige Messung der Emissionen verschiedener Fluorochrome (siehe Tabelle 5-2), wobei darauf geachtet werden muss, dass sich die Emissionen so gering wie möglich überlagern. Zur richtigen Kompensation verschiedener Emissionen sind einzeln gefärbte Proben nötig, mit denen die Überlappung einzelner Emissionen festgelegt und korrigiert werden kann.

**Tabelle 5-2: Spektrale Eigenschaften der für die Durchflusszytometrie verwendeten Fluorochrome**

<b>Fluorochrom</b>	<b>Absorptions- maximum [nm]</b>	<b>Emissions- maximum [nm]</b>	<b>Laser LSRII [nm]</b>	<b>Filter LSRII</b>
7-AAD	543	648	543	670/14
Alexa-Fluor-700	702	719	633	720/40
Alexa-Fluor-647	650	665	633	660/20
Alexa-Fluor-488	495	519	488	695/40
APC	650	660	633	660/20
APC-Alexa-Fluor-750	650	775	633	780/60
FITC	495	525	488	695/40
Pacific Blue	410	455	405	450/50
PeCy7	564	767	543	780/60
PerCP	490	675	488	575/26
PE	564	575	488	575/26
PI	493	619	543	610/20

Mit Hilfe einzeln gefärbter „Kompensations-Beads“ wird schon im Vorfeld definiert, welche Fluoreszenzintensitäten sicher als positiv oder negativ gelten. Eine solche Kompensationsfärbung musste für jeden Fluoreszenzkanal durchgeführt werden.

### 5.5.2 Markierung der toten Zellen

Tote Zellen haben Eigenstrahlung und können unspezifisch Antikörper binden. Da dies zu einem falschen positiven Ergebnis führen kann, ist die Unterscheidung der toten Zellen von den lebenden essentiell. Wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt, so wurde kurz vor der Messung am LSRII

10 µg/ml Propidium Iodid (PI) zu den Zellen gegeben. Dieses dringt in tote Zellen ein und interkaliert in die DNS und bewirkt so eine Fluoreszenzfärbung der toten Zellen, wodurch sie von den lebenden Zellen unterschieden werden konnten. Erfolgte zusätzlich zur Oberflächenfärbung noch eine intrazelluläre Färbung, die eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfordert, musste PI durch 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD) ersetzt werden, da dieses irreversibel in die DNS bindet. Dazu wurden die Zellen während der Oberflächenfärbung noch vor der Permeabilisierung zusätzlich mit 10 µg/ml 7-AAD behandelt. 7-AAD dringt in die toten Zellen ein und interkaliert irreversibel in die DNS, so dass es bei der anschließenden Permeabilisierung, die zum Nachweis der intrazellulären Proteine nötig war, nicht ausgewaschen wurde.

### **5.5.3 Oberflächenfärbung**

Für die Oberflächenfärbung wurden ca.  $5 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von ca. 50 - 100 µl eingesetzt. Die Zellsuspension wurde in kleine FACS-Röhrchen verteilt und mit 500 µl eiskaltem FACS-Azid-Puffer gewaschen. Dazu wurde der Puffer zu den Zellen gegeben und diese für fünf min bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand auf ca. 50 µl abgesaugt und die Färbung mit den Antikörpern begonnen. Von jedem Antikörper wurde nun eine zuvor ausgetestete Menge hinzu pipettiert (zwischen 1 und 10 µl). Die Proben wurden auf dem Vortexer gemischt und für 25 min abgedunkelt bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde wiederum mit 500 µl FACS-Azid-Puffer gewaschen und für die Messung auf ca. 100 µl abgesaugt. Für die spätere Auswertung der Daten war es nötig einzeln gefärbte Proben mitzuführen, um später eine Kompensationsmatrix erstellen zu können, anhand der die Spektralüberlappungen der einzelnen Fluorochrome heraus gerechnet werden konnten. Dazu wurden „Kompensations-Beads“ mit den einzelnen Antikörpern gefärbt. Es wurden 70 µl FACS-Azid-Puffer in FACS-Röhrchen vorgelegt und dazu jeweils 15 µl gut aufgeschüttelter „positiver“ und „negativer“ Beads pipettiert. Die „positiven“ Beads sind mit einem Antikörper besetzt, welcher die Kappa-leichte Kette der fluorochrommarkierten Antikörper erkennt und bindet. Zu den Beads wurde 1 µl eines

fluorochrommarkierten Antikörpers pipettiert, für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend 1x mit FACS-Azid-Puffer gewaschen und auf ca. 50 µl abgesaugt. Nur die „positiven“ Beads binden den Antikörper und erzeugen ein Fluoreszenzsignal. Die antikörperbeladenen „positiven“ Beads und „negativen“ Beads wurden gemischt. Diese Mischung erzeugt am Gerät zwei Fluoreszenzpeaks, wobei die Intensität der „negativen“ Beads dem Fehlen einer spezifischen Fluoreszenz entspricht und die „positiven“ Beads die Intensität einer positiven Fluoreszenz anzeigen. So kann zwischen gefärbten Protein-negativen und Protein-positiven Proben unterschieden werden und die spektrale Überschneidung verschiedener Fluorochrome elektronisch verrechnet „kompensiert“ werden.

### **5.5.4 Intrazelluläre Färbung**

Wurden die Proben nach der Oberflächenfärbung nicht direkt gemessen bzw. erfolgte nach dieser noch eine intrazelluläre Färbung, wurden die Zellen mit 500 µl 1 %-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das PFA wurde unter Vortexen zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für 20 min. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 500 µl PBS gewaschen. Damit die Antikörper die Zellmembran passieren können, wurden die Zellen zunächst mit 500 µl 0,1 %-iger Saponinlösung (2 % Humanserum in PBS) und anschließend mit 500 µl 0,35 %-iger Saponinlösung (2 % Humanserum in PBS) permeabilisiert.

Die Antikörper wurden zu 50 µl der Zellsuspension in 0,35 %-iger Saponinlösung gegeben und für 30 min im Dunklen bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. War der primäre Antikörper unmarkiert, erfolgte nach Waschen mit 0,1 %-iger Saponinlösung sowie 0,35 %-iger Saponinlösung die Zugabe eines sekundären, fluorochrommarkierten Antikörpers. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit 500 µl FACS-Azid-Puffer sowie 500 µl 1 %-igem PFA gewaschen. Bis zur Messung am LSRII wurden die Zellen in 1 %-igem PFA auf Eis aufbewahrt.

### **5.5.5 Messung der Proben und Auswertung der Daten**

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer LSR II. Vor der Messung wurde anhand einer unmarkierten Probe die Lage der Zellpopulation im FSC gegen den SSC im Dot-Plot (Punktewolken-Diagramm) eingestellt. Anschließend wurde für jede Fluoreszenz die PMT-Einstellung der Laser am LSR II eingestellt, so dass negative Signale möglichst am Nullpunkt der x-Achse lagen und positive Fluoreszenzen möglichst weit rechts im Histogramm.

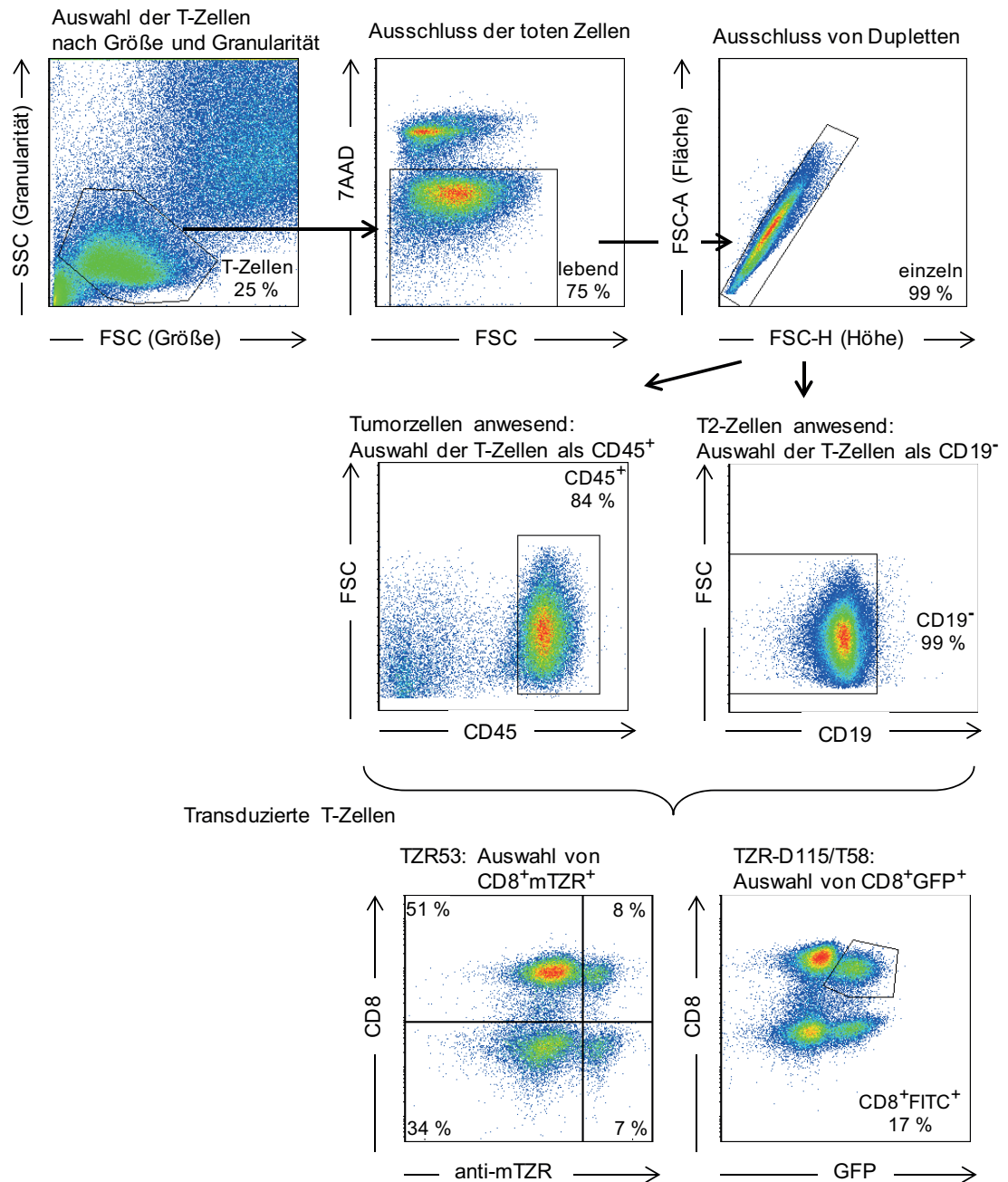
Die gemessenen Werte wurden entweder in einem Punktewolkendiagramm dargestellt oder im Histogramm. Punktewolkendiagramme ermöglichen eine Gegenüberstellung zweier verschiedener Fluoreszenzen. Im Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung einer Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Ereignisse dargestellt, womit nicht nur eine Einteilung nach positiv bzw. negativ möglich ist, sondern auch die Stärke der Fluoreszenzintensität. So kann beispielsweise ermittelt werden, wie stark ein durch einen Antikörper abgegriffener Oberflächenmarker auf den Zellen exprimiert ist. Die Daten wurden mit Hilfe der FlowJo-Software ausgewertet.

#### **5.5.5.1 Strategie der Auswahl Fensterpositionierung zur Identifikation der T-Zellen**

Mit Hilfe des Auswerteprogramms FlowJo ist es möglich, die gewünschten Zellen anhand bestimmter Zellcharakteristika auszuwählen. Die Auswahl Fensterpositionierung ist in Abbildung 5-2 dargestellt. Zunächst wurden die Zellen im Punktewolkendiagramm als FSC gegen SSC bezüglich ihrer Größe und Granularität, elektronisch eingegrenzt. Anschließend wurden die PI- bzw. 7-AAD-positiven toten Zellen von den lebenden abgetrennt. Ferner wurden Zellaggregate aus zwei oder mehr Zellen ausgeschlossen, da diese für mehrere Marker positiv sein können, wobei nicht festzustellen ist, ob die Marker gemeinsam auf einer Zelle oder getrennt auf verschiedenen Zellen vorkommen. Dubletten wurden daher ausgeschlossen, indem die Fläche (FSC-A) gegen die Höhe (FSC-H) im Punktewolkendiagramm dargestellt wurde und die Zellen in der Diagonale ausgewählt wurden. Bei Anwesenheit von Tumorzellen mussten diese von den T-Zellen abgetrennt werden. Dazu wurde der Leukozytenmarker CD45 eingesetzt, welcher auf T-

Zellen aber nicht auf Tumorzellen exprimiert wird. Tumorzellen wurden daher als CD45<sup>-</sup> ausgegrenzt. In einigen Versuchen wurden transduzierte T-Zellen mit Peptid-beladenen T2-Zellen stimuliert. Da es sich bei T2-Zellen um Hybride aus T- und B-Lymphoblastoidenzellen handelt, exprimieren diese den B-Zell-spezifischen Korezeptor CD19, über welchen sie identifiziert und ausgeschlossen werden konnten. Wurden transduzierte T-Zellen analysiert, so sollten nur die T-Zellen beurteilt werden, die den gewünschten TZR exprimierten, da nur diese spezifisch über diesen TZR stimuliert werden und somit Funktion zeigen können. Da die transgenen TZR murine Regionen enthalten, war es möglich, deren Expression auf der Oberfläche der Zellen mit Hilfe des anti-murinen TZR- $\beta$ -Ketten-spezifischen Antikörpers (anti-mTZR) nachzuweisen. Unter den TZR<sup>+</sup> T-Zellen wurden zusätzlich nur die CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgewählt. Die Auswahl der TZR-D115- und -T58-positiven T-Zellen erfolgte anhand FITC-positiver Zellen, da diese innerhalb der Vektoren Expressionskassetten für GFP enthalten. Bei den ZTL war eine zusätzliche Einschränkung nach der Auswahl an CD45<sup>+</sup> Zellen nicht nötig, da es sich bei diesen um eine homogene Zellpopulation handelt.

## Methoden



**Abbildung 5-2: Darstellung der Auswahlfensterpositionierung zur Identifikation der gewünschten T-Zellen**

Mit Hilfe des Auswerteprogramms FlowJo wurden die gewünschten Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) ausgewählt. Über 7-AAD-positive Färbung wurden die toten Zellen und über die Höhe (FSC-H) gegen die Fläche (FSC-A) Dubletten ausgeschlossen. Tumorzellen wurden über CD45-negativ, T2-Zellen über CD19-positiv ausgeschlossen. Die für den jeweiligen TZR positive T-Zellen wurden mittels eines Antikörpers gegen den murinen Teil des TZR (TZR53) bzw. über FITC-Positivität (TZR-D115 bzw. -T58) identifiziert.

## **5.6 Stimulation von T-Zellen zur Degranulation und Zytokinproduktion**

Der ZTL-Klon JB4 wurde entweder über den TZR durch TZR-Ligand-positive (TZR-L<sup>+</sup>) Tumorzellen RCC26 oder über PMA plus Ionomycin (PMA/I), stimuliert. Auch die für den TZR53-positive T-Zellen wurden über die Zielzelle RCC26 stimuliert, die für den tyrosinasespezifischen TZR-D115- oder -T58-positive T-Zellen wurden über Tyrosinase-Peptid-beladene T2-Zellen oder Tyrosinase-positive Tumorzellen Mel624.38 stimuliert. Die Stimulation erfolgte jeweils für 5 h bei 37 °C/6,5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zytokinproduktion und die Degranulation abgefragt.

### **5.6.1 Stimulation mit TZR-Ligand-positiven Zellen**

Die Stimulation von T-Zellen mit TZR-Ligand-positiven (TZR-L<sup>+</sup>) Zellen erfolgte in einem Verhältnis von 1:2 (2 x 10<sup>5</sup> T-Zellen mit 4 x 10<sup>5</sup> Zielzellen). Die Zellen wurden gezählt und anschließend in der richtigen Konzentration in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Da die Stimulation meist in verschiedenen Milieubedingungen durchgeführt wurde, wurde das FACS-Röhrchen mit Effektor- und TZR-L<sup>+</sup> Zellen anschließend für 5 min bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 200 µl des entsprechenden Mediums aufgenommen.

### **5.6.2 Stimulation mit PMA plus Ionomycin**

Die Stimulation über PMA und Ionomycin geschieht nicht über den TZR. PMA ist ein DAG-Homolog und greift somit distal in die Signalkaskade von PLC<sub>γ</sub> ein. Ionomycin ist ein Ionophor, welches einen Kalziumflux in die Zelle bewirkt, der zur Aktivierung von NFAT führt. 2 x 10<sup>5</sup> T-Zellen wurden für 5 min bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) abzentrifugiert, gezählt und in FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen im FACS-Röhrchen wiederum für 5 min bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 200 µl des entsprechenden Mediums aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 50 ng pro ml PMA und 500 ng pro ml Ionomycin.



### **5.6.3 Stimulation von TZR-D115- bzw. -T58-positiven T-Zellen mit tyrosinasepeptidbeladenen T2-Zellen**

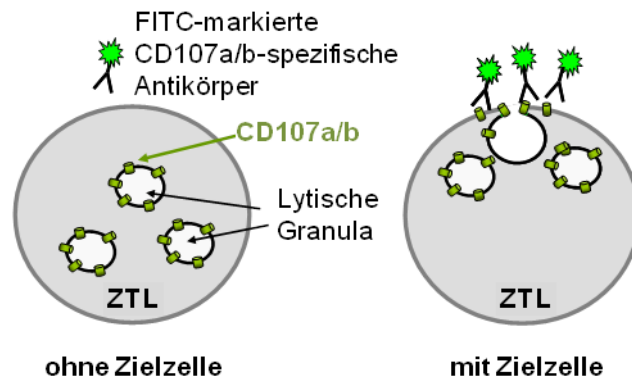
TZR-D115- und -T58-positive T-Zellen, welche tyrosinasespezifisch sind, wurden mittels Tyr-Peptid (YMDGTMSQV) beladener T2-Zellen stimuliert. Bei den T2-Zellen handelt es sich um ein Zellhybrid von T- und B-Lymphoblastoiden, HLA-A2-positiven Zellen, welche eine TAP-Defizienz aufweisen und exogen mit dem gewünschten Peptid beladen werden können. Um T2-Zellen die optimalen Bedingungen für die Peptidbeladung zu schaffen, wurden diese zwei Tage vor der Beladung auf eine Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Dafür wurden sie geerntet, bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) zentrifugiert, gezählt, mit LCL-Medium auf die entsprechende Konzentration gebracht und bis zum Versuch wiederum in eine T75-Zellkulturflasche ausgesät. Für die Beladung wurden die T2-Zellen geerntet, bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) für 5 min zentrifugiert, gezählt und anschließend  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml RPMI 1640 mit 10 % FKS und 10 µg pro ml  $\beta$ 2m aufgenommen und mit der entsprechenden Konzentration an Tyr-Peptid (10 ng/ml und 10 µg/ml) für 2 h bei 37 °C/6,5 % CO<sub>2</sub>, unter mehrmaligem leichtem Schütteln, inkubiert. Nach der Peptidbeladung wurden sie zur Stimulation von T-Zellen verwendet. Dazu wurden zunächst die T-Zellen zu  $2 \times 10^5$  Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert und anschließend 400 µl (entspricht  $4 \times 10^5$  Zellen) der T2-Zellsuspension, welche vorher gut gemischt wurde, hinzu pipettiert. Die FACS-Röhrchen wurden bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) für 5 min abzentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 200 µl entsprechendem Medium aufgenommen.

## **5.7 Nachweis der Effektorfunktion von T-Zellen**

### **5.7.1 Nachweis der Degranulation**

Beim Degranulationstest werden mit Hilfe von fluorchromkonjugierten Antikörpern die Proteine CD107a und CD107b an der T-Zelloberfläche abgegriffen. CD107a (LAMP-1) und CD107b (LAMP-2) sind lysosomale Membranproteine, die bei Zielzellkontakt durch Exozytose der lytischen Granula auf die Zelloberfläche der T-Zellen gelangen.  $2 \times 10^5$  ZTL wurden in

einem Volumen von 200 µl Medium in Anwesenheit von jeweils 6 µl anti-CD107a und anti-CD107b in FACS-Röhrchen für 5 h über verschiedene Stimuli (siehe 5.6) stimuliert. Durch die Anwesenheit der Antikörper während der Stimulation werden alle während der 5-stündigen Inkubation auf die Oberfläche gelangten CD107-Moleküle markiert (siehe Abbildung 5-3).



**Abbildung 5-3: Prinzip des Nachweises der Exozytose**

CD107a und b sind lysosomale Membranproteine. Bei der Ausschüttung der Lysosomen gelangen die CD107-Moleküle an die Zelloberfläche, wo sie durch die CD107a/b-spezifischen, FITC-markierten Antikörper detektiert werden.

ZTL = zytotoxische T-Zelle, FITC: Fluorescein-5-Isothiocyanat

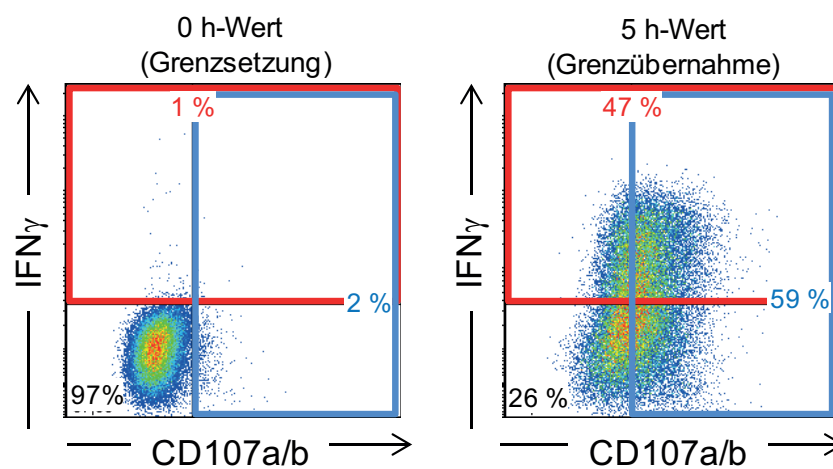
Um die Stimulation zu stoppen, wurden die T-Zellen mit FACS-Azid-Puffer gewaschen und mit der Oberflächenfärbung fortgeföhren. Als 0 h-Kontrolle zum Stimulationsansatz mit Zielzellen wurden T-Zellen, direkt vor der Färbung für die Durchflusszytometrie, mit Zielzellen gemischt. Die Messung erfolgte, wie unter 5.5 beschrieben, am LSRII.

**5.7.2 Nachweis der Zytokinproduktion**

Für die Stimulation der Zytokinproduktion wurden ZTL, wie in 5.6 beschrieben, für 5 h mit Zielzellen oder PMA/I inkubiert. Die Transportinhibitoren, Monensin und Brefeldin A, welche den intrazellulären Proteintransport blockieren und somit zur Akkumulation von Proteinen, auch Zytokinen, führen, waren anwesend. Die Stimulation wurde mit FACS-Azid-Puffer gestoppt und die Zellen für die Durchflusszytometrie gefärbt.

### 5.7.2.1 Durchflusszytometrischer Nachweis der Degranulation bzw. der Zytokinproduktion von T-Zellen

Nachdem die T-Zellen, wie in 5.5.5.1 beschrieben, ausgewählt wurden, wurden diese hinsichtlich ihrer Funktionalität beurteilt. Dazu wurde beispielsweise  $\text{IFN}\gamma$  auf der y-Achse gegen CD107a/b auf der x-Achse aufgetragen. Die Grenzen, anhand welcher die T-Zellen nach positiv und negativ für die einzelnen Fluoreszenzen eingeteilt wurden, wurden über den 0 h-Wert festgelegt und auf alle anderen Stimulationsbedingungen übertragen (siehe Abbildung 5-4).



**Abbildung 5-4: Auswertung der Degranulation und  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von ZTL**

Nachdem die T-Zellen, wie in Abbildung 5-2 beschrieben, identifiziert wurden, wurde über die Auftragung von  $\text{IFN}\gamma$  gegen CD107a/b die stimulierte Funktion der T-Zellen ermittelt. Die Grenzen wurden anhand des 0 h-Werts festgelegt. Im dargestellten Beispiel produzierten 47 % (rote Umrandung) der T-Zellen  $\text{IFN}\gamma$  und 59 % (blaue Umrandung) der T-Zellen degranulierten.

## 5.8 Nachweis von Signalmolekülen mittels Multiplex

Mit Hilfe des Multiplexes können mehrere Proteine oder Zytokine parallel in der gleichen Probe bestimmt und quantifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein Gemisch aus mehreren, über unterschiedliche Farbmischungen kodierte Polymerkügelchen, die jeweils einen kovalent gebundenen Antikörper tragen, der gegen ein bestimmtes Protein gerichtet ist. Durch die verschiedenen Farbkodierungen sind theoretisch bis zu 100 Proteine gleichzeitig in einer Probe messbar. Anschließend wird ein Gemisch aus biotinylierten Antikörpern zugegeben, die alle jeweils ein anderes Epitop des gleichen Proteins wie der jeweilige beadgekoppelte Antikörper erkennt.

Gebundene Zweitantikörper werden anschließend über Streptavidin-PE (Reporterfluoreszenz) fluoreszenzmarkiert. Bei der Auswertung werden zunächst alle Kügelchen durch ihre Größe ausgewählt und dann anhand ihrer spezifischen Farbe unterschieden. Ob ein bestimmter Faktor in der Probe anwesend war, zeigt sich daran, dass das entsprechend farbige Kügelchen PE-fluoreszenzmarkiert ist. Die Konzentration des Faktors in der Probe spiegelt sich in der Intensität der Fluoreszenz wider.

### **5.8.1 Phosphoprotein- und Gesamtprotein-Multiplex**

#### **5.8.1.1 Stimulation von T-Zellen zur Phosphorylierung von Signalmolekülen der TZR-Kaskade**

Die Stimulation von T-Zellen führt zur Aktivierung von Signalmolekülen entlang der Signalkaskade vom TZR ins Innere der Zelle. Die Signalweiterleitung basiert meist über Proteinphosphorylierung, welche mit Hilfe des Multiplexes nachgewiesen werden kann. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte über die Kreuzvernetzung von CD3 mit Antikörpern.

Die zu stimulierenden T-Zellen wurden bei 1500 rpm (Megafuge 5.0R, Heraeus) für 5 min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in 200 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zunächst wurden 40 µl abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, um den Phosphorylierungszustand vor Stimulation zu ermitteln. Zu den verbleibenden Zellen wurde 1 µg pro ml anti-CD3-Antikörper (OKT3) zupipettiert und für 10 min inkubiert. Die Inkubation erfolgte auf Eis, um ein Aktivierungssignal ohne CD3-Kreuzvernetzung zu vermeiden. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Medium und anschließender Zentrifugation bei 13000 rpm (Eppendorfszentrifuge Galaxy Ministar, VWR) für 1 min gestoppt und nicht gebundener OKT3-Antikörper gewegewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Nach einer einminütigen Aufwärmphase der T-Zellen im Wasserbad bei 37 °C wurden die CD3-gebundenen Antikörper über die Zugabe von 10 µg pro ml F(ab)<sub>2</sub> Ziege-anti-Maus IgG quervernetzt. Nach jeweils 1 min, 5 min, 15 min und 30 min wurde jeweils ein Viertel (24 µl) der

Zellsuspension aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß abgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß, mit 1 ml vorgelegtem eisgekühltem PBS, überführt, um die Stimulation zu stoppen. Die T-Zellen wurden bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge Galaxy Ministar, VWR) bei 4 °C für 1 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen und das Zellpellet anschließend in 25 µl Lysepuffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen für 5 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der die Proteine enthielt, geerntet. Die Proben wurden 1:1 mit dem im Kit enthaltenen „Assay“-Puffer, welcher die Proteine stabilisiert, verdünnt und bis zum Einsatz in den Phosphoprotein-Multiplex bei -20 °C gelagert. Wenn möglich, wurden pro Stimulationszeitpunkt  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet.

### 5.8.1.2 Ermittlung der Proteinkonzentration nach BCA

Bevor die Lysate im Phosphoprotein- und Gesamtprotein-Multiplex verwendet wurden, war es nötig, die Proteinkonzentration zu ermitteln, um sicherzustellen, dass die gleiche Konzentration an Protein für alle Proben eingesetzt wurde. Die Zelllysate wurden direkt vor Verwendung im Multiplex auf Eis aufgetaut und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Lysate über den „BCA Protein Assay Kit“ ermittelt. Zunächst wurde der beigefügte Proteinstandard (BSA = bovine serum albumine) in destilliertem Wasser verdünnt, um eine Konzentrationsreihe von 200 µg pro ml bis 0,5 µg pro ml zu generieren. Anschließend wurden die Lysate mit destilliertem Wasser 1:20 verdünnt und jeweils 150 µl in Doppelwerten in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Daraufhin wurde die Arbeitslösung zu 25 Teilen mit der im Kit enthaltenen Lösung A, 24 Teilen Lösung B und 1 Teil Lösung C frisch angesetzt und 150 µl auf die Proben in die 96-Loch-Platte pipettiert. Die Platte wurde kurz auf dem Schüttler gemischt und anschließend für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 562 nm und die daraus resultierende Proteinkonzentration erfolgte am „ELISA reader *sunshine*“ mithilfe der Standardkurve, die anhand der bekannten Standardkonzentrationen erstellt wurde. Es wurde der Mittelwert aus Doppelwerten berechnet. Für den ZTL-Klon JB4 wurden etwa 30 µg - 50 µg Protein pro  $1 \times 10^6$  Zellen gemessen.

### **5.8.1.3 Durchführung des Phosphoprotein- und Gesamtprotein-Multiplexes**

Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Nachdem die Proteinkonzentration der Lysate über BCA ermittelt worden war, wurden die einzelnen Proben mit einem Gemisch von 1:1 Lysepuffer/„Assay“-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 300 µg pro ml eingestellt. Es wurden 60 µl Verdünnung hergestellt, von denen letztlich 50 µl im Versuch eingesetzt wurden. Die Lysate wurden bis zum Auftragen auf die Filterplatte auf Eis aufbewahrt.

Zunächst wurde die im Kit enthaltene Filterplatte mit 100 µl pro Loch Waschpuffer angefeuchtet. Dieser wurde sofort mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch den Filter gesaugt, wobei darauf zu achten war, dass der Sog der Vakuumpumpe nicht zu stark war, um Schäden an der Platte zu vermeiden. Anschließend wurden 50 µl, der zuvor 1:60 verdünnten Polymerkügelchen pro Loch pipettiert. Diese wurden sofort zweimal mit 100 µl pro Loch „Assay“-Puffer gewaschen, indem der Puffer auf die Platte pipettiert und über die Vakuumpumpe wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurden 50 µl der vorverdünnten Lysate bzw. der im Kit enthaltenen Kontrolllysate (Tabelle 5-3), auf die Platte pipettiert. Die Filterplatte wurde mit Folie abgeklebt, auf dem Schüttler für 30 sek bei 1100 rpm geschüttelt und anschließend über Nacht (15 h bis 18 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Lysate auf der Absaugereinheit durchgesaugt und die Platte dreimal mit 100 µl pro Loch Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde die benötigte Menge an Detektionsantikörpern mit „Detektionsantikörper-Puffer“ 1:25 verdünnt und 25 µl pro Loch pipettiert. Die Platte wurde auf dem Schüttler bei 1100 rpm für 30 sek geschüttelt und anschließend unter Schütteln (300 rpm) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Detektionsantikörper durch den Filter gesaugt und die Platte dreimal mit 100 µl pro Loch Waschpuffer gewaschen. Die benötigte Menge an Streptavidin-PE wurde 1:100 verdünnt und 50 µl pro Loch aufgetragen. Nach einer 30-sekündigen Schüttelphase bei 1100 rpm folgte eine 10-minütige Inkubation unter Schütteln (300 rpm) bei Raumtemperatur. Das Streptavidin-PE wurde anschließend durchgesaugt und die Platte 3x mit 100 µl Waschpuffer pro Loch gewaschen. Letztendlich wurden 125 µl

Resuspensionspuffer auf die Platte gegeben und die Messung am „Bioplex Array-Reader“ durchgeführt.

**Tabelle 5-3: Im Bio-Plex enthaltene Kontrolllysate für Phosphoproteine und Gesamtproteine**

<b>Lysat</b>	<b>Kontrolle für</b>
EGF behandelte HEK 293	AKT (Ser473), ERK1/2 (Thr202/204), GSK3a/b (Ser21/Ser9), MEK1 (Ser217/Ser221)
UV-behandelte HEK293	c-Jun (Ser63), JNK (Thr183/Tyr185), p38 MAPK (Thr180/Tyr182)
Phosphatase-behandelte HeLa	Hintergrundkontrolle für alle Phosphoproteine
Unbehandelte HeLa	Positivkontrolle für alle Gesamtproteine

#### 5.8.1.4 Messung und Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte am „Bioplex-Array-Reader“ (LABScanTM100) unter „High Calibration“ Bedingungen nach Kalibrierung mit Bioplex Kalibrierungsmikrosphären mit der Bioplex-Software. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten im Kit enthaltene, in Tabelle 5-3 aufgeführte, Multiplex-Kontrolllysate. Die einzelnen Proben wurden im Gerät verschiedenen Gruppen zugeordnet. Innerhalb der Gruppen wurde jeweils eine Probe als Referenzprobe bestimmt, zu der die anderen Proben derselben Gruppe in Bezug gesetzt wurden. Alle Proben, die im gleichen Medium über verschiedene Zeiträume stimuliert wurden, wurden einer Gruppe zugeordnet. Als Referenzwert wurde jeweils die unstimulierte Probe bestimmt und die Proben, welche über verschiedene Zeiträume (1 min, 5 min, 15 min und 30 min) stimuliert wurden, zu dieser in Bezug gesetzt. So wurde die veränderte Phosphorylierung nach Stimulation im Zeitverlauf dargestellt (siehe Abbildung 6-22 im Ergebnisteil).

#### 5.8.2 Zytokin-Multiplex

Der simultane Nachweis von 27 Zytokinen in Zellüberständen erfolgte mit Hilfe des Zytokin-Multiplex. Die folgenden Zytokine wurden vermessen und

quantifiziert: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12p70, IL-15, IL-17, IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1ra, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IL-8, IP-10, FGF-basisch, PDGF, VEGF, IL-5, Eotaxin, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , MCP-1, Rantes, IL-7.

### 5.8.2.1 Durchführung des Zytokin-Multiplexes

Für die Bestimmung von Zytokinen wurden Zellkulturüberstände eingesetzt. Die Durchführung des Multiplexes erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Vor Beginn des Versuchs wurde der beigefügte Standard in 500  $\mu$ l des für die Zellkulturüberstände verwendeten Mediums gelöst. In diesem Standard befinden sich verschiedene Zytokine in jeweils definierter Konzentration. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C wurden 128  $\mu$ l dieser Stocklösung in 72  $\mu$ l Medium aufgenommen. Die Standardreihe wurde durch eine 1:4-Verdünnungsreihe gebildet.

Zunächst wurde die beigefügte Filterplatte mit 100  $\mu$ l pro Loch „Assay“-Puffer angefeuchtet. Nachdem dieser mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch den Filter gesaugt worden war, wurden 50  $\mu$ l pro Loch der zuvor 1:28 verdünnten Kügelchen auf die Platte pipettiert. Diese wurden sofort zweimal mit 100  $\mu$ l pro Loch „Assay“-Puffer gewaschen, indem der Puffer auf die Platte pipettiert und über die Vakuumpumpe wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der Standardreihe sowie Medium als Hintergrund in Duplikaten und 50  $\mu$ l der Proben als Einzelwerte aufgetragen. Nach einer 30-sekündigen Schüttelphase bei 1100 rpm folgte eine 30-minütige Inkubation unter Schütteln (300 rpm) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Platten 3x mit „Assay“-Puffer gewaschen und mit 25  $\mu$ l pro Loch 1x Detektionsantikörpern versehen. Die Platte wurde wieder kurz bei 1100 rpm, dann für 30 min bei 300 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 3x gewaschen. Daraufhin wurden pro Loch 50  $\mu$ l 1x Streptavidin-Antikörper, hergestellt aus einer 100x Stocklösung, auf die Platte pipettiert und für 10 min auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Die Platte wurde 3x gewaschen und pro Loch mit 125  $\mu$ l „Assay“-Puffer versetzt. Bis zur Messung wurde die Filterplatte auf dem Schüttler verwahrt.



### 5.8.2.2 Messung und Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte am „Bioplex-Array-Reader“. Bevor diese begonnen werden konnte, wurde das Gerät mit Hilfe von Kalibrierungsmikrosphären kalibriert. Das Gerät misst die verschiedenen Intensitäten der Standardproben und berechnet aus diesen Werten mit Hilfe eines 5-Parameter-Algorithmus eine Standardkurve für jedes Zytokin. Gemessene Probenwerte wurden anhand der zugehörigen Standardkurve als Konzentrationswerte in pg/ml ausgegeben. In Tabelle 5-4 sind die im Experiment erhaltenen (nicht die vom Hersteller angegebenen) Detektionsgrenzen der verschiedenen Zytokine angegeben.

**Tabelle 5-4: Im Zytokin-Multiplex enthaltene Zytokine mit Messbereichen**

Zytokin	Untere Detektionsgrenze [pg/ml]	Obere Detektionsgrenze [pg/ml]
IL-1 $\beta$	3	10000
IL-1ra	200	70000
IL-2	30	4000
IL-4	10	2000
IL-5	20	2000
IL-6	10	25000
IL-7	20	10000
IL-8	5	10000
IL-9	20	20000
IL-10	5	25000
IL-12p70	5	30000
IL-13	20	10000
IL-15	1	20000
IL-17	70	35000
Eotaxin	30	65000
IFN $\gamma$	800	35000
IP-10	100	80000
FGF-basisch	10	20000
G-CSF	80	10000

GM-CSF	200	12000
MCP-1	1	7000
MIP1 $\alpha$	1	600
MIP1 $\beta$	3	3000
PDGF	30	20000
Rantes	10	3000
TNF $\alpha$	20	20000
VEGF	30	40000

### 5.8.3 Nachweis von TGF- $\beta$ mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Der Nachweis von TGF- $\beta$  erfolgte mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) nach der „Sandwich-Methode“.

Zunächst werden zytokinspezifische Antikörper (Capture-Antikörper) an eine 96-Loch-Platte gebunden. Diese Antikörper binden das in der Probe befindliche Zytokin. Ein zweiter Antikörper (Detektions-Antikörper), welcher mit Biotin markiert ist, bindet ein zweites Epitop desselben Zytokins. Anschließend wird Meerrettich-Peroxidase-gebundenes Avidin zugegeben, welches an das Biotin des Detektions-Antikörpers bindet. Die Peroxidase spaltet das zugegebene Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in ein farbiges Produkt. Die Farbintensität ist dabei direkt proportional zu der umgesetzten Substratmenge und somit zur gebundenen Menge an Zytokin. Das durch die Meerrettich-Peroxidase umgesetzte Produkt kann spektralphotometrisch detektiert werden. Durch eine mitgeführte Standardverdünnungsreihe mit rekombinantem Zytokin kann die Zytokinkonzentration der experimentellen Probe ermittelt werden.

#### 5.8.3.1 Durchführung des TGF- $\beta$ -ELISA

Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden 100  $\mu$ l pro Loch einer 96-Loch-Platte von Capture-Antikörper, welcher 1:250 mit „Coating Puffer“ verdünnt worden war, pipettiert und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die

Platte 5x mit 250 µl Waschpuffer pro Loch gewaschen. Dabei wurde zwischen jedem Waschschrift ca. 1 min inkubiert. Anschließend wurde „Assay diluent“ 1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt und pro Loch 200 µl pipettiert. Dieser Schritt diente dazu, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde die Platte wiederum 5x mit 250 µl Waschpuffer pro Loch gewaschen. TGF-β wird in einer latenten, inaktiven Form von den Zellen sezerniert und muss, bevor es an seine Rezeptoren binden kann, aktiviert werden. Da die Capture-Antikörper nur das aktive TGF-β erkennen, wurde das latente TGF-β in den Kulturüberständen durch Azidifizierung und anschließende Neutralisierung aktiviert, bevor die Proben auf die Platte pipettiert wurden. Dazu wurden 20 µl 1 N HCl auf 100 µl Probe gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Neutralisation, indem 20 µl 1 N NaOH pipettiert wurden. 100 µl der säureaktivierten Proben sowie 100 µl der unbehandelten Proben, wurden zusammen mit der unbehandelten Standardreihe in T-Zell-Medium, in welchem die Zellkulturüberstände auch angesetzt worden waren, auf die Platte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte zunächst 5x mit 250 µl Waschpuffer pro Loch gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Detektionsantikörper, welcher zuvor 1:250 mit „Assay diluent“ verdünnt worden war, pro Loch pipettiert und die Platte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurde die Platte 5x mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Nun wurden 100 µl von Meerrettich-Peroxidase-gebundenem Avidin, welches zuvor 1:250 mit „Assay diluent“ verdünnt worden war, pro Loch zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 7 Waschschriften mit 250 µl Waschpuffer wurden 100 µl Substrat-Lösung pro Loch pipettiert. Durch die Substratumsetzung erfolgte ein Farbumschlag, der nach 15 min mit 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt wurde.

### **5.8.3.2 Messung und Auswertung des ELISA**

Die optische Dichte der jeweiligen Proben wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm am „ELISA reader *sunshine*“ gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden. Es wurde der Mittelwert aus Doppelwerten berechnet. Der Messbereich des ELISAs lag zwischen 5 pg/ml und 1000 pg/ml. Nach Säureaktivierung wurden im Medium ca. 14

pg/ml gemessen. Dieser Wert wurde als Hintergrund von den einzelnen Proben abgezogen. Ohne Säureaktivierung lag die Konzentration im Medium unterhalb der Nachweisgrenze.

#### **5.8.4 Chromfreisetzungstest**

Um die lytische Aktivität der T-Zellen (engl. cell mediated lysis, CML) gegenüber verschiedenen Zielzellen zu untersuchen, wurde der Chromfreisetzungstest angewandt. Das Prinzip besteht darin, dass bei Lyse der mit radioaktivem Chrom  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Zielzellen das Chrom aus den Zellen freigesetzt wird. Die Zelllyse wird anhand der Radioaktivität im Überstand nachgewiesen und quantifiziert.

##### **5.8.4.1 $^{51}\text{Cr}$ -Markierung der Zielzellen**

Zunächst wurden die Zielzellen mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert. Dazu wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  FKS aufgenommen und 50  $\mu\text{Ci}$  des  $^{51}\text{Cr}$ -Natriumchromats zu den Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C/6,5 %  $\text{CO}_2$  für 1 h. Während der Inkubationszeit wird das  $^{51}\text{Cr}$  von den Zellen aufgenommen. Nach der Inkubation wurden die Zielzellen zweimal mit 5 ml CML-Medium gewaschen, um nicht in die Zellen aufgenommenes  $^{51}\text{Cr}$  zu entfernen. Die gewaschenen Zellen wurden auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^3$  Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  eingestellt.

##### **5.8.4.2 Durchführung der CML**

Die Effektorzellen wurden je nach gewünschtem Verhältnis von Effektorzelle zu Zielzelle in 50  $\mu\text{l}$  pro Loch einer 96-Loch-Spitzbodenplatte pipettiert. Darauf wurden  $2 \times 10^3$   $^{51}\text{Cr}$ -beladene Zielzellen in 50  $\mu\text{l}$  hinzupipettiert. Es wurden Doppelwerte angesetzt. Zusätzlich wurden in zwei Löcher nur 50  $\mu\text{l}$  Zielzellen mit 50  $\mu\text{l}$  CML-Medium ohne Effektorzellen pipettiert, um die spontane Chromfreisetzung zu ermitteln. Außerdem wurden 50  $\mu\text{l}$  der Zielzellsuspension sofort auf eine Vertiefung einer Filterplatte (Luma-Platte) übertragen, um das maximal in den Zellen eingebaute  $^{51}\text{Cr}$  zu ermitteln. Die Inkubation von Effektorzellen mit Zielzellen erfolgte für 4 h bei 37 °C/6,5 %

CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wurde aus allen Wells 50 µl des Überstands auf eine Lumaplatte übertragen, welche über Nacht zum Trocknen unter den Abzug gestellt wurde.

### 5.8.4.3 Messung und Auswertung

Lumaplatten sind 96-Well-Mikroplatten, die einen festen Szintillator enthalten. Dieser wird beim Durchdringen von Gammastrahlung angeregt. Die Energie wird dann in Form von Licht wieder abgegeben, welches am Szintillationszähler „TopCount“ gemessen werden kann. Von den gemessenen „counts per minute“-Werten (cpm) aller Duplikate wurde der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der spezifischen Zellyse der Zielzellen durch die Effektorzellen erfolgte anschließend anhand der Mittelwerte über folgende Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)}}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)}/2) - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (cpm)}} \times 100$$

Die spontane Lyse (<sup>51</sup>Cr-Freisetzung ohne Zielzellen) errechnet sich aus der Division des „Spontan-Werts“ durch den „Maximal-Wert“. Dieser sollte 20 % nicht überschreiten, da dies für einen schlechten Ausgangszustand der Zielzellen spricht. Die Spontanwerte aller Versuche lagen zwischen 4,4 % und 16 %.

## 5.9 Statistische Analysen

Für die Berechnung von Signifikanzen zwischen verschiedenen Proben wurde das Programm „GraphPad Prism“ verwendet (San Diego, California, USA). Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Testverfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha < 0,05$  angenommen.

### 5.9.1 Mann-Whitney-U Test

Der Mann-Whitney-U Test (äquivalent zum Wilcoxon-Rangsummentest) ist ein nichtparametrisches Testverfahren, welches daher für die statistische Untersuchung von geringen Probenanzahlen und nicht normalverteilten Daten geeignet ist. Der Mann-Whitney-U Test untersucht bei einer zweiseitigen Fragestellung, ob sich die Alternativhypothese signifikant von

der Nullhypothese unterscheidet, also ob der Mittelwert einer Gruppe A signifikant unterschiedlich ist zu einem Mittelwert einer Gruppe B.

### **5.9.2 Kruskal-Wallis-Test**

Der „H-Test“ nach Kruskal und Wallis ist ein nichtparametrisches Verfahren zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen.

Es handelt sich um einen parameterfreien statistischen Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse getestet wird, ob sich Proben im Bezug ihres Mittelwerts voneinander unterscheiden. Voraussetzungen für den Test sind unabhängige Stichproben, eine stetige Verteilung und ordinalskalierte Daten.

### **5.9.3 Post-Hoc-Test (ANOVA)**

Gibt es signifikante Abweichungen zwischen Mittelwerten (d.h.  $p < 0,05$  beim Kruskal-Wallis-Test), so können paarweise multiple Vergleiche mit Hilfe des Post-Hoc-Test nach ANOVA (Analysis of Variance, Varianzanalyse) untersucht werden, um zu ermitteln, welche Mittelwerte sich unterscheiden. Die Differenz zwischen zwei Mittelwerten wird mit paarweisen Mehrfachvergleichen untersucht. Die Gruppenmittelwerte, die sich auf Grund eines Alpha-Niveaus von 0,05 signifikant voneinander unterscheiden, werden durch Sterne markiert. Bei Anwendung des Post-Hoc-Spannweitentests nach Dunn (auch Bonferroni genannt) können auch paarweise Vergleiche zwischen Gruppenmittelwerten mit dem T-Tests durchgeführt werden. Dabei wird die Gesamtfehlerrate mit einbezogen, indem die Fehlerrate jedes einzelnen Tests auf den Quotienten aus der experimentellen Fehlerrate und der Gesamtzahl der Tests gesetzt wird. Dadurch wird das beobachtete Signifikanzniveau an Mehrfachvergleiche angepasst.

### **5.9.4 Korrelationsanalyse nach Spearman**

Der Zusammenhang zwischen zwei Variablen wird mit einem sogenannten Korrelationskoeffizient bestimmt. Es wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für nichtparametrische Testverfahren verwendet. Im Gegensatz zum Pearson-Korrelationskoeffizient für parametrische Daten

muss die Beziehung zwischen den Variablen nicht linear sein, wodurch die Analyse robust gegenüber Ausreißern ist. Für jede Korrelation ergibt sich ein Korrelationskoeffizient „Rho“, der positiv ist, wenn es sich um eine direkte Korrelation handelt, und negativ ist, wenn die Korrelation invers ist. Zu diesem Korrelationskoeffizient Rho gehört ein p-Wert, der die Signifikanz der Korrelation angibt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Einfluss des Tumormilieus auf die Funktion zytotoxischer T-Zellen

Mehrere Arbeiten zeigen einen inhibitorischen Einfluss des Tumormilieus. Trotzdem sind die genauen Ursachen und Details zum Inhibitionsmechanismus bisher noch nicht im Detail aufgeklärt. Beschriebene Inhibitionsfaktoren sind lösliche Faktoren, wie beispielsweise Zytokine oder Nukleoside, welche in verschiedenen Modellen die Proliferation, die Zytotoxizität und Zytokinproduktion von T-Zellen inhibieren, aber auch Zell-Zell-Interaktionen, zwischen T-Zellen und myeloischen Suppressorzellen, regulatorischen T-Zellen oder Tumorzellen sind beschrieben.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die Inhibitionsmechanismen des Tumormilieus aufgeklärt werden und unter anderem die relative Bedeutung zellulärer Einflüsse gegenüber löslichen Komponenten für die Inhibition der T-Zell-Funktion untersucht werden. Insbesondere sollte analysiert werden, wie die verschiedenen Funktionen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche im Wesentlichen die Produktion proinflammatorischer Zytokine (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2) und die Zytotoxizität sind, durch das Tumormilieu betroffen sind.

Um diese Fragen zu klären, wurden verschiedene In-vitro-Tumorzellkulturmodelle verwendet. Zum einen wurden Tumorzellen in unterschiedlicher Zelldichte angelegt, um Tumoren unterschiedlicher Größe nachzustellen. Diese Zellkulturen wurden unterschiedlich lange vorkultiviert, um ein von Tumorzellen konditioniertes, lösliches Milieu zu generieren. CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen (T<sub>EFF</sub>-Zellen), also zytotoxisch differenzierte T-Zellen, wurden zu den Milieus gegeben und ihre Funktion unmittelbar bei Kontakt mit dem Milieu, durch Stimulation über den TZR, abgefragt. In diesem Tumormodell sind die CD8 T<sub>EFF</sub>-Zellen sowohl multiplen zellulären Interaktionen mit Tumorzelloberflächen, als auch den von Tumorzellen produzierten löslichen Faktoren ausgesetzt. Anzumerken ist, dass die Tumorzellen, die das Tumormilieu bildeten, so ausgewählt wurden, dass sie selbst keine TZR-Liganden für die CD8 T<sub>EFF</sub>-Zellen exprimierten, um nicht den durch Überaktivierung natürlich auftretenden Erschöpfungszustand auszulösen. Auch in der natürlichen Tumorsituation wird eine individuelle T<sub>EFF</sub>-Zelle bei Eintritt ins Tumormilieu überwiegend mit Tumorzellen



konfrontiert, welche keinen zum individuellen TZR der T-Zelle passenden Liganden präsentiert (Romero et al., 1998; Benlalam et al., 2001; Seiter et al., 2002; Meidenbauer et al., 2004). Die für die Versuche ausgewählte TZR-Ligand-negative (TZR-L<sup>-</sup>) Tumorzelle war die Nierenzellkarzinomlinie KT195. Als T<sub>EFF</sub>-Zellen wurden zytotoxische ZTL-JB4 und T-Zellen, die nach Transduktion den TZR-D115, -T58 oder -53 exprimierten, verwendet. Die ZTL und die TZR53<sup>+</sup> T-Zellen erkennen HLA-A2<sup>+</sup> RCC26-Tumorzellen (Leisegang et al., 2010). Die TZR-D115<sup>+</sup> und -T58<sup>+</sup> T-Zellen erkennen ein Peptid der Tyrosinase. TZR-D115 ist von niedriger funktioneller Avidität und braucht eine höhere Ligandendichte, um eine vergleichbare Funktion wie TZR-T58 zu erreichen (Wilde et al., 2009). Als Funktionen wurden die Zytokinproduktion und die Exozytose lytischer Granula, welche der erste Schritt zur Zytotoxizität ist, abgefragt.

Im nächsten Schritt wurde das Tumormodell schrittweise vereinfacht, um für die Inhibition der T-Zell-Funktion verantwortliche Faktoren zu identifizieren. Zunächst wurden die Tumorzellen fixiert, so dass sie nur noch Oberflächeninteraktionen für die T<sub>EFF</sub>-Zellen bereitstellen, aber keine Milieukonditionierung durchführen können.

In einem weiteren Schritt wurde die Rolle des zellfreien Tumormilieus (zTM) für die T-Zell-Funktion untersucht. Dazu wurde das durch Tumorzellwachstum konditionierte zellfreie Medium verwendet. Hierfür wurden Tumorzellen in unterschiedlicher Dichte für 40 h kultiviert und anschließend die Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus) vom Medium abgetrennt. Um auch Zelltrümmer zu entfernen, wurde der Überstand letztlich über einen 0,22 µm Filter filtriert.

### **6.1.1 Beeinflussung der ZTL-Funktion durch zelluläre Interaktionen zwischen ZTL und Tumorzellen in Anwesenheit eines etablierten extrazellulären löslichen Tumormilieus.**

Um die T<sub>EFF</sub>-Zell-Funktion nach Infiltration in einen Tumor zu testen, wurde der zytotoxische T-Zellklon JB4 zu einer Kultur aus Tumorzellen gegeben. Dafür wurden Tumorzellkulturen in verschiedener Dichte angesetzt, welche verschiedene „Tumorgrößen“ nachstellen sollen. Die Zahlenangaben 1x, 5x und 10x beziehen sich jeweils auf das Verhältnis zu den später zugesetzten

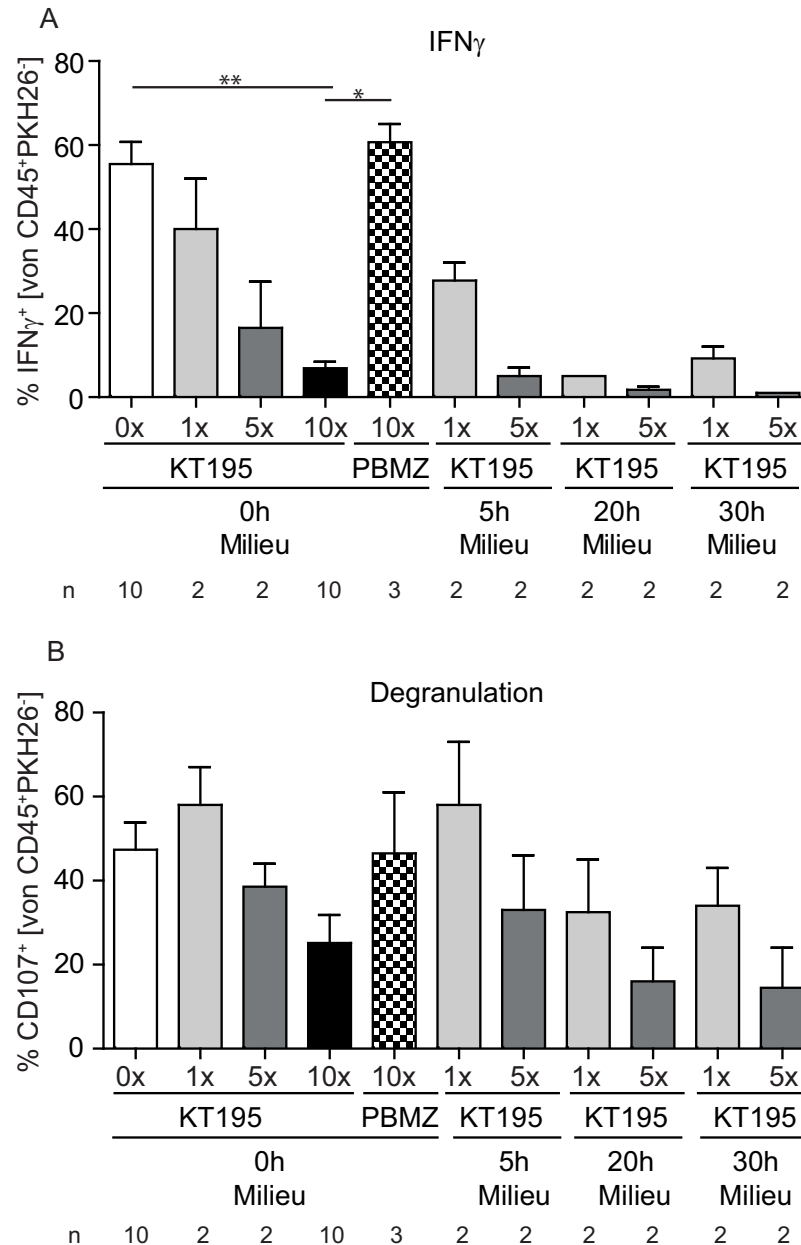
$T_{EFF}$ -Zellen, wobei 10x ein Verhältnis von 10:1 Tumorzellen zu  $T_{EFF}$ -Zellen entspricht, was laut Literaturangaben etwa dem eines „realen“ Tumors entspricht (Mantovani et al., 2008). Die Tumorzellen, welche das „Milieu“ darstellen, waren TZR-Ligand negativ ( $TZR-L^-$ ) und konnten somit keine  $T_{EFF}$ -Stimulation und keinen Funktionsverlust durch  $T_{EFF}$ -Erschöpfung auslösen. Um weiterhin die „Realität“ eines Tumors nachzuahmen, wurden den  $TZR-L^-$  Tumorzellen  $TZR-L^+$  RCC26 Tumorzellen zugemischt, welche als Zielzellen der später zugesetzten  $T_{EFF}$ -Zellen fungieren konnten. Diese Tumorzellkulturen wurden für 0 h, 5 h, 20 h, oder 30 h kultiviert, um unterschiedlich „konzentriertes“ extrazelluläres Milieu zu generieren. Ein „Nicht-Tumor“-Milieu, bestehend aus 10x PBMZ, wurde als Kontrolle angesetzt. Zu den verschiedenen „Milieus“ wurde der zytotoxische  $T_{EFF}$ -Zellklon JB4 zugegeben und für 5 h kokultiviert. In dieser Zeit konnte er mit den  $TZR-L^+$  RCC26 interagieren und gegebenenfalls stimuliert werden. Nach 5 h wurde das Ausmaß der Stimulation anhand des prozentualen Anteils an  $IFN\gamma$  und CD107 positiver ZTL-JB4 durchflusszytometrisch bestimmt und mit dem von ZTL-JB4, die nicht unter Milieueinfluss stimuliert wurden, verglichen. Eine beispielhafte Auswertung der durchflusszytometrischen Messung ist im Methodenteil in Abbildung 5-2 (Seite 46) und Abbildung 5-4 (Seite 50) dargestellt. Die Zusammenfassung der Versuche ist in Abbildung 6-1 zu sehen, wobei die prozentualen Anteile an  $IFN\gamma$  bzw. CD107 positiven JB4 in den jeweiligen Milieus dargestellt sind. Es zeigte sich, dass es in diesem Tumormodell in Abhängigkeit von der Tumorzellichte und der Dauer, über welche sich das Milieu etabliert hatte, zu einer Inhibition der  $IFN\gamma$ -Produktion der in diesem Milieu stimulierten ZTL kam. Ohne Anwesenheit von KT195 (0x) produzierten etwa 55 % der ZTL  $IFN\gamma$ . Die Anwesenheit von  $TZR-L^-$  KT195, ohne etabliertes lösliches Milieu (0-h-Milieu), war bereits ausreichend, um eine Inhibition zu induzieren: So produzierten bei 1x KT195 im Mittel nur noch 40 %, bei 5x nur noch 16 % und bei 10x nur noch 7 % der  $T_{EFF}$ -Zellen  $IFN\gamma$ . Die Inhibition durch das Tumormilieu war noch ausgeprägter, wenn ein durch Vorkultur der Tumorzellen etabliertes Milieu vorlag. Bei 5 h Vorkultur (5-h-Milieu) wurden in Anwesenheit von 1x KT195 im Mittel nur noch 30 % der  $T_{EFF}$ -Zellen zur  $IFN\gamma$ -Produktion stimuliert. Höhere Tumorzellichten ließen kaum noch  $IFN\gamma$ -

Produktion zu. 20-h- und 30-h-Milieus waren auch bei niedriger Zelldichte stark inhibitorisch.

Die Degranulation zeigte das gleiche Inhibitionsmuster wie die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion. Die scheinbare Erhöhung der Degranulation bei Zugabe von 1x KT195 ist auf Schwankungen durch die geringe Versuchswiederholungen zurückzuführen. Die Degranulation war generell weniger stark inhibiert als die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion. Hier war im 20-h-Milieu mit nur noch 16 % degranulierender T-Zellen die maximale Inhibition erreicht. Ohne die Anwesenheit von Tumormiliefaktoren degranulierten 47 % der T-Zellen.

Auf Grund der geringen Versuchswiederholungen waren die beobachteten Unterschiede nicht signifikant.

Die Ergebnisse der 0-h-Milieuansätze zeigten, dass auch ohne Milieuetablierung, das heißt ohne durch Tumorzellwachstum verändertes extrazelluläres Milieu, ab einer bestimmten Zelldichte bereits eine Inhibition der  $T_{\text{EFF}}$ -Zell-Funktion stattfindet. Dies deutet auf einen Inhibitionsmechanismus durch Zell-Zell-Interaktion zwischen Tumorzellen und ZTL hin. Die Anwesenheit von TZR- $L^-$  PBMZ (10x) führte zu keiner Inhibition der T-Zell-Funktion. Daher war die Inhibition durch Zell-Zell-Kontakt tumorzellspezifisch und nicht die Folge einer sterischen Inhibition durch die Anwesenheit einer hohen Zellzahl.

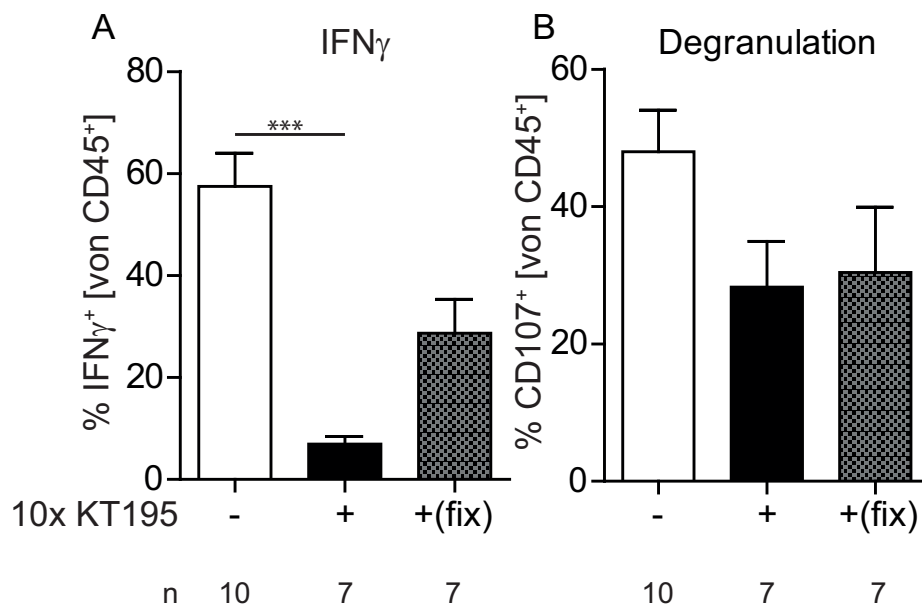


**Abbildung 6-1: IFN $\gamma$  und Degranulation von ZTL-JB4 nach Eintritt in ein etabliertes Tumormilieu**

$2 \times 10^5$  (1x),  $1 \times 10^6$  (5x) und  $2 \times 10^6$  (10x) Tumorzellen der Nierenzellkarzinomlinie KT195 wurden für 0 h, 5 h, 20 h oder 30 h mit jeweils  $4 \times 10^5$  RCC26 kultiviert. Der Ansatz mit 10x TZR-L<sup>-</sup> PBMZ anstelle der KT195 fungierte als „Nicht-Tumor“-Milieu-Kontrolle. Die PBMZ waren PKH26-fluoreszenzmarkiert, um sie von den T<sub>EFF</sub>-Zellen unterscheiden zu können. Zu diesen Milieus wurden  $2 \times 10^5$  ZTL-JB4 gegeben und 5 h in den entsprechenden Milieus inkubiert. Während dieser Zeit konnten die T<sub>EFF</sub>-Zellen durch die im Milieu anwesenden RCC26-Zellen über den TZR stimuliert werden. Die durch die Stimulation ausgelöste IFN $\gamma$ -Produktion und Degranulation wurden anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert. Dazu wurden mittels des Auswerteprogramms Flowjo die T<sub>EFF</sub>-Zellen als CD45<sup>+</sup> Lymphozyten von den CD45<sup>-</sup> Tumorzellen bzw. als PKH26-negativ von den PBMZ unterschieden. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil an IFN $\gamma$  (A) bzw. CD107 (B) positiver Zellen innerhalb der CD45<sup>+</sup> PKH<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen. Die Balken sind der Mittelwert der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente (n = 2 bis 10). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

### 6.1.1.1 Bedeutung zellulärer Interaktionen zwischen Tumorzellen und T-Zellen für die Inhibition der ZTL-Funktion

Um den Einfluss von Zell-Zell-Interaktion auf die ZTL-Funktion zu testen, wurden Tumorzellen fixiert, so dass sie noch zur Zelloberflächeninteraktion fähig sind, aber keine Milieukonditionierung bewerkstelligen können. Abbildung 6-2 zeigt, dass in Anwesenheit fixierter Tumorzellen 30 %, in Anwesenheit lebender Tumorzellen nur 5 % der  $T_{EFF}$ -Zellen  $IFN\gamma$  produzierten. Daher waren fixierte Tumorzellen wesentlich weniger inhibitorisch als lebende. Bei der Degranulation dagegen zeigte sich kein Unterschied zwischen lebenden und fixierten Tumorzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die  $IFN\gamma$ -Produktion sowohl von Zell-Zell-Interaktionen mit Tumorzellen als auch von Tumorzellen sezernierten Faktoren inhibiert wird, wohingegen für die Degranulation im Wesentlichen Zellkontakte inhibitorisch wirken.



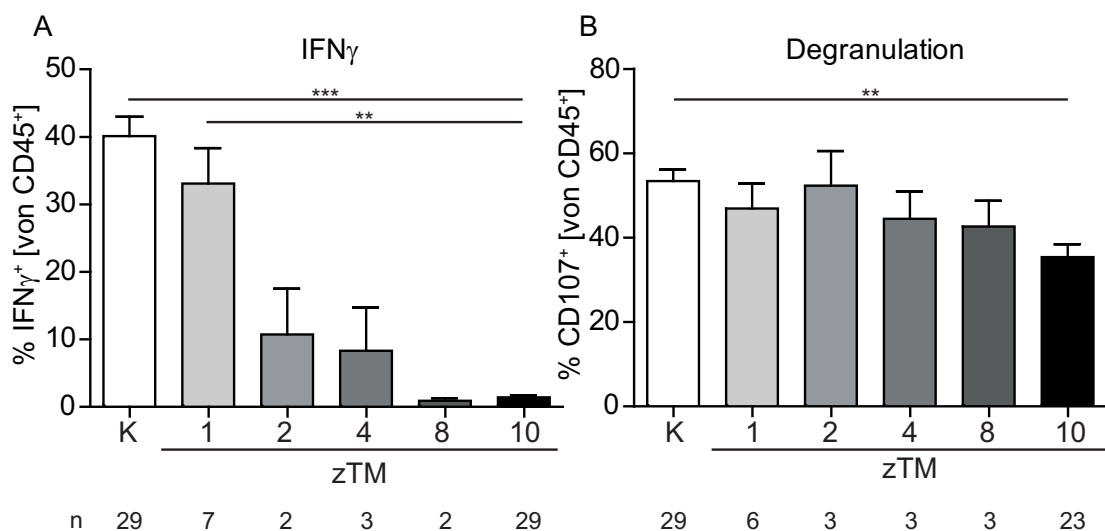
**Abbildung 6-2: Einfluss der zellulären Interaktionen auf die Funktion von ZTL-JB4**

ZTL-JB4 wurden für 5 h mit  $TZR-L^+$  RCC26 in Anwesenheit von fixierten oder unfixierten  $TZR-L^-$  KT195-Tumorzellen (10x) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.  $CD45^-$  Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den  $CD45^+$  ZTL abgetrennt und anschließend die  $IFN\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente (n = 7 bis 10). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*\*p < 0,001).

### 6.1.1.2 Einfluss des zellfreien Tumormilieus auf die Funktion von T-Zellen

Um die Rolle des durch Tumorzellwachstum etablierten Milieus unabhängig von Zell-Zell-Interaktionen bei der Inhibition der T-Zell-Funktion zu untersuchen, wurden zellfreie Tumormilieus (zTM) generiert, indem  $5 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6$  Tumorzellen in 1 ml Medium für 40 h kultiviert wurden. Um Zellen und Zelltrümmer aus den Überständen zu entfernen, wurden diese für 5 min bei 1500 rpm (Megafuge 2.0R, Hereaus) zentrifugiert und anschließend zusätzlich über einen  $0,22 \mu\text{m}$  Filter filtriert (siehe Methoden 5.3.4). Die verschiedenen zellfreien Tumormilieus werden entsprechend ihrer zur Generation verwendeten Zelldichte als zTM<sub>1</sub> bis zTM<sub>10</sub> bezeichnet.

ZTL wurden in diesen zTM über den TZR mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 stimuliert und die IFN $\gamma$ -Produktion sowie die Degranulation im Vergleich zur Stimulation der ZTL im Medium bestimmt (siehe Abbildung 6-3).

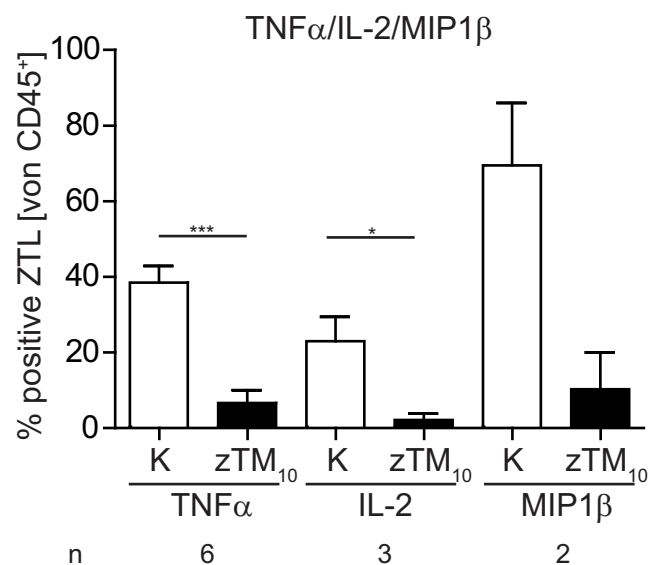


**Abbildung 6-3: Reduktion der TZR-stimulierten IFN $\gamma$ -Produktion und Degranulation durch das zellfreie Tumormilieu**

ZTL-JB4 wurden in zTM verschiedener Tumorzelldichten (zTM<sub>1</sub> =  $5 \times 10^5$  KT195 pro 1 ml Medium; zTM<sub>10</sub> =  $5 \times 10^6$  KT195 pro 1 ml für 40 h kultiviert) mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden ZTL in Medium stimuliert (K). CD45<sup>-</sup> RCC26 wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente (n = 2 bis 29). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Es zeigte sich, dass die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion bereits im zTM niedriger Tumorzell-dichte ( $\text{zTM}_1$ ) um 15 % reduziert war und im zTM einer hohen Tumorzell-dichte ( $\text{zTM}_8$ ) fast keine ZTL zur  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion stimuliert werden konnten. Die Degranulation war bei Stimulation in  $\text{zTM}_{10}$  auf 35 % degranulierender  $T_{\text{EFF}}$ -Zellen reduziert. Im Medium degranulierten 53 % der  $T_{\text{EFF}}$ -Zellen.

Das zellfreie Milieu der Tumorzellkultur in hoher Zelldichte ( $\text{zTM}_{10}$ ) inhibierte nicht nur  $\text{IFN}\gamma$ , sondern hatte auch einen negativen Einfluss auf die Produktion der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-2 und des Chemokins  $\text{MIP1}\beta$  (Abbildung 6-4). Bei TZR-Stimulation im  $\text{zTM}_{10}$  produzierten nur noch zwischen 5 % und 10 % der ZTL  $\text{TNF}\alpha$ , IL-2 und  $\text{MIP1}\beta$  im Vergleich zu 40 % für  $\text{TNF}\alpha$ , 20 % für IL-2 und 70 % für  $\text{MIP1}\beta$  bei Stimulation im Medium.



**Abbildung 6-4:  $\text{TNF}\alpha$ -, IL-2- und  $\text{MIP1}\beta$ -Produktion bei Stimulation der ZTL-JB4 in zellfreiem Tumormilieu hoher Zelldichte**

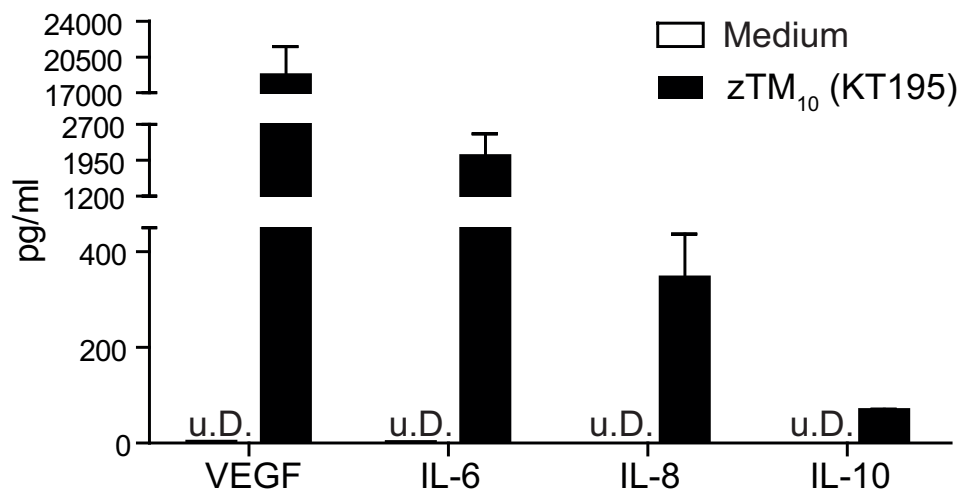
ZTL-JB4 wurden in zTM hoher Tumorzell-dichte ( $\text{zTM}_{10}$  entspricht  $5 \times 10^6$  KT195 in 1 ml für 40 h kultiviert), mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26-Zielzellen für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden ZTL in Medium stimuliert (K).  $\text{CD45}^- \text{RCC26}$  wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den  $\text{CD45}^+$  ZTL abgetrennt und anschließend die  $\text{TNF}\alpha$ -, IL-2- und  $\text{MIP1}\beta$ -Produktion der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente ( $n = 2$  bis 6). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 6.1.2 Untersuchung des zellfreien Tumorumgebungs

Wie in der Einleitung beschrieben, sind mehrere Faktoren des Tumorumgebungs bekannt, welche Einfluss auf T-Zellen nehmen können. Dazu gehören Zytokine, Stoffwechselmetabolite, Nukleoside und Exosomen. Diese können das Überleben, die Aktivierung, die Proliferation und die Funktion von T-Zellen beeinflussen. Aber auch der Mangel an Faktoren, z.B. Glukose und Aminosäuren, kann zum Zellzyklusarrest führen und die T-Zell-Funktion inhibieren. Daher wurden einige der Tumorumgebungs-Faktoren und deren individueller Einfluss auf die T-Zell-Funktion näher betrachtet.

### 6.1.2.1 Zytokine im zellfreien Tumorumgebungs

Um die Konzentrationen verschiedener Zytokine im zellfreien Tumorumgebungs zu messen, wurde ein Zytokin-Multiplex durchgeführt. Das Zytokin TGF- $\beta$  ist im Multiplex nicht enthalten und wurde daher mittels ELISA untersucht. Abbildung 6-5 zeigt, dass IL-6, IL-8, IL-10 und VEGF (vascular endothelial growth factor) im zTM im Vergleich zum Medium erhöht waren. Alle anderen Zytokine, welche im Zytokin-Multiplex enthalten waren (siehe Methoden 5.8.2), wurden in den Überständen nicht aufgefunden.



**Abbildung 6-5: Nachweis von Zytokinen im zellfreien Tumorumgebungs**

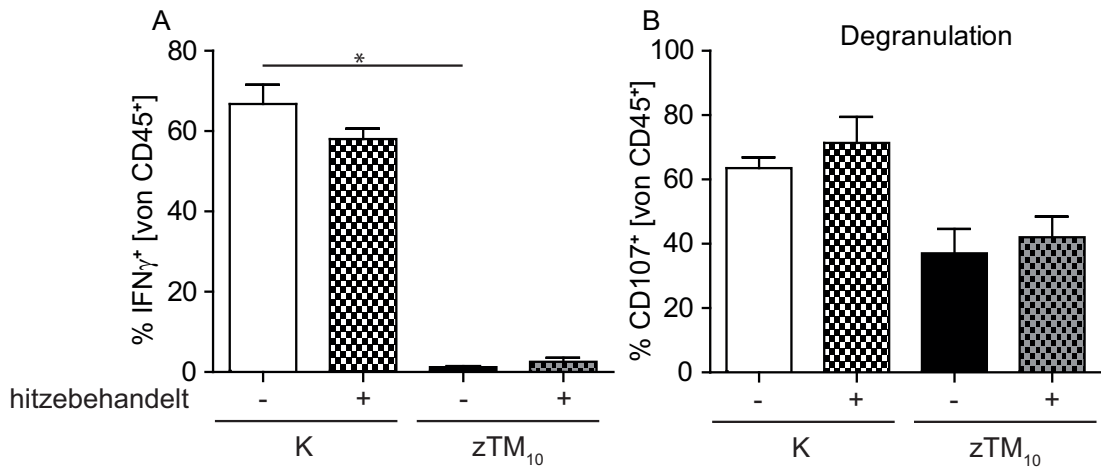
$5 \times 10^6$  KT195-Tumorzellen wurden für 40 h in 1 ml kultiviert. Anschließend wurden 27 verschiedene Zytokine mittels Zytokin-Multiplex, wie in Methoden in 5.8.2 beschrieben, im Überstand (zTM<sub>10</sub> (KT195)) vermessen. Als Kontrolle wurde unkonditioniertes Medium vermessen. Dargestellt sind die Konzentrationen an VEGF, IL-6, IL-8 und IL-10 in pg/ml. Die übrigen Zytokine lagen unterhalb der Detektionsgrenze (Liste der Detektionsgrenzen der untersuchten Zytokine in 5.8.2). Die Balken sind der Mittelwert zweier Experimente. Die Fehlerbalken sind die SEM. u.D. = unter der Detektionsgrenze. Die Detektionsuntergrenzen lagen für IL-6, IL-8 und IL-10 zwischen 5 und 10 pg/ml, für VEGF bei 30 pg/ml.



Diese in den zTM gefundenen Zytokine werden oftmals mit Tumoren in Zusammenhang gebracht. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen durch längere Kultur in Anwesenheit von VEGF in der Proliferation und der Zytotoxizität inhibiert werden. Allerdings gibt es keine Berichte über den Einfluss von VEGF auf die Zytokinproduktion von T-Zellen. Dieser wurde hier auch nicht weiter untersucht. Auch für IL-8, welches ein chemotaktisches Zytokin ist, ist bisher keine inhibitorische Rolle bekannt. IL-10 hingegen kann die Proliferation und die IFN $\gamma$ -Produktion von T-Zellen inhibieren, wobei es auch Berichte über eine immunstimulierende Wirkung des IL-10 gibt (Mocellin et al., 2005). IL-6 wird als Aktivator der Akute-Phase-Proteine angesehen, welcher für Lymphozyten stimulierend wirkt. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass IL-6 die Generierung von Foxp3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert, welche wiederum, durch TGF- $\beta$ -Produktion, T-Zellen inhibieren (Hahn et al., 2005; Nakagawa et al., 2010). IL-6 scheint daher unwahrscheinlich als Faktor, welcher für die in dieser Arbeit beobachteten funktionellen Defizite der T-Zellen verantwortlich zu sein, da die Inhibition indirekt über die Induktion von Foxp3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen verläuft. TGF- $\beta$ , welches häufig in Tumoren gemessen wird, lag mit Werten von 3,4 pg/ml ( $\pm$  1,6) am Rande der Nachweisgrenze von 5 pg/ml.

### **6.1.2.2 Einfluss hitzelabiler Faktoren im zellfreien Tumormilieu auf die Funktion von ZTL**

Um zu testen ob im zTM enthaltene hitzelabile Proteine für die Inhibition der T-Zell-Funktion verantwortlich sind, wurde zTM<sub>10</sub> für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend zentrifugiert, um ausgefällte Proteine zu entfernen. Die ZTL wurden im gewonnenen Überstand über den TZR stimuliert. Als Kontrolle wurde auch eine Stimulation in hitzebehandeltem Medium durchgeführt. Abbildung 6-6 zeigt, dass der prozentuale Anteil an IFN $\gamma$ -produzierenden bzw. degranulierenden T-Zellen im hitzebehandelten Medium sowie im unbehandelten Medium gleich ist. Somit werden durch die Hitzebehandlung keine für die Funktionsstimulation essentiellen Faktoren entfernt. Weiterhin ist zu sehen, dass das inhibitorische zTM<sub>10</sub> nach Hitzebehandlung weiterhin inhibitorisch ist. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass für die inhibitorische Wirkung des zTM keine hitzelablen Proteinfaktoren verantwortlich sind.

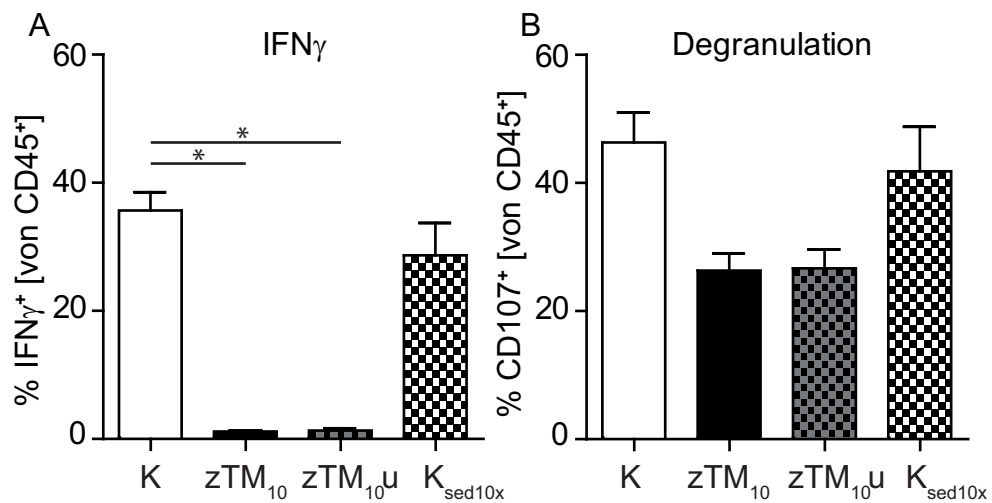


**Abbildung 6-6: Einfluss hitzelabiler Faktoren des zTM auf die Funktion von ZTL-JB4**  
 ZTL-JB4 wurden in Medium (K) bzw. zTM hoher Tumorzellichte (zTM<sub>10</sub> entspricht  $5 \times 10^6$  KT195 in 1 ml für 40 h kultiviert), oder in hitzebehandeltem (10 min, 95 °C) Medium bzw. zTM<sub>10</sub> mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 für 5 h stimuliert. CD45<sup>-</sup> RCC26 wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente (n = 3 bis 4). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05).

### 6.1.2.3 Einfluss von Membranvesikel im zellfreien Tumormilieu auf die Funktion von ZTL

Es ist beschrieben, dass Exosomen oder andere von Tumorzellen sezernierte Mikrovesikel T-Zellen inhibieren können (Huber et al., 2008; Clayton et al., 2011). Um zu untersuchen, ob der inhibitorische Einfluss des zellfreien Tumormilieus auf Membranvesikel (Mikropartikel und Exosomen, apoptotische Vesikel) zurück zu führen ist, wurde der zTM<sub>10</sub>, wie in 5.3.7 beschrieben, ultrazentrifugiert und der Einfluss des partikelfreien 100000 g-Überstands (zTM<sub>10u</sub>) getrennt vom Sediment auf die T-Zell-Funktion vergleichend untersucht (Freyssinet, 2003). Das Sediment von 5 ml zTM<sub>10</sub> wurde in 500  $\mu$ l Medium aufgenommen, so dass die Membranvesikelfraktion im Vergleich zum ursprünglichen zTM<sub>10</sub> in einer 10-fach höheren Konzentration (K<sub>Sed10x</sub>) vorlag. So sollte eine mögliche inhibitorische Wirkung durch Vesikel deutlich zu sehen sein. ZTL wurden in zTM<sub>10</sub>, zTM<sub>10u</sub> und im K<sub>Sed10x</sub> über den TZR stimuliert, die IFN $\gamma$ -Produktion sowie die Degranulation ermittelt und diese mit der Stimulation im Medium verglichen (Abbildung 6-7). Der zTM<sub>10u</sub> zeigte die gleiche inhibitorische Wirkung wie der unfraktionierte zTM<sub>10</sub>. Das Sediment hatte weder auf die IFN $\gamma$ -Produktion noch auf die

Degranulation einen inhibitorischen Einfluss. Membranvesikel scheinen somit nicht die inhibitorische Wirkung des zTM<sub>10</sub> zu vermitteln.

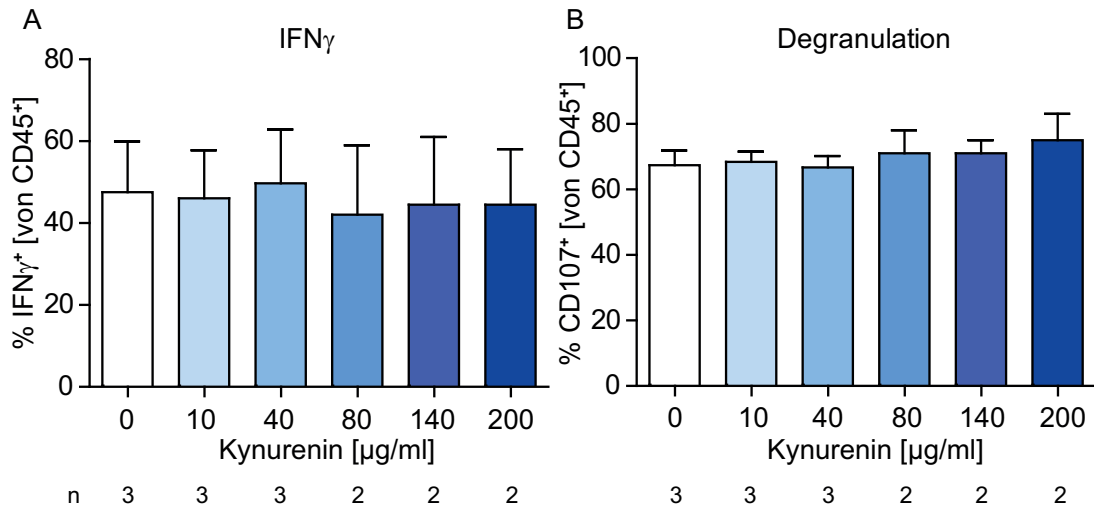


**Abbildung 6-7: Einfluss von Membranvesikel auf die Funktion von ZTL-JB4**

ZTL-JB4 wurden in zTM hoher Tumorzellichte (zTM<sub>10</sub> entspricht  $5 \times 10^6$  KT195 in 1 ml für 40 h kultiviert) oder in ultrazentrifugiertem zTM<sub>10</sub> (zTM<sub>10u</sub>) bzw. Medium mit 10-fach angereichertem Sediment (K<sub>Sed10x</sub>) mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden ZTL in Medium (K) stimuliert. CD45<sup>-</sup> RCC26 wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente (n = 3). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05).

#### 6.1.2.4 Einfluss von Kynurenin auf die T-Zell-Funktion von ZTL

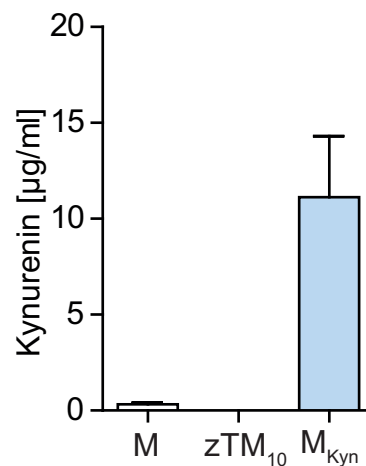
Tumoren können durch Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu L-Kynurenin katalysieren. Es ist beschrieben, dass nicht nur Tryptophanmangel, sondern auch die L-Kynureninanreicherung die T-Zell-Proliferation inhibieren und Apoptose induzieren kann. Allerdings ist bisher nicht beschrieben, ob Kynurenin einen negativen Einfluss auf die T-Zell-Funktion ausübt. In Eierstockkrebs wurden 2,53  $\mu$ M (50  $\mu$ g/ml) in Lungenkrebs 2,8  $\mu$ M (56  $\mu$ g/ml) Kynurenin gemessen (Suzuki et al., 2010; de Jong et al., 2011). Abbildung 6-8 zeigt, dass Kynurenin, selbst in hohen Konzentrationen, auf die IFN $\gamma$ -Produktion und die Degranulation nicht inhibitorisch wirkt.



**Abbildung 6-8: Einfluss von Kynurenin auf die Funktion von ZTL-JB4**

ZTL-JB4 wurden in Medium, welches mit aufsteigenden Konzentrationen an Kynurenin versetzt worden war, mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 für 5 h stimuliert. CD45<sup>-</sup> RCC26 wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente (n = 2 bis 3). Fehlerbalken sind die SEM.

Gleichzeitig wurde im inhibitorischen zTM<sub>10</sub> kein Kynurenin gemessen (Abbildung 6-9), was darauf hindeutet, dassIDO bei der in diesem System beobachteten Inhibition der ZTL-Funktion keine Rolle spielt.



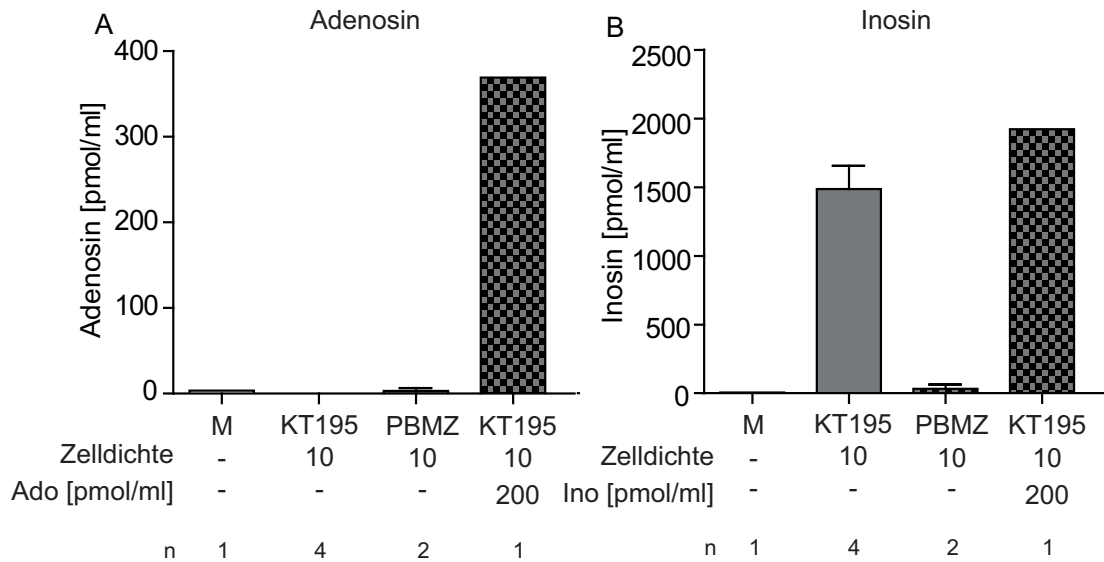
**Abbildung 6-9: Kynureninmessung im zTM**

Mit Hilfe des Ehrlich-Reagenzes wurden Medium (M) und zTM<sub>10</sub>, wie in Methoden in 5.3.9 beschrieben, auf den Gehalt an Kynurenin vermessen. Als Kontrolle wurde Medium (M<sub>Kyn</sub>) mit 10 µg/ml Kynurenin versetzt. Die y-Achse zeigt die Konzentration an Kynurenin in µg/ml. Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente (n = 3). Fehlerbalken sind die SEM.

### **6.1.2.5 Adenosin im zellfreien Tumormilieu**

Tumorzellen weisen oftmals eine erhöhte Expression der Ecto-Enzyme CD39 und CD73 auf. Die Folge sind erhöhte extrazelluläre Adenosinkonzentrationen (bis zu 300  $\mu\text{M}$ ) (Hoskin et al., 1994). Es ist beschrieben, dass Adenosin einen negativen Einfluss auf die T-Zell-Funktion ausüben kann (Huang et al., 1997; Hoskin et al., 2008). Daher wurde die Adenosinkonzentration in stark inhibitorischen (zTM<sub>10</sub> von KT195) bzw. nicht inhibitorischen (zM<sub>10</sub> von PBMZ) Überständen gemessen. In Abbildung 6-10 ist das Ergebnis dargestellt. Weder in den inhibitorischen noch in den nicht-inhibitorischen zM wurde Adenosin gefunden. Um die Nachweismethode zu kontrollieren, wurde einigen Überständen Adenosin in einer Konzentration von 200 pmol/ml zugesetzt, welches eindeutig detektiert werden konnte. In den stark inhibitorischen Überständen (zTM<sub>10</sub> von KT195), wurden allerdings hohe Inosinkonzentrationen (1500 pmol/ml) gefunden. Inosin entsteht als Abbauprodukt des Adenosins. Dies spricht dafür, dass Adenosin von den Tumorzellen generiert worden war, dieses aber im Überstand zu Inosin abgebaut wurde. In verschiedenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass Inosin anti-inflammatorisch wirkt und vor Autoimmunkrankheiten schützt (Mabley et al., 2003; Hasko et al., 2004; Mabley et al., 2008; Mabley et al., 2009).

## Ergebnisse



**Abbildung 6-10: Adenosin- und Inosinmessungen in verschiedenen zM**

Zellfreie Milieus (zM) aus einer hohen Zelldichte (10x) von KT195 sowie „Nicht-Tumorzellen“ (PBMZ) generiert wurden, wie in Methoden in 5.3.10 beschrieben, auf den Gehalt an Adenosin (A) und Inosin (B) vermessen. Als Kontrolle wurde Medium (M) bzw. mit 200 pmol/ml Adenosin bzw. Inosin versetzte Tumorzellüberstände, vermessen. Die y-Achse zeigt die Konzentration an Adenosin (A) bzw. Inosin (B) in pmol/ml. Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente (n = 1 bis 4). Fehlerbalken sind die SEM. Ado = Adenosin; Ino = Inosin.

### 6.1.2.6 Laktatkonzentration und pH-Wert im zellfreien Tumormilieu und deren Einfluss auf die T-Zell-Funktion

Eine Eigenschaft von Tumorzellen ist die bevorzugte Metabolisierung von Glukose zu Milchsäure, was unter dem Begriff des Warburg-Effekts beschrieben ist (Warburg, 1924; Gatenby und Gillies, 2004). Bei physiologischem pH liegt mehr als 99 % der Milchsäure in unprotoniertem Zustand als Laktat vor (Roth und Brooks, 1990; Lane et al., 2009). Dadurch kommt es im Tumormilieu zu einer Akkumulation des Laktats. Die von verschiedenen Zelltypen und in verschiedener Zelldichte generierten zellfreien Überstände wurden auf den Gehalt an Laktat und  $H^+$ -Ionen vermessen und die gefundenen Werte dem Effekt, den diese zellfreien Überstände auf die T-Zell-Funktion hatten, gegenüber gestellt.

Tabelle 6-1 beschreibt die Zelltypen und die Zellkonzentrationen, welche zur Generierung der zellfreien Milieus (zM) verwendet wurden, deren jeweilige Laktatkonzentrationen und pH-Werte. Es wurden Nierenzellkarzinomzelllinien verwendet, welche von Tumoren mit hoher (RCC53, A498) bzw. niedriger (RCC26, 786-0) Malignität etabliert worden waren. RCC53 wurde von einem Nierenzellkarzinom des Stadiums 4 generiert (Djafarzadeh et al., 2006). A498 stammt von einem besonders aggressiven und entdifferenzierten Tumor ab (Giard et al., 1973). 786-0 verfügt über ein viel schwächeres Invasivitätspotential als A498 (Chuang et al., 2008). RCC26 wurde von einem Nierenzellkarzinom des Stadiums 1 etabliert (Schendel et al., 1993). Neben Nierenzellkarzinomzelllinien wurden zellfreie Milieus der Rhabdomyosarkomzelllinie A673 und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa untersucht. Zusätzlich wurden Milieus von „Nicht-Tumor“-Zelllinien angelegt: NN50 ist eine Kurzzeitkultur (Passage 4) von Zellen aus Normalnierenparenchym, HBMEC (engl.: human brain microvascular endothelial cells) ist eine Zellkulturlinie von gesundem Hirnendothel (Stins et al., 1997). Da es schwierig war eine Zelllinie zu finden, welche unter Zellkulturbedingungen nicht proliferiert und somit als Kontrollzellen dienen konnten, wurden ferner zellfreie Milieus von ruhenden PBMZ und ZTL-JB4 untersucht.

**Tabelle 6-1: Laktatkonzentrationen und pH-Werte der zellfreien Milieus verschiedener Zelltypen und Zellkulturdichten**

Zelltyp	Malignität	Ursprung	Zellen/ ml	zM*	Laktat [mM] (n)**	pH-Wert (n)**
KT195	hoch	RCC	$0,5 \times 10^6$	1	$12 \pm 1$ (5)	$7,2 \pm 0,1$ (7)
KT195	hoch	RCC	$1 \times 10^6$	2	$18 \pm 2$ (2)	$7,2 \pm 0,1$ (4)
KT195	hoch	RCC	$2 \times 10^6$	4	$20 \pm 1$ (2)	$6,6 \pm 0,1$ (4)
KT195	hoch	RCC	$4 \times 10^6$	8	19 (1)	$6,5 \pm 0,1$ (2)
KT195	hoch	RCC	$5 \times 10^6$	10	$22 \pm 1$ (14)	$6,6 \pm 0,1$ (28)
RCC53	hoch	RCC	$0,5 \times 10^6$	1	12 (1)	7,0 (1)
RCC53	hoch	RCC	$5 \times 10^6$	10	20 (1)	6,5 (1)
A498	hoch	RCC	$0,5 \times 10^6$	1	$13 \pm 0,5$ (2)	$7,3 \pm 0,1$ (2)
A498	hoch	RCC	$5 \times 10^6$	10	$20 \pm 0,5$ (2)	6,5 (2)
RCC26	niedrig	RCC	$0,5 \times 10^6$	1	8 (2)	7,4 (2)
RCC26	niedrig	RCC	$5 \times 10^6$	10	$25 \pm 2$ (3)	$6,8 \pm 0,1$ (10)
786-0	niedrig	RCC	$0,5 \times 10^6$	1	12 (2)	$7,3 \pm 0,1$ (2)
786-0	niedrig	RCC	$5 \times 10^6$	10	$21 \pm 1$ (2)	6,5 (2)
A673	hoch	Rhabdomyosark.	$5 \times 10^6$	10	21 (1)	6,8 (1)
HeLa	hoch	Zervixkarzinom	$5 \times 10^6$	10	20 (1)	6,4 (1)
NN50	keine	Niere	$5 \times 10^6$	10	27 (1)	$6,3 \pm 0,1$ (2)
HBMEC	keine	Endothelzellen des Gehirns	$5 \times 10^6$	10	22 (1)	$6,8 \pm 0,2$ (2)
PBMZ	keine	Mononukleäre Zellen aus Blut	$5 \times 10^6$	10	$7 \pm 2$ (2)	$7,9 \pm 0,4$ (2)
ZTL- JB4	keine	Zytotoxer T-Zell- Klon	$5 \times 10^6$	10	9 (1)	7,7 (1)

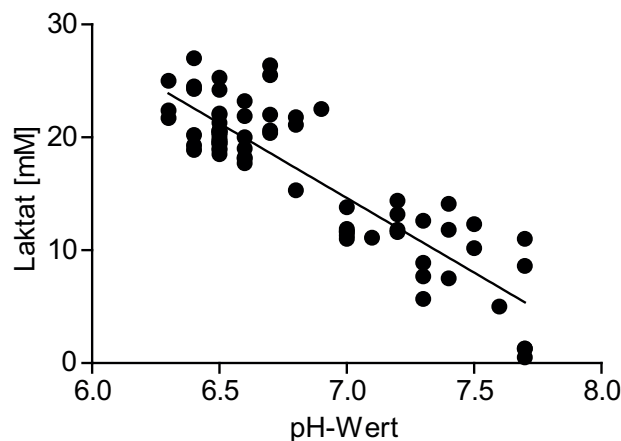
\* zM: Zahl beschreibt die Zelldichte, der zur Generation des zellfreien Milieus benutzten Zellkultur.

\*\* n: entspricht der Anzahl unabhängiger Messungen und mehrerer unabhängiger Ansätze

Wie in Tabelle 6-1 zu sehen, wurde in den Tumorüberständen Laktat zellkonzentrationsabhängig akkumuliert, wobei die mit hoher Tumorzelldichte ( $zM_{10}$ ) generierten Überstände 2 - 3x mehr Laktat enthielten als die aus niedriger Zelldichte ( $zM_1$ ) generierten. Es gab keine Korrelation zwischen Aggressivität und Menge an produziertem Laktat.  $zTM_1$  der hochmalignen Zelllinien RCC53 und A498 enthielten 12 mM und 13 mM Laktat, die der niedrigmalignen RCC26 und 786-0 8 und 12 mM Laktat. In den hohen Zelldichten des zellfreien Milieus von RCC53 und A498 waren 20 mM Laktat



enthalten, wohingegen es bei zTM<sub>10</sub> von RCC26 und 786-0 sogar 25 mM und 21 mM waren. Auch in den Milieus von „Nicht-Tumorzellen“ wurde Laktat gemessen: Der von NN50 gewonnene Überstand enthielt mit 27 mM sehr viel Laktat. Es ist beschrieben, dass Zellkulturen gesunder Gewebe in frühen Passagen sehr stark proliferieren (Williams et al., 1976). Dies wurde auch bei dieser „Nicht-Tumor“-Zellkultur beobachtet, welche in Passage 4 war. Proliferation bedeutet hohen Metabolismus, was die hohe Sekretion an Laktat erklärt. PBMZ sind ruhende und ZTL-JB4 schwach proliferierende Zellen. Hier wurden auch in Kulturen hoher Zelldichte nur 7 bzw. 9 mM Laktat gemessen. In allen Milieus korrelierte die Laktatkonzentration mit dem gemessenen pH-Wert, was Abbildung 6-11 verdeutlicht.



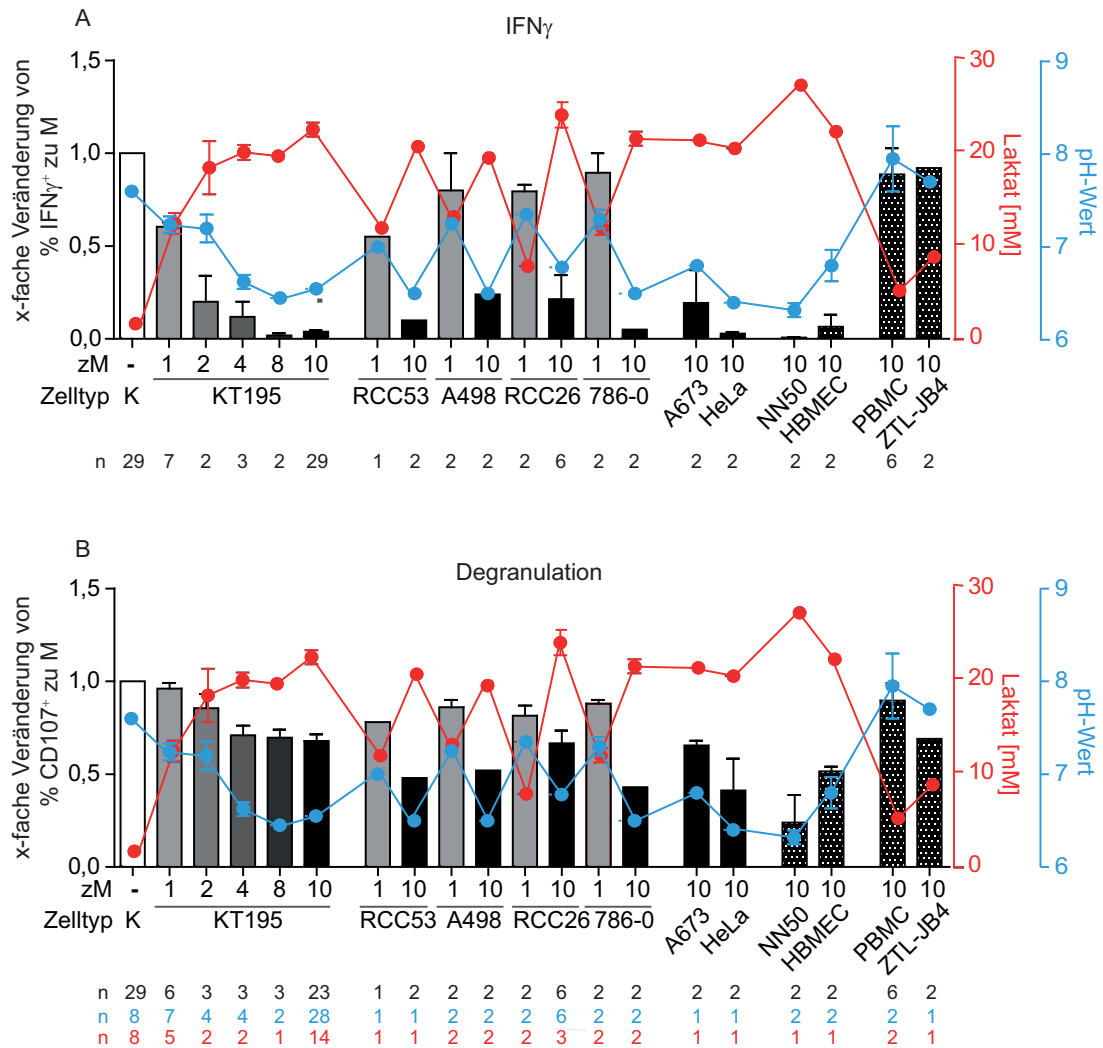
**Abbildung 6-11: Korrelation von Laktatkonzentration und pH-Wert**

Es wurden zellfreie Überstände von verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Zelldichten über 40 h generiert. Anschließend wurde die Laktatkonzentration sowie der pH-Wert der jeweiligen zellfreien Überstände gemessen. Jeder Punkt stellt die Laktatkonzentration und den zugehörigen pH-Wert eines Zellüberstandes dar. Die y-Achse zeigt die Laktatkonzentration in mM, die x-Achse zeigt den pH-Wert. Die Korrelation wurde nach Pearson ermittelt ( $r^2=0,75$ ;  $p<0,0001$ ).

Anschließend wurde der Effekt der verschiedenen Milieus auf die T-Zell-Funktion bestimmt. Wie in Abbildung 6-12 zu sehen ist, folgt das Ausmaß der IFN $\gamma$ -Produktion und der Degranulation der ZTL den Laktatkonzentrationen invers und direkt dem pH-Wert des entsprechenden Milieus (je mehr Laktat desto weniger Funktion; je niedriger der pH-Wert desto weniger Funktion), wohingegen es keine Korrelation zwischen aggressiven oder weniger aggressiven Zelltypen oder einer „Nicht-Tumorzelle“ gab. Überstände mit viel Laktat und saurem pH-Wert führten zu einer starken Inhibition der ZTL-Funktion. Im Falle der KT195-Überstände ist zudem verdeutlicht, dass die

## Ergebnisse

Konzentration des Laktats und der pH-Wert der Zelldichte folgen. Das zM<sub>10</sub> der Normalnierenkultur NN50 war besonders inhibitorisch, und wies mit 27 mM Laktat den höchsten Wert auf. Die zM<sub>10</sub> der ruhenden PBMZ sowie der ZTL-JB4, welche bei neutralem pH-Wert 7 bzw. 9 mM Laktat enthielten, waren nicht inhibitorisch.

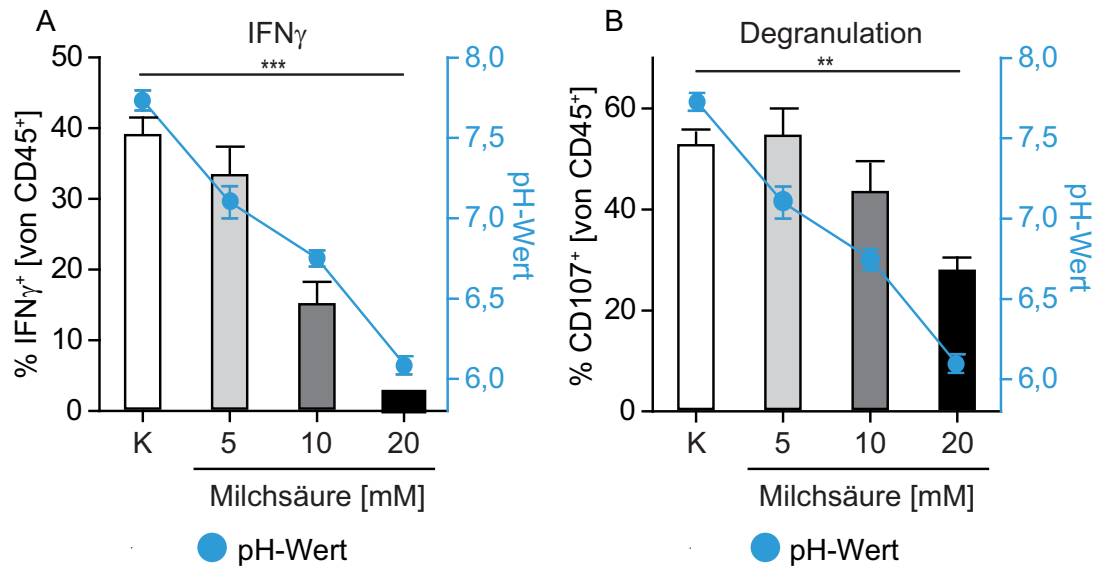


**Abbildung 6-12: T-Zell-Funktion in verschiedenen zellfreien Milieus**

ZTL-JB4 wurden in verschiedenen zellfreien Milieus (zM) (Tabelle 6-1) mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 für 5 h stimuliert. Für die Generierung der zM wurden unterschiedliche Zelltypen in verschiedenen Zelldichten (1 = 0,5 x 10<sup>6</sup>; 2 = 1 x 10<sup>6</sup>; 4 = 2 x 10<sup>6</sup>; 8 = 4 x 10<sup>6</sup>; 10 = 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml) über 40 h kultiviert und anschließend der Überstand geerntet. Als Kontrolle wurden ZTL in Medium stimuliert (K). CD45<sup>-</sup> RCC26 wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die IFN<sub>γ</sub>-Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die linke y-Achse ist die Skala der vielfachen Veränderung des prozentualen Anteils positiver Zellen innerhalb der ZTL in Bezug zur Stimulation im Medium (K). Die Balken sind die Mittelwerte der vielfachen Veränderung der prozentualen Anteile der IFN<sub>γ</sub>-Produktion (A) bzw. der Degranulation (B) von ZTL (n = 1 bis 29). Die roten Kreise sind die Mittelwerte der gemessenen Laktatkonzentrationen (n = 1 bis 14). Die blauen Kreise sind die Mittelwerte der gemessenen pH-Werte (n = 1 bis 28). Die zugehörigen Achsen befinden sich auf der rechten Seite der Graphen. Fehlerbalken sind die SEM.

Zusammengefasst zeigt Abbildung 6-12, dass die inhibitorische Aktivität der zellfreien Überstände direkt mit der Laktatkonzentration der zM und invers mit dem pH-Wert korreliert.

Um zu testen, ob Laktat für die Funktionsinhibition der ZTL ursächlich ist, wurde Medium mit kommerziell erhältlicher Milchsäure versetzt. Die Milchsäure dissoziiert im Medium zu > 99 % zu dem Milchsäureanion, Laktat und Protonen. Milchsäure supplementiertes Medium wird im Folgenden mit „Milchsäure-Medium“ bezeichnet (siehe Methoden 5.3.5). Die T-Zell-Funktion wurde in verschiedenen Konzentrationen an „Milchsäure-Medium“ untersucht (Abbildung 6-13). Im 20 mM „Milchsäure-Medium“ produzierten nur noch 2 % der ZTL  $\text{IFN}\gamma$  im Vergleich zu 39 % im Medium. Die Degranulation war mit 27 % im 20 mM „Milchsäure-Medium“ im Vergleich zu 52 % im Medium, ebenfalls reduziert. Der pH-Wert korrelierte invers mit der Milchsäurekonzentration und direkt mit der Funktion.



**Abbildung 6-13: Einfluss von „Milchsäure-Medium“ und pH auf die Funktion von ZTL**

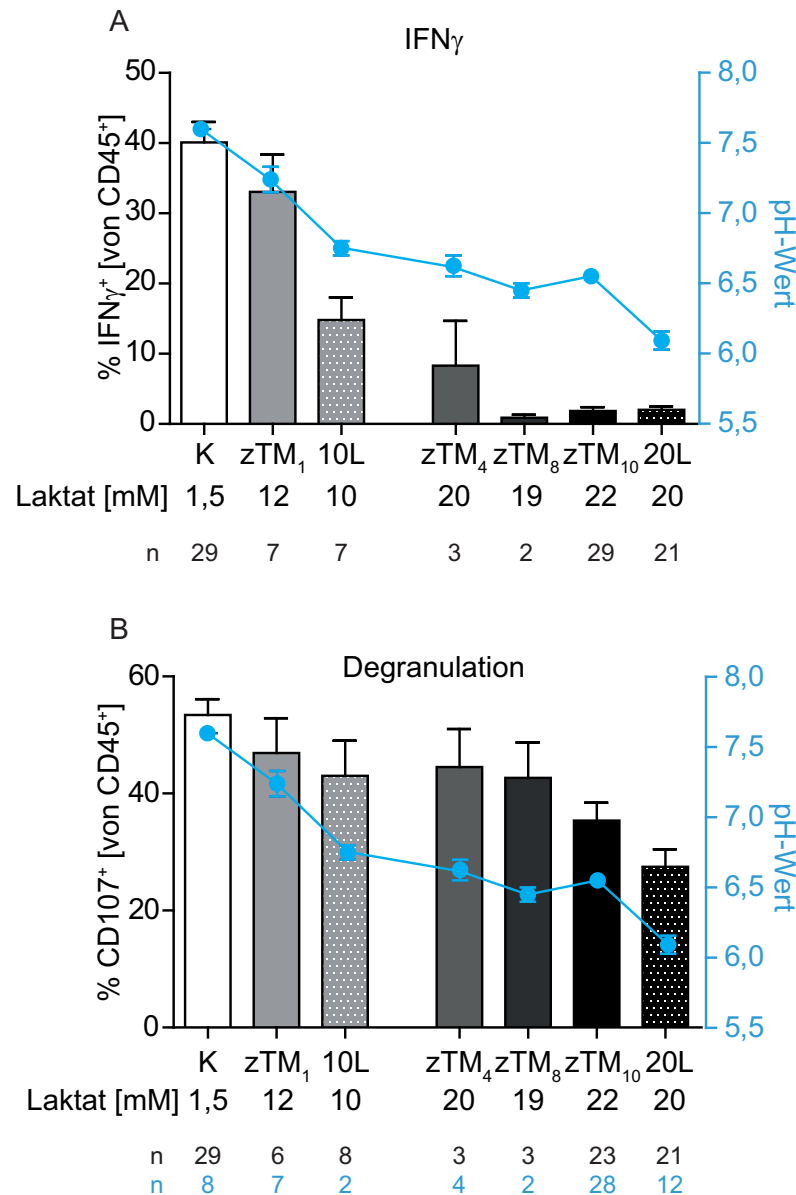
ZTL-JB4 wurden in verschiedenen Konzentrationen von „Milchsäure-Medium“ (siehe Methoden 5.3.5), mit TZR-L $^+$  RCC26 für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden ZTL-JB4 in Medium ohne Milchsäure stimuliert (K). CD45 $^+$  Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45 $^+$  ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) innerhalb der ZTL-Population ermittelt. Die linke y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente. Fehlerbalken sind die SEM (n = 7 bis 21). Die blauen Kreise sind die gemessenen pH-Werte der jeweiligen Milieus. Fehlerbalken sind die SEM (n = 2 bis 12). Die zugehörige Achse befindet sich auf der rechten Seite der Graphen. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Ein Vergleich des inhibitorischen Effekts von „Milchsäure-Medium“ mit zellfreiem Tumorüberstand ist in Abbildung 6-14 dargestellt. In zTM $_1$  von KT195 wurden 12 mM Laktat und ein pH-Wert von 7,2 gemessen. Somit entspricht zTM $_1$  hinsichtlich der Laktatkonzentration etwa dem 10 mM „Milchsäure-Medium“, hat aber einen etwas höheren pH-Wert. Die IFN $\gamma$ -Produktion sowie die Degranulation waren im 10 mM „Milchsäure-Medium“ stärker inhibiert als im zTM $_1$ .

In zTM $_4$ , zTM $_8$  bzw. zTM $_{10}$ , wurden 20, 19 bzw. 22 mM Laktat und vergleichbare pH-Werte zwischen 6,5 und 6,6 gemessen. Damit entsprechen diese zTMs im Laktatgehalt dem 20 mM „Milchsäure-Medium“, die pH-Werte waren wie beim zTM $_1$  gegenüber dem 10 mM „Milchsäure-Medium“ etwas erhöht. Es zeigte sich eine vergleichbare Inhibition der IFN $\gamma$ -Produktion. Allerdings ist anzumerken, dass in diesen Milieus die Inhibition bereits ihr Maximum erreicht hatte, wodurch mögliche Unterschiede nicht erkennbar

sind. Im Falle der Degranulation, welche robuster gegenüber den Einflüssen der zTM ist, war eine graduelle Zunahme der Inhibitionskraft von zTM<sub>4</sub> nach zTM<sub>10</sub> zu sehen. Auch zeigte sich, dass das 20 mM „Milchsäure-Medium“ trotz gleicher Laktatkonzentrationen einen stärkeren inhibitorischen Effekt ausübt.

Die Ursache für die stärkere inhibitorische Wirkung des „Milchsäure-Mediums“ im Vergleich zu zTM mit vergleichbarer Laktakkonzentration könnte dessen niedrigerer pH-Wert sein: Das zTM<sub>1</sub> hatte mit einen pH-Wert von  $7,2 \pm 0,1$  einen deutlich höheren Wert als das 10 mM „Milchsäure-Medium“ mit  $6,8 \pm 0,1$ . Auch die pH-Werte der aus hohen Zelldichten gewonnenen zTM (zTM<sub>4-10</sub>) waren mit  $6,5 - 6,6 \pm 0,1$  höher als der des 20 mM „Milchsäure-Mediums“, welcher bei  $6,1 \pm 0,1$  lag.



**Abbildung 6-14: Vergleich der Funktion von ZTL in zTM und „Milchsäure-Medien“**

JB4-ZTL wurden in zellfreien Tumormilieus verschiedener Tumorzell-dichten (zTM $_1$ , zTM $_4$ , zTM $_8$ , zTM $_{10}$ ) und in 10 mM bzw. 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) über TZR-L $^+$  RCC26 stimuliert. Als Kontrolle wurden ZTL in Medium stimuliert (K). CD45 $^-$  Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45 $^+$  ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) innerhalb der CD45 $^+$  ZTL ermittelt. Die linke y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL (n = 3 bis 29). Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente. Die blauen Kreise sind die Mittelwerte der gemessenen pH-Werte (n = 2 bis 28). Die Fehlerbalken sind die SEM. Die zugehörige Achse befindet sich auf der rechten Seite der Graphen.

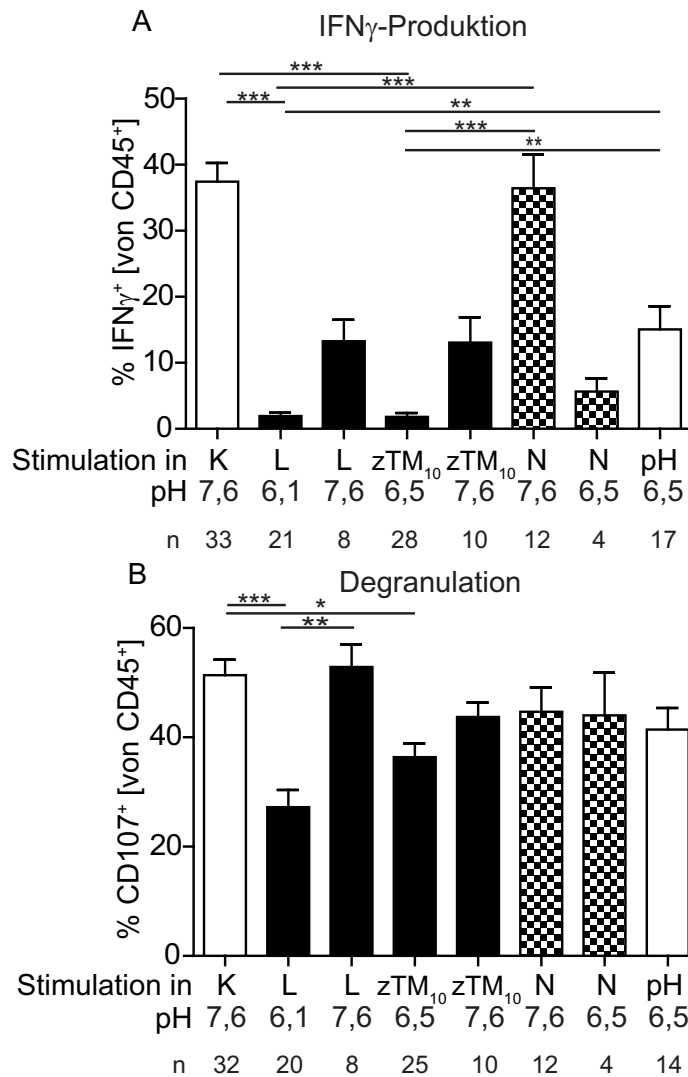
### 6.1.2.7 Zusammenspiel von Laktat und pH-Wert bei der Inhibition der T-Zell-Funktion

Um die individuelle Rolle von Laktat und pH-Wert bei der Inhibition der ZTL-Funktion zu untersuchen, wurden ZTL in verschiedenen Milieus, in denen Laktat in neutralem („Natriumlaktat-Medium“) oder im sauren Milieu („Milchsäure-Medium“) anwesend war, oder in saurem Milieu ohne Laktat, stimuliert. Medium welches Laktat bei neutralem pH enthält, wurde generiert indem Natriumlaktat zu Medium gegeben wurde. Natriumlaktat dissoziiert im Medium zum Milchsäureanion, Laktat und Natrium-Ionen, weshalb es zu keiner Ansäuerung des Milieus kommt. Abbildung 6-15 zeigt die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion und die Degranulation der ZTL in den verschiedenen Milieus.

Wie bereits in den Versuchen zuvor gezeigt, wurden ZTL im 20 mM „Milchsäure-Medium“ sowie im  $\text{zTM}_{10}$ , welches etwa 20 mM Laktat enthält, in ihrer Funktion inhibiert. Wurde der pH-Wert dieser Milieus neutralisiert, so produzierten deutlich mehr ZTL  $\text{IFN}\gamma$  (13 %) im Vergleich zur Stimulation im „Milchsäure-Medium“ (2 %) bzw.  $\text{zTM}_{10}$  (2 %). Auch die Degranulation wurde durch Neutralisation des sauren „Milchsäure-Milieus“ verbessert: Im sauren „Milchsäure-Medium“ degranulierten 27 % der ZTL, wohingegen es 53 % waren, wenn das Milieu neutralisiert wurde, was der Degranulation im Medium ohne Laktat entsprach. Im sauren  $\text{zTM}_{10}$  degranulierten 36 %, im neutralen  $\text{zTM}_{10}$  44 %.

Wurden die T-Zellen in 20 mM „Natriumlaktat-Medium“ stimuliert, wodurch Laktat im Milieu anwesend ist, aber keine Azidifikation erfolgt, so wurden die ZTL in ihrer Funktion nicht beeinflusst. Wurde dieses Milieu nun angesäuert, so wurde die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von 36 % im neutralen auf 6 % im sauren Milieu reduziert.

Wurde lediglich der pH-Wert des Mediums auf einen vergleichbaren Wert zu dem des  $\text{zTM}_{10}$  gesenkt, ohne dass Milchsäure zugesetzt wurde, so reduzierte sich der Anteil an  $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden ZTL von 36 % auf 15 %, und die Degranulation war von 51 % auf 43 % leicht erniedrigt.



**Abbildung 6-15: Einfluss von Laktat und pH-Wert auf die Funktion von ZTL-JB4**

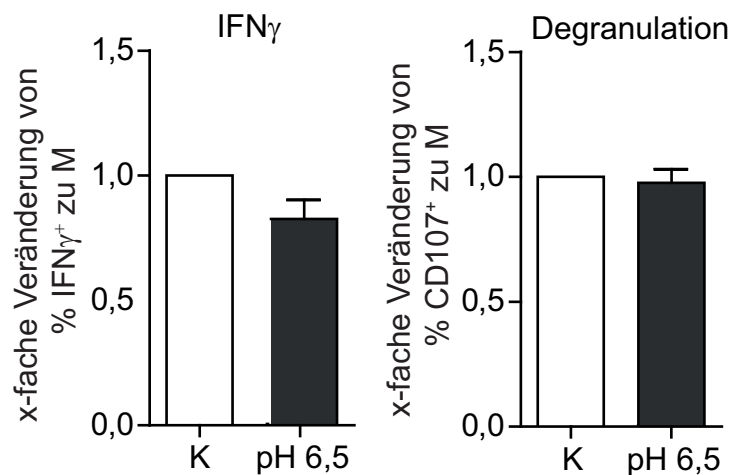
ZTL-JB4 wurden in 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid), mit Natronlauge neutralisiertem L, in 20 mM „Natriumlaktat-Medium“ (N), mit Phosphorsäure auf pH 6,5 angesäuertem N, zTM<sub>10</sub> und mit Natronlauge neutralisiertem zTM<sub>10</sub> mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden ZTL in Medium (K) stimuliert. CD45<sup>-</sup> Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente. Fehlerbalken sind die SEM (n = 4 bis 33). Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Die Inhibition im sauren Medium ohne Milchsäurezugabe war zwar weniger ausgeprägt im Vergleich zu Milieus, welche zusätzlich zum erniedrigten pH-Wert auch Laktat enthielten, dennoch deutlich. Es war zunächst unverständlich, dass eine Inhibition auftrat, obwohl augenscheinlich kein Laktat anwesend war. Dies führte zu einer Reihe von Experimenten, um mögliche Ursachen zu finden.



Als das Medium, in welchem die ZTL für 5 h mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 stimuliert worden waren, auf Laktat hin untersucht wurde, zeigte sich, dass dieses  $6,5 \pm 0,6$  mM Laktat ( $n = 6$ ) enthielt und einen pH-Wert von 6,9 hatte. Als Quelle für das Laktat, welches nicht von außen zugegeben worden war, wurden die zur ZTL-Stimulation verwendeten Tumorzellen vermutet. Wurden die RCC26 in der zur ZTL-Stimulation verwendeten Konzentration ohne ZTL inkubiert, wurden  $7 \pm 1,5$  mM Laktat ( $n = 2$ ) in den Überständen gemessen.

Um zu klären, ob die Inhibition der T-Zell-Funktion tatsächlich auf das von den RCC26 produzierte Laktat zurückzuführen war, wurden die ZTL mit PMA und Ionomycin, anstelle der RCC26, stimuliert (Abbildung 6-16). Die Laktatkonzentration war nun mit 3 mM viel niedriger als in Anwesenheit von RCC26 und bei Ansäuerung des Milieus war kaum eine Inhibition zu sehen. Durch diese Experimente, bei welchen die Stimulation von ZTL mit PMA und Ionomycin an Stelle der RCC26 erfolgte, konnte gezeigt werden, dass ein saurer pH ohne Laktat keinen Einfluss auf die Funktion der ZTL ausübt.



**Abbildung 6-16: Einfluss von niedrigem pH-Wert bei Stimulation mit PMA/I im Vergleich zu Zielzellen**

ZTL-JB4 wurden in Medium, welches mit Phosphorsäure auf pH 6,5 azidifiziert worden war, für 5 h mit PMA plus Ionomycin stimuliert. Als Kontrolle wurden ZTL in unbehandeltem Medium stimuliert (K). Die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) wurden innerhalb der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt die vielfache Veränderung des prozentualen Anteils positiver Zellen, in Bezug zur jeweiligen Stimulation in unbehandeltem Medium (K). Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente ( $n = 5$ ). Fehlerbalken sind die SEM.

Zusammengefasst zeigen die in Abbildung 6-11 bis Abbildung 6-16 dargestellten Experimente, dass weder ein saurer pH noch Laktat alleine inhibitorisch sind. Vielmehr bedarf es beider Komponenten, um die T-Zell-Funktion zu supprimieren. Diese Ergebnisse stehen mit dem Wissen im

Einklang, dass Laktat über den Monocarboxylattransporter MCT in die Zelle transportiert wird. Es handelt sich hierbei um einen Symporter für H<sup>+</sup>-Ionen und Laktat. Der Transport erfolgt über einen Protonengradienten (Fisher et al., 1989; Garcia et al., 1994; Juel, 1996). Das bedeutet, dass Laktat nur in einem sauren Milieu in die Zelle gelangen kann, weshalb es im neutralen Milieu keinen Effekt auf die ZTL-Funktion hatte.

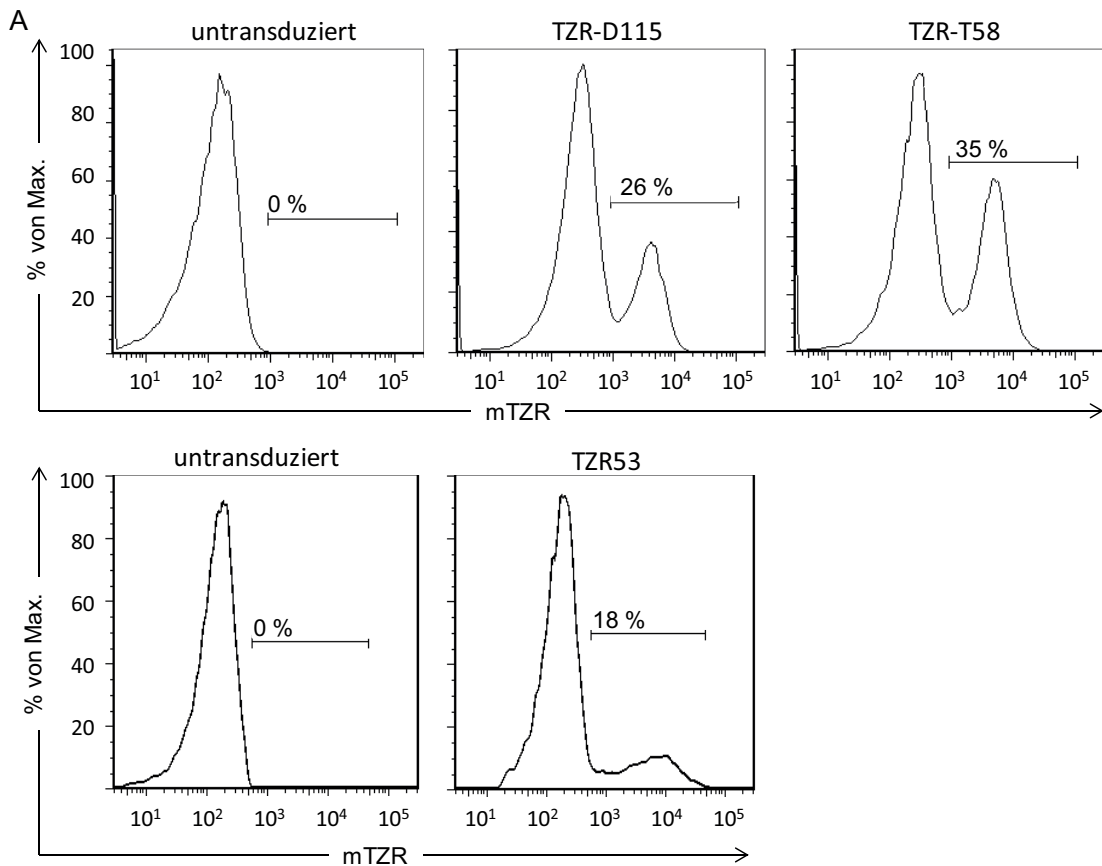
### **6.1.3 Einfluss des zellfreien Tumormilieus auf therapeutisch relevante T-Zellen**

Wie in der Einleitung beschrieben, werden TZR-transduzierte T-Zellen für die adoptive T-Zell-Therapie eingesetzt. Im Folgenden wurde daher getestet, ob auch TZR-transduzierte T-Zellen im Tumormilieu in ihrer Funktion eingeschränkt werden, da die therapeutischen Erfolge oftmals ausbleiben. Es wird vermutet, dass man bessere Erfolge erreichen könnte, würden T-Zellen mit hoch-avidem TZR eingesetzt. Hinweise aus Mausmodellen, die eine bessere Kontrolle von Lungenmetastasen durch T-Zellen mit hoch-aviden TZR zeigten, und Ergebnissen mit humanen T-Zellen in vitro unterstützen diese These (Alexander-Miller et al., 1996; Zeh et al., 1999). Über eine mögliche Beeinflussung TZR-transduzierter T-Zellen durch das Tumormilieu ist bisher nichts bekannt. Auch ist nicht bekannt, ob T-Zellen mit hoch-avidem TZR gegebenenfalls vom Tumormilieu weniger stark beeinflusst werden als solche mit niedrig-avidem TZR.

Es wurden zum einen T-Zellen mit dem TZR53 transduziert und getestet. Dieser TZR erkennt sein Antigen auf dem HLA-A2-Molekül, ist tumorspezifisch und hat eine mittlere funktionelle Avidität, wobei das Antigen noch unbekannt ist (Leisegang et al., 2010).

Zum anderen wurden die beiden TZR-D115 und -T58 verglichen, welche beide dieselbe Spezifität für ein HLA-A2-präsentiertes Tyrosinasepeptid besitzen, aber unterschiedliche funktionelle Avidität zeigen. TZR-D115 ist von niedriger funktioneller Avidität und benötigt eine höhere Ligandendichte, um eine vergleichbare Funktion wie TZR-T58 zu erreichen (Wilde et al., 2009). Nach retroviraler Transduktion der entsprechenden TZR in aktivierte humane T-Zellen waren im Fall der TZR-D115 und -T58 26 % bzw. 35 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen positiv für den entsprechenden TZR (Abbildung 6-17 A). Nach

Transduktion mit dem TZR53 kodierenden Vektor waren 18 % der CD8 T-Zellen positiv für TZR53 (Abbildung 6-17 B).

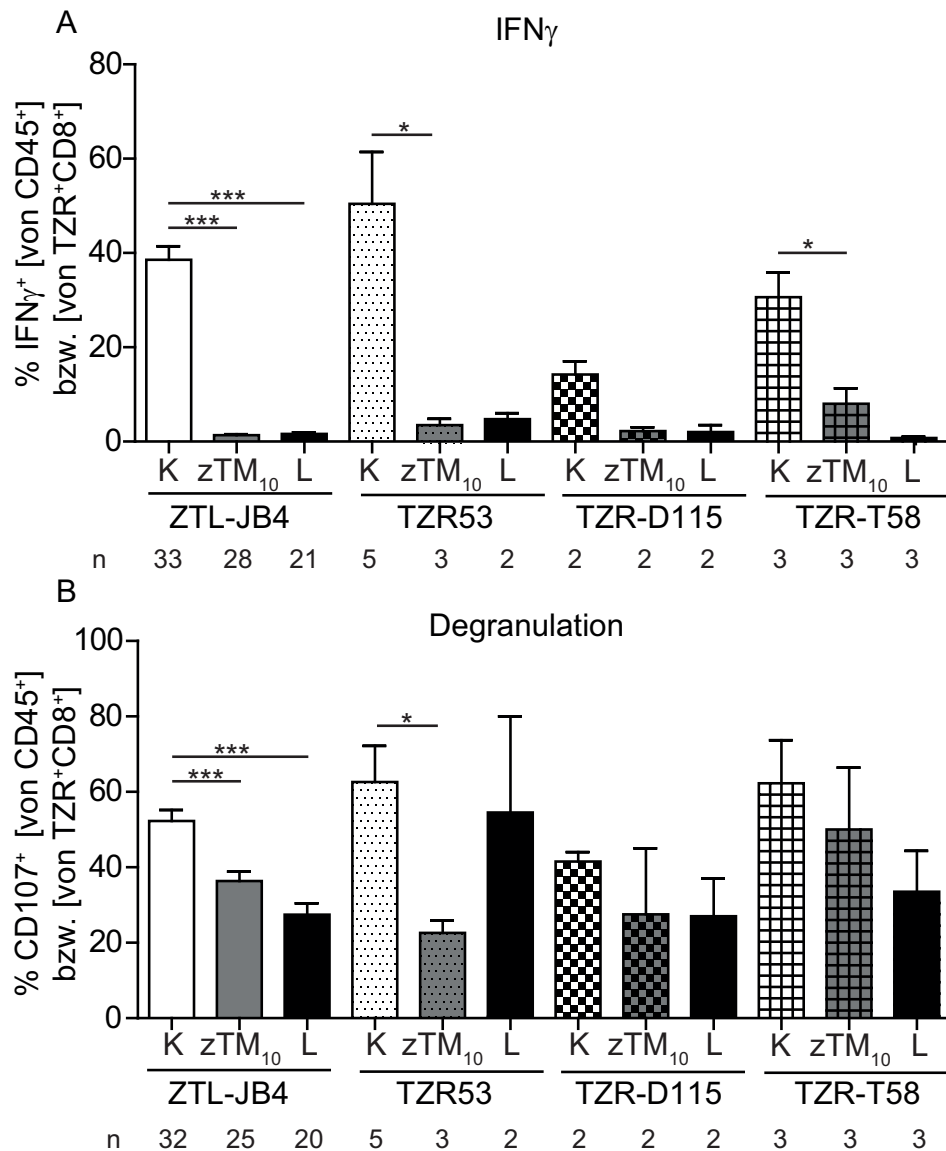


**Abbildung 6-17: TZR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach retroviraler Transduktion mit den TZR-T58, -D115 und 53**

PBMZ wurden, wie in 5.4 beschrieben, mit den TZR-T58, -D115 und 53 transduziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der TZR<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die TZR-T58<sup>+</sup>, -D115<sup>+</sup> bzw. -53<sup>+</sup> T-Zellen wurden mithilfe eines anti-murinen TZR-Antikörpers identifiziert. Als Negativkontrolle zur Markerpositionierung wurden untransduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet.

Die TZR<sup>+</sup> T-Zellen wurden in, von KT195 generiertem zTM<sub>10</sub> und in 20 mM „Milchsäure-Medium“ stimuliert und der prozentuale Anteil der zur IFN $\gamma$ -Produktion bzw. Degranulation stimulierten Zellen mit dem in Medium verglichen. Für die Stimulation der TZR53<sup>+</sup> T-Zellen und der ZTL-JB4 wurden TZR-L<sup>+</sup> RCC26 verwendet. Die TZR-D115 und -T58 sind spezifisch für Tyrosinase (Tyr) und erkennen somit die Melanomzelllinie Mel624.38, welche Tyrosinase und HLA-A2 positiv ist. Abbildung 6-18 zeigt, dass die TZR53<sup>+</sup> und TZR-D115<sup>+</sup> T-Zellen, ebenso wie der ZTL-JB4, durch das zTM und das 20 mM „Milchsäure-Medium“ vollständig in ihrer Fähigkeit zur IFN $\gamma$ -Produktion inhibiert wurden. Die hoch-aviden TZR-T58<sup>+</sup> T-Zellen zeigten in zTM<sub>10</sub> mit 8 % IFN $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen noch geringfügige Aktivität. Auch die

Degranulation der transduzierten T-Zellen war, wie der ZTL-JB4, im zTM<sub>10</sub> und im 20 mM „Milchsäure-Medium“ eingeschränkt. Die Inhibition der Degranulation der TZR53<sup>+</sup> T-Zellen in 20 mM „Milchsäure-Medium“ war nicht bewertbar, da die Variation zwischen den verschiedenen Versuchen zu groß war.



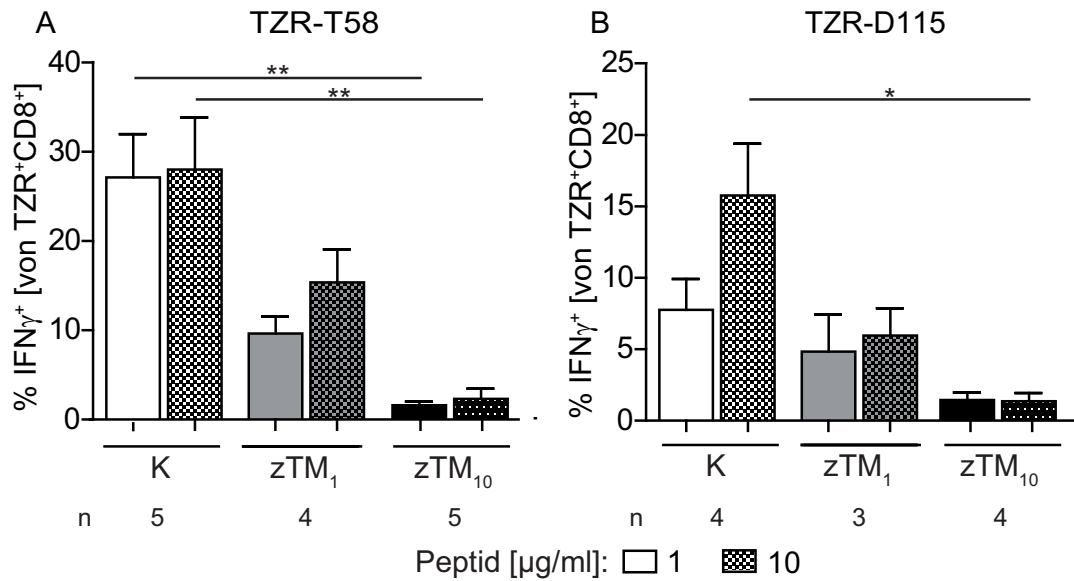
**Abbildung 6-18: Einfluss des zellfreien Tumormilieus bzw. Laktats auf die Funktion TZR-transduzierter T-Zellen**

ZTL-JB4, TZR53<sup>+</sup>, TZR-D115<sup>+</sup> und TZR-T58<sup>+</sup> T-Zellen wurden in 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) bzw. in zTM<sub>10</sub> mit TZR-L<sup>+</sup> Zellen (RCC26 für ZTL-JB4 und TZR53<sup>+</sup> T-Zellen, Mel624.387 für TZR-D115<sup>+</sup> und TZR-T58<sup>+</sup> T-Zellen) für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden die T<sub>EFF</sub>-Zellen in Medium (K) stimuliert. CD45<sup>-</sup> Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) innerhalb der TZR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. innerhalb der CD45<sup>+</sup> ZTL ermittelt. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen. Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente (n = 2 bis 33). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001).

Auch wenn alle transduzierten T-Zellen inhibiert wurden, zeigte sich in diesem ersten Experiment doch, dass T-Zellen mit dem hoch-aviden T58-Rezeptor möglicherweise etwas weniger inhibierbar sind und in zTM<sub>10</sub> noch einige T-Zellen IFN $\gamma$  produzieren können. Deshalb wurde zum einen getestet, ob die, mit dem hoch-aviden TZR-T58 ausgestatteten T-Zellen im inhibitorischen Milieu besser in der Lage sind IFN $\gamma$  zu produzieren als die niedrig-aviden TZR-D115<sup>+</sup> T-Zellen. Zum anderen wurde untersucht, ob das Ausmaß der Inhibition zur Stärke des TZR-Stimulus in Bezug steht. Dazu wurden die transduzierten T-Zellen mit T2-Zellen, welche mit wenig (1  $\mu$ g/ml) bzw. viel Tyrosinase-Peptid (10  $\mu$ g/ml) beladen worden waren in zTM, welche aus unterschiedlichen Tumorzelldichten generiert worden waren, stimuliert. Das Ausmaß der Stimulation wurde anhand der IFN $\gamma$ -Produktion und Degranulation quantifiziert. Die IFN $\gamma$ -Produktion der transduzierten T-Zellen ist in Abbildung 6-19 dargestellt, auf die Degranulation wird in Abbildung 6-20 eingegangen.

Im Medium produzierten sowohl bei schwacher, als auch bei starker Stimulation, etwa 27 % der TZR-T58<sup>+</sup> T-Zellen IFN $\gamma$ . Im zTM<sub>1</sub> hingegen waren es bei schwacher Stimulation 10 %, bei starker Stimulation noch 15 %. Das heißt, bei starkem Stimulus fiel die Inhibition der hoch-aviden TZR-T58<sup>+</sup> T-Zellen geringer aus als bei schwachem Stimulus. In stärker inhibierendem zTM<sub>10</sub> war die Inhibition generell stärker ausgeprägt (1,5 % positive Zellen) und auch bei starkem Stimulus konnte die Inhibition nicht überwunden werden.

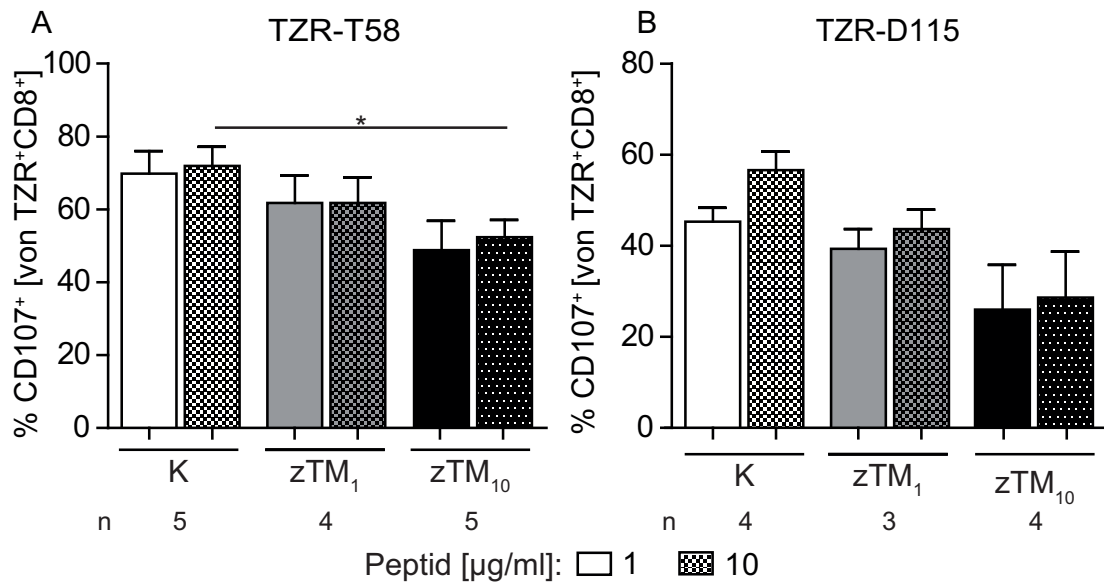
T-Zellen mit einem niedrig-aviden TZR (D115) erzielten bei einem starken Stimulus auch im Medium eine deutlich höhere Funktion. In zTM<sub>1</sub> war der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender ZTL deutlich reduziert und zeigte auch bei starkem Stimulus keine Verbesserung. Das stark inhibierende zTM<sub>10</sub> führte auch bei den TZR-D115<sup>+</sup> T-Zellen zu einer kompletten Inhibition der IFN $\gamma$ -Produktion.



**Abbildung 6-19: Einfluss zellfreier Tumorüberstände auf die IFN $\gamma$ -Produktion TZR-T58<sup>+</sup> T-Zellen bzw. TZR-D115<sup>+</sup> T-Zellen bei schwachem und starkem TZR-Stimulus**

TZR-T58<sup>+</sup> (A), und TZR-D115<sup>+</sup> (B) T-Zellen wurden in zTM verschiedener KT195 Zelldichten (zTM<sub>1</sub>, zTM<sub>10</sub>) mit T2-Zellen, welche mit 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml Tyrosinase-Peptid beladen worden waren, für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden die transduzierten T-Zellen in Medium stimuliert (K). CD19<sup>+</sup> T2-Zellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD19<sup>-</sup> T-Zellen abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion innerhalb der TZR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil IFN $\gamma$ -positiver Zellen. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente (n = 3 bis 5). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

Der Einfluss verschiedener Stimulationsstärken auf die Degranulation ist in Abbildung 6-20 dargestellt. Wie bereits in den Experimenten mit dem ZTL-Klon JB4 beobachtet, wurde auch bei den TZR-transduzierten T-Zellen die Degranulation in den verschiedenen Milieubedingungen nur geringfügig inhibiert und zeigte kaum Unterschiede, ob mit starkem oder schwachem Stimulus gearbeitet wurde. Dass sich keine Abhängigkeit von der Stimulationsstärke zeigte, beruht möglicherweise darauf, dass die Stimulation zur Degranulation nur sehr geringe Ligandendichte benötigt und somit vermutlich bereits mit der hier verwendeten niedrigen Ligandendichte (1 µg/ml Peptid) die Sensitivitätsgrenze überschritten wurde (Valitutti et al., 1996).



**Abbildung 6-20: Einfluss verschiedener zellfreier Tumorüberstände auf die Degranulation TZR-T58<sup>+</sup> T-Zellen bzw. TZR-D115<sup>+</sup> T-Zellen bei schwachem und starkem TZR-Stimulus**

TZR-T58<sup>+</sup> (A), und TZR-D115<sup>+</sup> (B) T-Zellen wurden in zTM verschiedener KT195 Zelldichten (zTM<sub>1</sub>, zTM<sub>10</sub>) mit T2-Zellen, welche mit 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml Tyrosinase-Peptid beladen worden waren, für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden die transduzierten T-Zellen in Medium stimuliert (K). CD19<sup>+</sup> T2-Zellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD19<sup>-</sup> T-Zellen abgetrennt und anschließend die Degranulation innerhalb der TZR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil CD107<sup>+</sup> Zellen. Die Balken sind die Mittelwerte der Prozentzahlen der verschiedenen Experimente (n = 3 bis 5). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die verschiedenen zTM die IFN $\gamma$ -Produktion auch von TZR-transduzierten T-Zellen inhibieren. Die Ergebnisse liefern einen Hinweis, dass T-Zellen, welche mit einem hoch-aviden TZR ausgestattet sind, die Inhibition möglicherweise etwas besser überkommen können als solche, die niedrig-avide TZR exprimieren, jedoch auch nur dann, wenn das Inhibitionspotential des Milieus nicht zu hoch ist und die T-Zellen durch eine hohe Antigen-dichte auf den Zielzellen einen starken Stimulus erhalten.

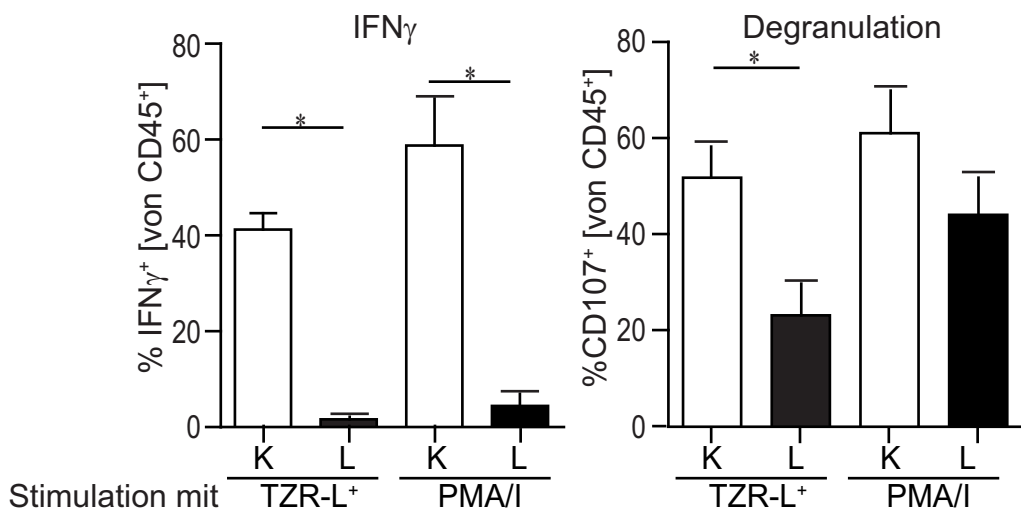
#### 6.1.4 TZR-Signaltransduktion im Tumormilieu

Wie in der Einleitung (siehe 2.1.2) beschrieben, wird das über den TZR erhaltene Signal über eine Signalkaskade in der T-Zelle in Funktionen umgesetzt. Da die Funktion der T-Zellen im Tumorüberstand bzw. im „Milchsäure-Medium“ eingeschränkt war, wurde untersucht, ob die

Signalkaskaden gestört sind. Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse wurden im Wesentlichen in der Publikation Mendler et al. veröffentlicht (Mendler et al., 2011).

#### 6.1.4.1 Untersuchung der Phosphorylierung von Signalproteinen

Proximale Signalproteine wurden von Dr. Hu in der Arbeitsgruppe mittels Westernblot untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied im Phosphorylierungsmaß von ZAP70 und LAT, wenn diese im zTM im Vergleich zum Medium stimuliert wurden (siehe Abbildung 10-1 im Anhang). Der Befund, dass die zum TZR-proximalen Signalmoleküle durch das zTM nicht beeinflusst werden, steht im Einklang mit der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Beobachtung, dass die Inhibition auch bei Stimulation mit PMA plus Ionomycin zu beobachten war (siehe Abbildung 6-21). PMA ist ein DAG-Homolog und Ionomycin induziert einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Zelle. Daher war anzunehmen, dass die Inhibition durch Laktat im sauren pH nicht proximal am TZR, sondern distal von DAG und  $\text{Ca}^{2+}$ -Induktion erfolgte.



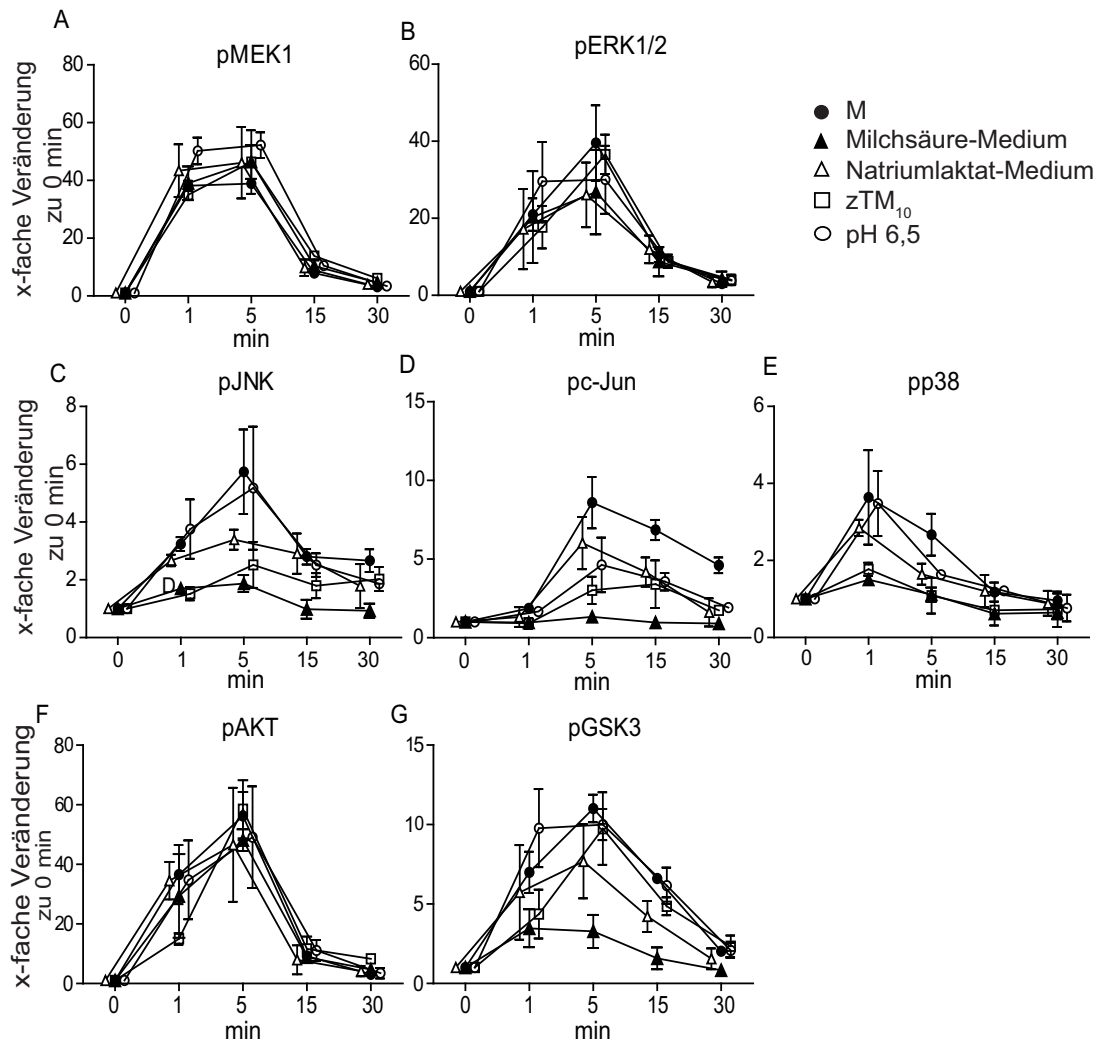
**Abbildung 6-21: Stimulation von ZTL-JB4 mit TZR-L $^+$  Zellen und PMA plus Ionomycin in 20 mM „Milchsäure-Medium“**

ZTL-JB4 wurden in 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) mit TZR-L $^+$  RCC26 bzw. PMA plus Ionomycin (PMA/I) für 5 h stimuliert. Als Kontrolle wurden die ZTL in Medium (K) stimuliert. CD45 $^+$  Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45 $^+$  ZTL abgetrennt und anschließend die IFN $\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente (n = 4). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05).



## Ergebnisse

Mit Hilfe eines Phosphoprotein-Multiplexes wurde die Phosphorylierung der TZR-distalen Proteine untersucht. Dafür wurden die ZTL für 0, 1, 5, 15 und 30 min in Medium, 20 mM „Milchsäure-Medium“, 20 mM „Natriumlaktat-Medium“, auf pH 6,5 angesäuertem Medium und von KT195 generiertem zTM<sub>10</sub> stimuliert. Anschließend wurde das Ausmaß der Phosphorylierung der Proteine MEK1, ERK1/2, JNK, c-Jun, p38, AKT und GSK3 in den Zelllysaten bestimmt (Abbildung 6-22).



**Abbildung 6-22: Einfluss von Laktat, zellfreiem Tumormilieu und saurem pH auf die Phosphorylierung von MEK1, ERK1/2, c-Jun, p38, AKT und GSK3**

ZTL-JB4 wurden über 4,5 h in Medium bzw. in 20 mM „Milchsäure-Medium“, oder „Natriumlaktat-Medium“, zTM<sub>10</sub> oder auf pH 6,5 azidifiziertem Medium (pH 6,5) inkubiert. Anschließend wurden die ZTL für 0, 1, 5, 15 und 30 min durch Kreuzvernetzung von CD3 in dem entsprechenden Milieu stimuliert. Die T-Zellen wurden lysiert und die Phosphorylierung von MEK1 (Ser<sup>217</sup>/Ser<sup>221</sup>) (A), ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>) (B), JNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) (C), c-Jun (Ser<sup>63</sup>) (D), p38 (Thr<sup>180</sup>/Thr<sup>182</sup>) (E), AKT (Ser<sup>473</sup>) (F) und GSK3 (Ser<sup>21</sup>/Ser<sup>9</sup>) (G) über Phosphoprotein-Multiplex untersucht. Die zu jedem Zeitpunkt gemessene Fluoreszenzintensität wurde zur Fluoreszenzintensität zum 0 min-Zeitpunkt ins Verhältnis gesetzt. Die y-Achse zeigt die x-fache Veränderung zur 0-minütigen Stimulation. Die Symbole sind die Mittelwerte der Experimente (n = 3 bis 4). Fehlerbalken sind die SEM.

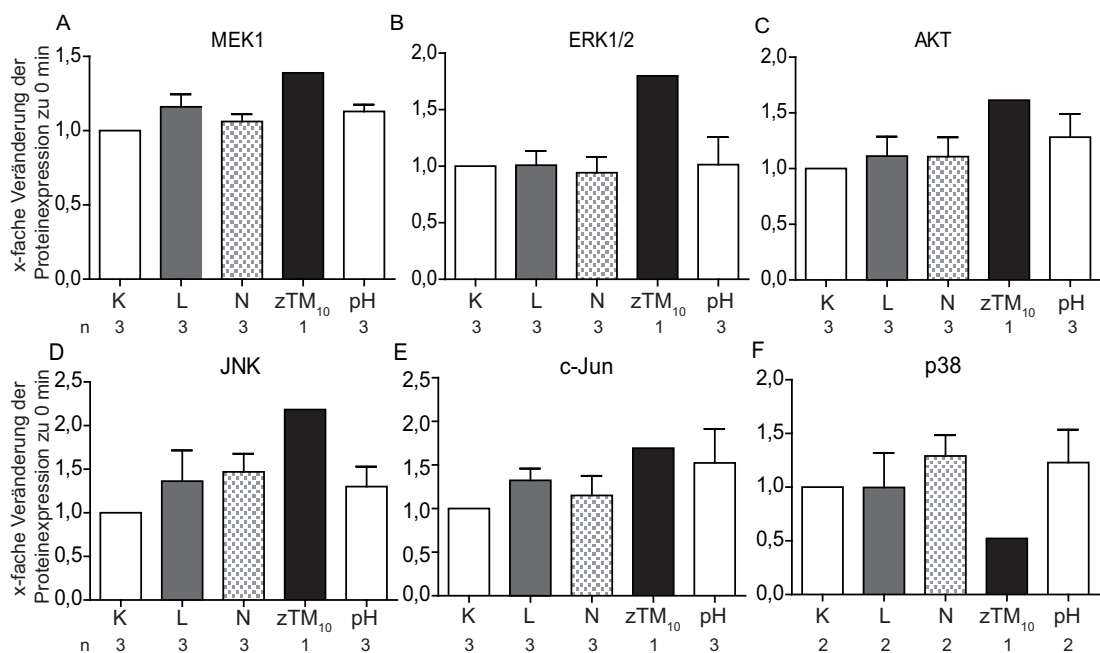
Die Phosphorylierung von MEK1 und ERK1/2 erreichte im Medium nach ein- bzw. fünfminütiger Stimulation den Maximalwert und war bei 15 min Stimulation wieder nahezu am Ausgangswert. Dieser Verlauf war weder quantitativ noch im zeitlichen Verlauf bei Stimulation in „Milchsäure-Medium“ oder zTM<sub>10</sub> verändert. Die beiden MAPK, p38 und JNK sowie c-Jun zeigten ebenfalls eine maximale Phosphorylierung bei 1 bzw. 5 min in Medium. Die Phosphorylierung blieb bei Stimulation in „Milchsäure-Medium“ und zTM<sub>10</sub> aus. c-Jun und über phosphoryliertes p38 aktiviertes c-Fos, sind Transkriptionsfaktoren, welche für die Transkription verschiedener Zytokine nötig sind. Die Inhibition der Phosphorylierung von c-Jun und p38 durch „Milchsäure-Medium“ und zTM<sub>10</sub> könnte daher die Störung in der Zytokinproduktion erklären.

„Natriumlaktat-Medium“ und Medium mit saurem pH-Wert, welche die IFN $\gamma$ -Produktion nicht inhibiert hatten, zeigten auch keine inhibitorische Wirkung auf die Phosphorylierung der untersuchten Signalproteine.

Des Weiteren wurden die Proteine AKT und GSK3 untersucht. Die Phosphorylierung von AKT war in den verschiedenen Milieus vergleichbar. AKT ist eine Proteinkinase, welche über die PI3-Kinase oder PKC aktiviert wird, und in multiplen zellulären Prozessen, u.a. der Zytokintranskription, eine Rolle spielt (Macintyre et al., 2011). GSK3 ist ebenfalls eine Kinase, welche in ruhenden Zellen aktiv ist. Sie inhibiert durch Phosphorylierung NFAT und somit die Transkription einer Reihe von Genen. GSK3 wird klassischerweise bei TZR-Stimulation durch aktiviertes AKT phosphoryliert und inaktiviert, sodass die NFAT-vermittelte Transkription stattfinden kann. Im Einklang mit einer stattfindenden AKT-Phosphorylierung wurde auch GSK3, außer im „Milchsäure-Medium“, in allen Milieus phosphoryliert und somit inhibiert. Das bedeutet, dass Transkriptionen über NFAT vermutlich im zTM<sub>10</sub> nicht gestört sind. Das Ergebnis, dass GSK3 trotz AKT-Phosphorylierung und -Aktivierung im „Milchsäure-Medium“ nicht phosphoryliert wurde, deutet darauf hin, dass andere Mechanismen für die verminderte Phosphorylierung von GSK3 im „Milchsäure-Medium“ verantwortlich sind.

Die im Phosphoprotein-Multiplex erzielten Ergebnisse wurden durch Dr. Hu im Labor durch Westernblots bestätigt (siehe Anhang Abbildung 10-2) (Mendler et al., 2011).

Um zu testen, ob das unterschiedliche Maß der Phosphorylierung auf einem veränderten Niveau an Gesamtproteinmenge des entsprechenden Signalmoleküls beruht, wurde die Menge an unphosphoryliertem Signalprotein mit Hilfe des Gesamtprotein-Multiplexes untersucht. Abbildung 6-23 zeigt, dass die Menge an Gesamtprotein der verschiedenen Signalproteine in den unterschiedlichen Milieus relativ stabil war. Abweichungen zeigten sich nur im zTM<sub>10</sub>. Allerdings konnte für diese Milieubedingung nur eine Messung durchgeführt werden, so dass ein experimenteller Artefakt nicht auszuschließen ist.

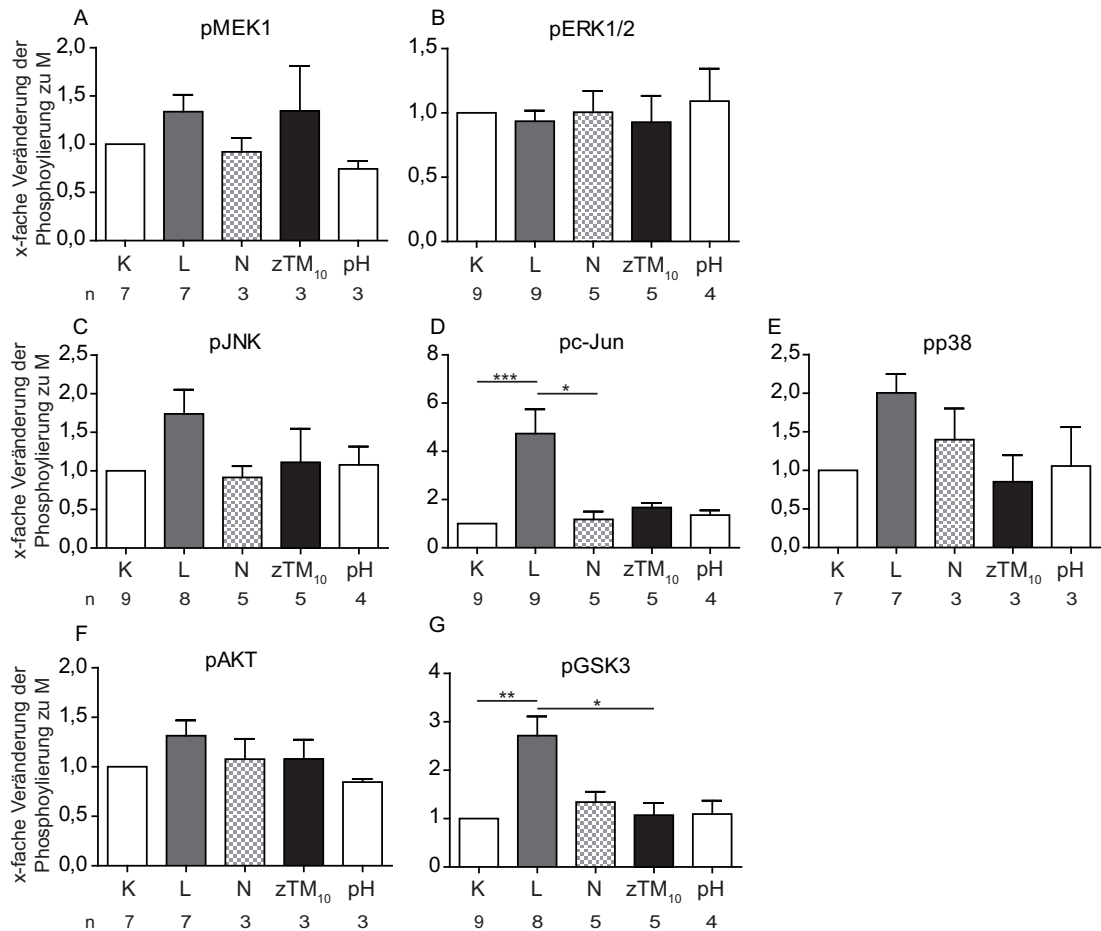


**Abbildung 6-23: Einfluss von Laktat, zellfreiem Tumormilieu und saurem pH auf die Menge an Gesamtprotein der Signalmoleküle MEK1, ERK1/2, AKT, JNK, c-Jun und p38**  
 ZTL-JB4 wurden für 4,5 h in „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) bzw. „Natriumlaktat-Medium“ (N), auf pH 6,5 angesäuertem Medium (pH) und in zTM hoher KT195-Zelldichte (zTM<sub>10</sub>) inkubiert. Als Kontrolle wurden ZTL in Medium inkubiert (K). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Signalproteine MEK1 (A), ERK1/2 (B), AKT (C), JNK (D), c-Jun und p38 (F) über Gesamtprotein-Multiplex analysiert. Die y-Achse zeigt die x-fache Veränderung der Menge an Protein im Vergleich zur Inkubation im Medium. Die Balken sind die Mittelwerte mehrerer Experimente (n = 1 bis 3). Fehlerbalken sind die SEM.

Weil bei der Untersuchung der durch CD3-Stimulation induzierten Phosphorylierung der Signalproteine die Stimulationszeiten extrem kurz waren, wurden die T-Zellen zunächst für 4,5 h im jeweiligen Milieu vorinkubiert und dann die CD3-Stimulation im jeweiligen Milieu durchgeführt. Die vorherigen Graphiken stellen die durch CD3-Stimulation hervorgerufene Veränderung der Menge an phosphoryliertem Protein dar. Es hatte sich

gezeigt, dass p38, JNK und c-Jun bei CD3-Stimulation im zTM<sub>10</sub> und „Milchsäure-Medium“ nicht phosphoryliert wurden. Die GSK3-Phosphorylierung war im „Milchsäure-Medium“ inhibiert (Abbildung 6-22). Betrachtete man die Absolutmenge an phosphoryliertem Signalprotein, so zeigte sich eine weitere Auffälligkeit: Die Signalproteine p38, JNK, c-Jun und GSK3, nicht aber MEK1, ERK1/2 oder AKT, wiesen nach 4,5 h Inkubation im „Milchsäure-Medium“ ohne Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung im Vergleich zu T-Zellen auf, welche im Medium inkubiert worden waren. Obwohl zTM<sub>10</sub> die gleiche Menge an Laktat und ähnlichen pH-Wert hat, war die Phosphorylierung in dieser Bedingung mit der nach Inkubation im Medium, im „Natriumlaktat-Medium“ und im sauren pH vergleichbar (Abbildung 6-24). Der zugrunde liegende Mechanismus, der die Phosphorylierung im „Milchsäure-Medium“ auslöste und warum dies nicht in zTM<sub>10</sub> geschah, ist derzeit unklar.

## Ergebnisse



**Abbildung 6-24: Einfluss von Laktat, zellfreiem Tumormilieu und saurem pH auf die Phosphorylierung der Signalmoleküle MEK1, ERK1/2, JNK, c-Jun, p38, AKT und GSK3 ohne TZR-Stimulation**

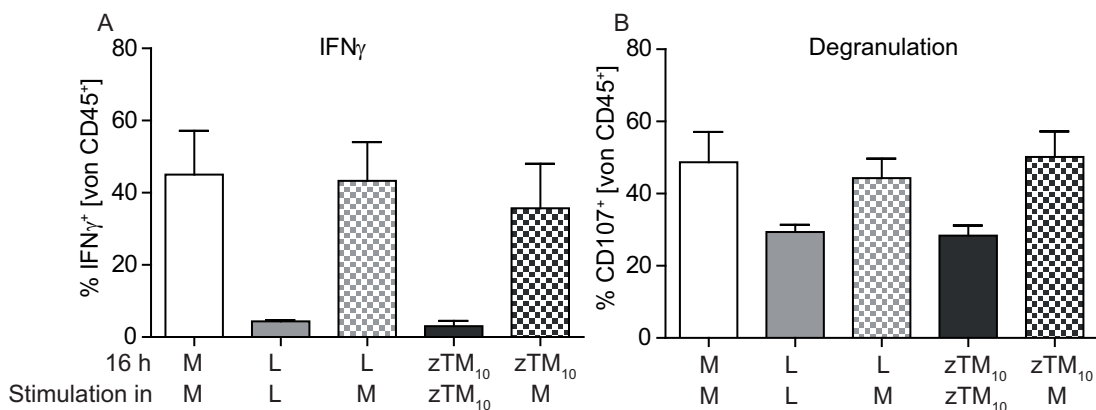
ZTL-JB4 wurden für 4,5 h in 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) bzw. 20 mM „Natriumlaktat-Medium“ (N), auf pH 6,5 azidifiziertes Medium (pH) und in zTM hoher KT195-Zellkonzentration (zTM<sub>10</sub>) inkubiert. Als Kontrolle wurden ZTL für 4,5 h in Medium inkubiert (K). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung der Signalproteine MEK1 (A), ERK1/2 (B), JNK (C), c-Jun (D), p38 (E), AKT (F) und GSK3 (G) über Phosphoprotein-Multiplex analysiert. Die y-Achse zeigt die vielfache Veränderung der Phosphorylierung relativ zur Inkubation im Medium. Die Balken sind die Mittelwerte mehrerer Experimente (n = 3 bis 9). Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### 6.1.5 Reversibilität der Inhibition

Im Folgenden wurde untersucht, ob die durch das Tumormilieu induzierte Inhibition revertierbar war.

#### 6.1.5.1 Reversibilität der funktionellen Inhibition

Um zu testen, ob die Inhibition der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion und der Degranulation reversibel war, wurden ZTL für 16 h in 20 mM „Milchsäure-Medium“ bzw. zTM hoher Tumorzell-dichte (zTM<sub>10</sub>) oder Medium inkubiert und anschließend die ZTL für die funktionelle Abfrage entweder in dem jeweiligen Medium belassen oder in frisches Medium umgesetzt. Abbildung 6-25 zeigt, dass sowohl die Degranulation als auch die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion wieder vollständig hergestellt war, wenn die T-Zellen dem inhibitorischen Milieu nicht mehr ausgesetzt waren.



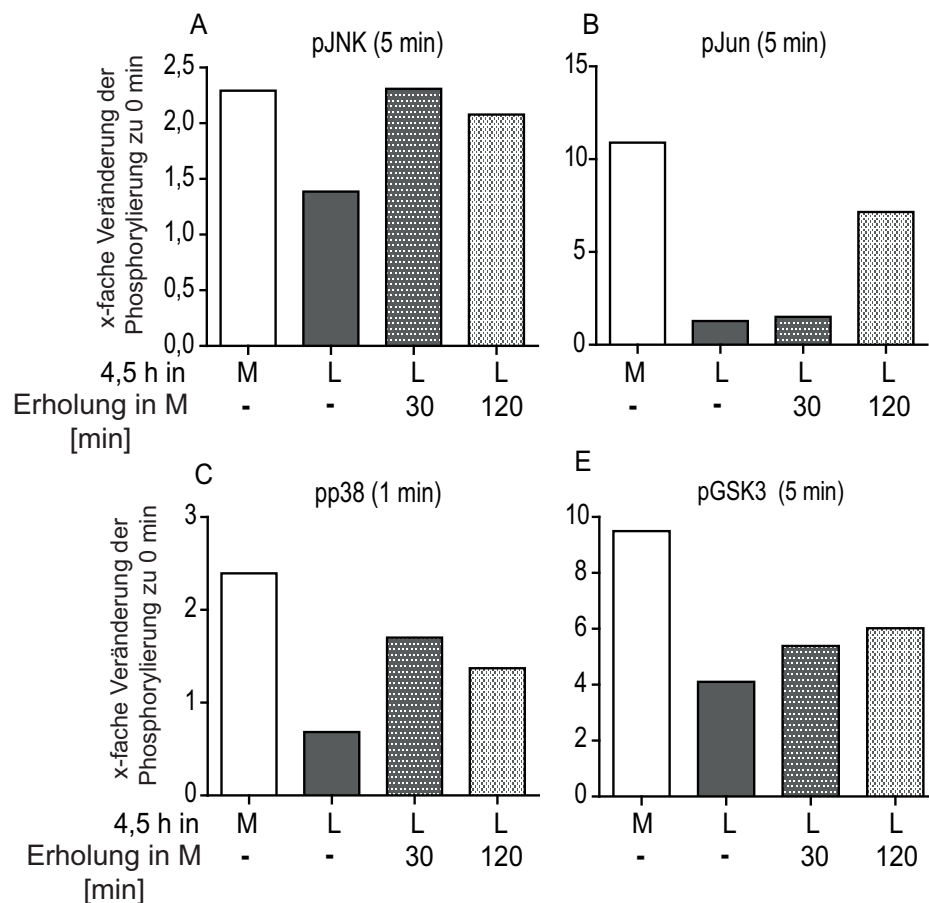
**Abbildung 6-25: Funktion von ZTL-JB4 nach Entfernung des inhibitorischen Milieus**

ZTL-JB4 wurden für 16 h in Medium (M) bzw. 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid), oder zTM hoher Zelldichte (zTM<sub>10</sub>) präinkubiert. Anschließend wurden sie entweder in dem jeweiligen Medium oder in frischem Medium für 5 h mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 stimuliert. CD45<sup>+</sup> Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion (A) und die Degranulation (B) der ZTL ermittelt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte der Experimente (n = 3). Fehlerbalken sind die SEM.

#### 6.1.5.2 Reversibilität der Inhibition der Phosphorylierung der Signalproteine

Da die Funktion der T-Zellen nach Entfernung des inhibitorischen Milieus schnell wiederhergestellt war, wurde getestet, ob die verminderte Phosphorylierung der Kinasen p38, JNK und c-Jun sowie GSK3 ebenfalls

wieder normalisiert war. Dazu wurden die Zellen für 4,5 h in 20 mM „Milchsäure-Medium“ inkubiert und anschließend entweder sofort in diesem Medium über CD3-Kreuzvernetzung stimuliert, oder vor der Stimulation für 30 min bzw. 2 h in frisches Medium umgesetzt. In Abbildung 6-26 ist die Phosphorylierung der einzelnen Proteine zu dem Zeitpunkt dargestellt, zu dem die Phosphorylierung des jeweiligen Signalproteins die höchste war (5 min für JNK, GSK3, c-Jun; 1 min für p38). Bei den Kinasen JNK, p38 und GSK3 war bereits nach 30 min im frischen Medium ein Zugewinn der Phosphorylierung zu erkennen. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun war nach 2 h im frischen Medium verbessert.



**Abbildung 6-26: Phosphorylierung inhibierter Signalmoleküle nach Entfernung des inhibitorischen Milieus**

ZTL-JB4 wurden für 4,5 h in Medium (M) bzw. 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) inkubiert. Die Stimulation durch CD3-Kreuzvernetzung erfolgte entweder sofort, oder nach 30 min bzw. 2 h nachdem die Zellen vom „Milchsäure-Medium“ in frisches Medium umgesetzt worden waren. Anschließend wurden die T-Zellen lysiert und die Phosphorylierung von JNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) (A), c-Jun (Ser<sup>63</sup>) (B), p38 (Thr<sup>180</sup>/Thr<sup>182</sup>) (C) und GSK3 (Ser<sup>21</sup>/Ser<sup>9</sup>) (D) mittels Phosphoprotein-Multiplex untersucht. Die y-Achse zeigt die vielfache Veränderung der Phosphorylierung in Bezug auf den jeweiligen 0 min-Stimulationswert. Für jedes Protein ist der Stimulationszeitpunkt dargestellt, zu dem die Phosphorylierung die höchste war. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zweien.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die durch zTM und „Milchsäure-Medium“ induzierte funktionelle Inhibition von T-Zellen revertierbar war, wenn das inhibitorische Milieu entfernt wurde. Diese funktionelle Reversion ging mit einer Wiederherstellung der Phosphorylierung verschiedener Signalmoleküle einher.

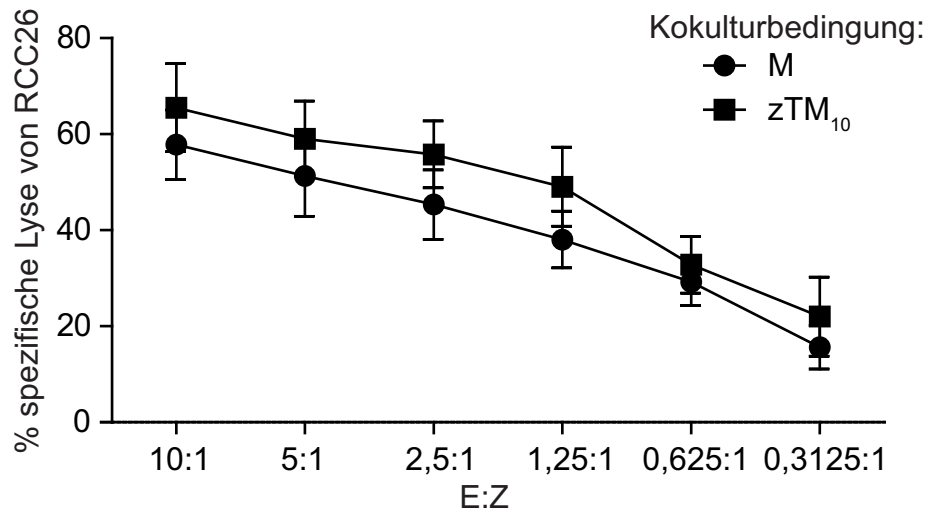
### **6.2 Folgen einer langfristigen Exposition der T-Zellen im Tumormilieu**

Im folgenden Teil der Arbeit wurde die langfristige Exposition von T-Zellen im Tumormilieu analysiert. Hierfür wurden, wie bei der Funktionsanalyse, verschiedene In-vitro-Modelle verwendet, mit denen der Einfluss zellulärer Interaktionen und tumorsezerner Faktoren untersucht wurde.

#### **6.2.1 Einfluss des Tumormilieus auf die Zytotoxizität von ZTL**

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass ZTL unmittelbar nach Konfrontation mit dem Tumormilieu in der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion inhibiert wurden. Die Degranulation, d.h. die Exozytose lytischer Granula, hingegen war nur zu etwa 30 % reduziert. Diese ist der erste Schritt, der zur zytotoxischen Abtötung der signalauslösenden Zielzelle führen kann, wenn aus den Granula zytotoxische Proteine in die Zielzelle übertragen werden. In Abbildung 6-27 ist das Ergebnis eines Zytotoxizitätstests gezeigt. Dabei wurden  $\text{TZR-L}^+$  RCC26 Zielzellen mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert und mit ZTL-JB4 entweder in Medium oder im zellfreiem Tumormilieu hoher Tumorzell-dichte ( $\text{zTM}_{10}$ ) für 4 h kokultiviert. Die Lyse der Zielzelle RCC26 war im Medium und im  $\text{zTM}_{10}$  vergleichbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass der zytotoxische Effekt von ZTL auf Tumorzellen in einem Milieu, welches die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion vollständig inhibiert und die Degranulation um etwa 30 % reduziert, nicht beeinflusst ist.





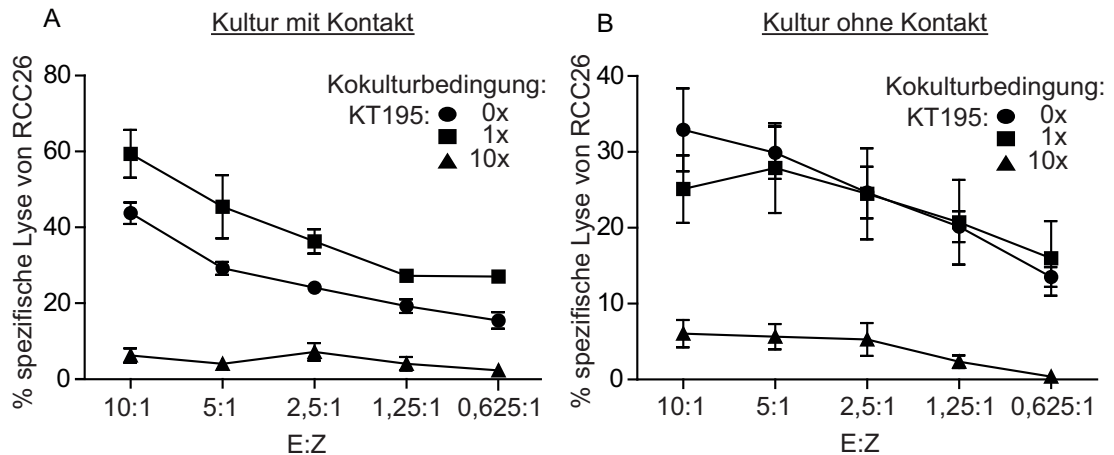
**Abbildung 6-27: Zytotoxizität von ZTL im zellfreien Tumormilieu**

Die Zytotoxizität von ZTL-JB4 wurde in Medium (M) bzw. im zellfreien Tumormilieu hoher KT195-Dichte (zTM<sub>10</sub>) in einem 4 h Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Es wurden verschiedene Effektor- zu Zielzell-Verhältnisse (E:Z) eingesetzt. Als Zielzellen dienten <sup>51</sup>Cr-markierte TZR-L<sup>+</sup> RCC26. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil spezifischer Lyse der Tumorzellen. Die Symbole zeigen den Mittelwert mehrerer Experimente (n = 3). Die Fehlerbalken sind die SEM. Die spezifische Lyse von TZR-L<sup>-</sup> Tumorzellen, lag unabhängig vom E:Z Verhältnis, immer unter 5 %.

Dieses Ergebnis schien zunächst mit den Befunden aus der Arbeitsgruppe und der Literatur nicht kompatibel, da aus „realen“ Tumoren, z.B. aus humanem RCC-Gewebe, isolierte CD8-T<sub>EFF</sub>-Zellen nicht zytotoxisch sind (Holmes, 1985; Finke et al., 1994; Van den Hove et al., 1997). Daher wurde vermutet, dass dieses In-vitro-Modell die Tumormilieubedingungen, unter welcher sich die TIL befinden, bezüglich der Zytotoxizität nicht vollständig widerspiegelt. Der Großteil der aus dem Tumorgewebe isolierten TIL ist dem Tumormilieu vermutlich länger ausgesetzt als die 4 h, über welche die lytische Aktivität beim Chrom-Freisetzungstest abgefragt wird.

Daher wurden T-Zellen mit oder ohne Kontakt zu Tumorzellen in einem „Transwell“ in einem Verhältnis von 1:1 (1x), welches einen kleinen Tumor, oder 1:10 (10x), welches einen großen Tumor nachahmen sollte, für 40 h kokultiviert. Das Tumormilieu wurde durch TZR-L<sup>-</sup> KT195 Tumorzellen nachgeahmt, um eine Erschöpfung der T-Zellen durch chronische Tumorzellerkennung zu vermeiden. Nach 40-stündiger Kokultur wurden die ZTL geerntet und deren Zytotoxizität in einem Chrom-Freisetzungstest abgefragt. In Abbildung 6-28 ist die lytische Kapazität der ZTL, die entweder ohne Tumorzellen (0x), mit wenigen Tumorzellen (1x), oder vielen Tumorzellen in hoher Dichte (10x), entweder in Kontakt (A) oder ohne

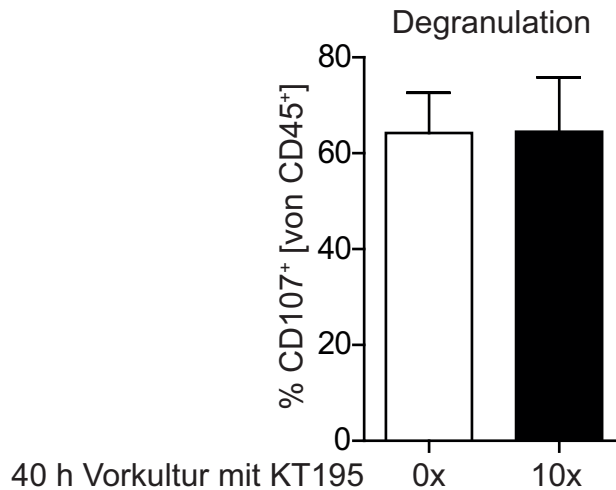
Kontakt (B) kultiviert worden waren, gezeigt. ZTL, die über 40 h mit 10x Tumorzellen kokultiviert worden waren, egal ob mit oder ohne Kontakt, lysierten TZR-L<sup>+</sup> Tumorzellen nicht. Die Kokultur mit 1x Tumorzellen hingegen führte zu keinem Verlust der Zytotoxizität.



**Abbildung 6-28: Einfluss einer langfristigen Exposition von ZTL-JB4 in Kontakt bzw. ohne Kontakt mit Tumorzellen, auf die Zytotoxizität von ZTL-JB4**

JB4-ZTL wurden für 40 h ohne (0x) bzw. mit niedriger (1x) und hoher Tumorzellichte (10x), mit Kontakt (A) bzw. ohne Kontakt, im „Transwell“ (B) kultiviert. Anschließend wurde das zellfreie Tumormilieu entfernt und ihre Zytotoxizität in einem 4 h Chrom-Freisetzungstest in frischem Medium in verschiedenen Effektor zu Zielzell-Verhältnissen (E:Z) abgefragt. Als Zielzellen dienten <sup>51</sup>Cr markierte TZR-L<sup>+</sup> RCC26. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil lysierter RCC26 Tumorzellen. Die Symbole zeigen den Mittelwert mehrerer Experimente (n = 1 für A, 3 für B). Die Fehlerbalken sind die SEM. Die spezifische Lyse von TZR-L<sup>+</sup> Tumorzellen lag unabhängig vom E:Z Verhältnis immer unter 5 %.

Die Zelllyse wird durch zytotoxische Proteine, Perforin und Granzyme, vermittelt, welche beim Prozess der Granulaexozytose in die Zielzelle übertragen werden. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die langfristige Kokultur von ZTL mit Tumorzellen auf die Degranulation und die Expression der Zytotoxine ausübt. ZTL wurden für 40 h im „Transwell“ mit Tumorzellen in hoher Dichte (10x) kokultiviert und anschließend in frischem Medium stimuliert und die Degranulation durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 6-29 zeigt, dass eine lange Kokultur mit Tumorzellen die Degranulationskapazität der ZTL nicht beeinflusst, wenn diese den zellulären als auch den löslichen Komponenten des inhibitorischen Milieus nicht mehr ausgesetzt sind. Der Verlust der Zytotoxizität ist also nicht das Resultat einer verminderten Granulaexozytose.



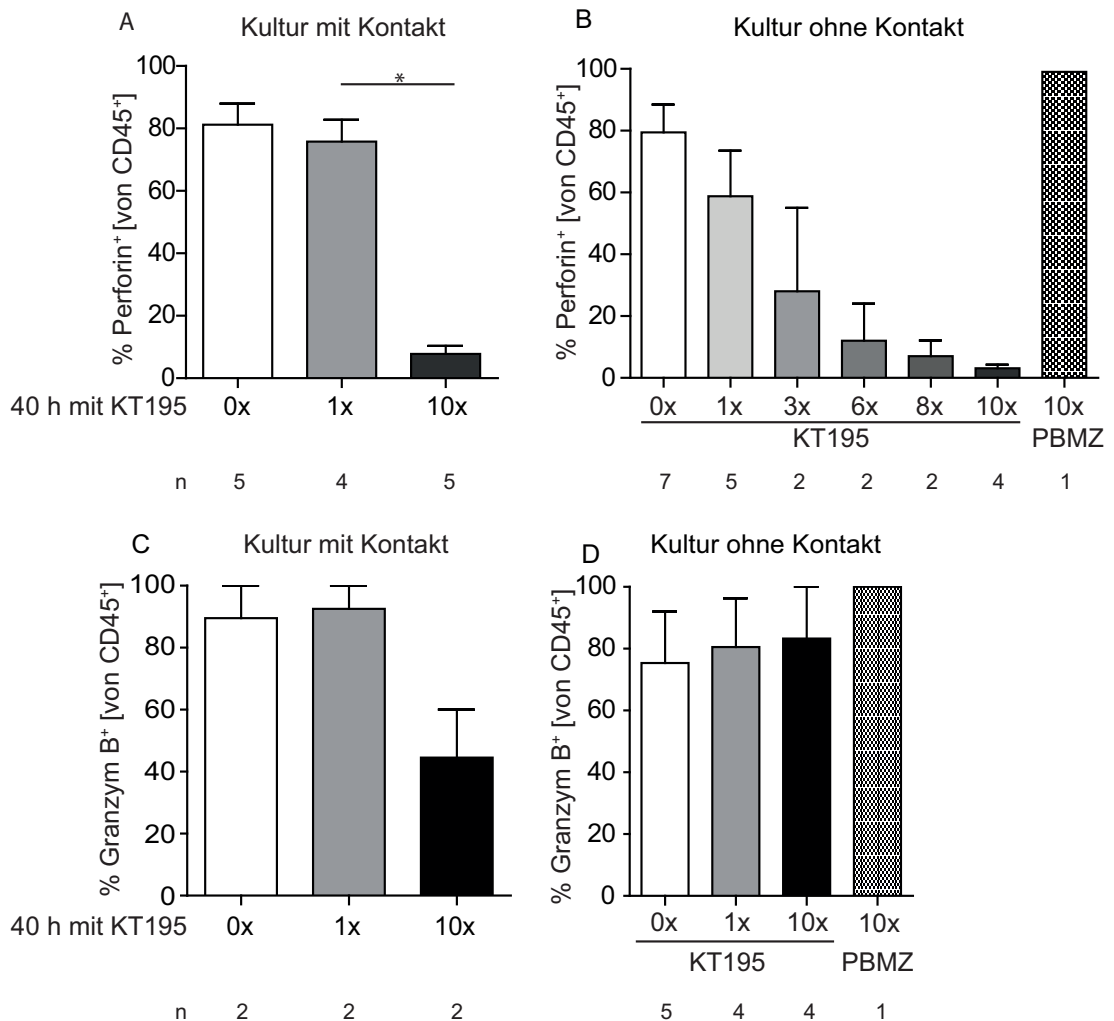
**Abbildung 6-29: Degranulation von ZTL-JB4 nach 40 h Kokultur mit Tumorzellen im „Transwell“**

ZTL-JB4 wurden für 40 h ohne (0x) bzw. mit hoher Tumorzellzahl (10x) ohne Zell-Zell-Kontakt im „Transwell“ kultiviert. Anschließend wurde das zellfreie Tumormilieu entfernt und die Zellen in frischem Medium für 5 h mit TZR-L<sup>+</sup> RCC26 stimuliert. CD45<sup>-</sup> Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend die Degranulation der ZTL ermittelt. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL dargestellt. Die Balken sind die Mittelwerte mehrerer Experimente (n = 4). Die Fehlerbalken sind die SEM.

Anschließend wurde der Gehalt der Zytotoxine Perforin und Granzym B nach 40-stündiger Kokultur mit Tumorzellen durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 6-30 zeigt, dass es durch die Kokultur mit Tumorzellen zum Perforinverlust in den ZTL kam. Dieser Verlust war unabhängig vom Kontakt der ZTL zu den Tumorzellen aber abhängig von der Dichte der Tumorzellen, welche für die Kokultur mit den ZTL verwendet worden war. Während bei Kokultur mit 1x Tumorzellen fast keine Perforin-negativen ZTL entstanden, waren nach der Kokultur der ZTL mit 10x Tumorzellen nur noch ca. 5 % der ZTL Perforin-positiv. Als Kontrolle wurden ZTL mit 10x PMBZ im Transwell kokultiviert, da es sich hierbei um ruhende Zellen handelt. Diese Bedingung führte nicht zum Perforinverlust. Die Ergebnisse zeigen, dass ein durch Tumorzellen in hoher Zelldichte generiertes lösliches Milieu zum Perforinverlust führte. Zellkontakt war nicht nötig.

Die Kokultur von ZTL mit Tumorzellen in hoher Dichte führte bei 50 % der ZTL ebenfalls zum Verlust des Zytotoxins Granzym B. Dieser Verlust war abhängig vom Zellkontakt zwischen Tumorzellen und ZTL, da die Kokultur im „Transwell“ zu keinem Verlust des Granzym B führte.

## Ergebnisse



**Abbildung 6-30: Einfluss niedriger und hoher Tumorzellichte im Kontakt und ohne Kontakt auf den Gehalt von Perforin und Granzym B in ZTL-JB4**

ZTL-JB4 wurden für 40 h ohne Tumorzellen (0x) bzw. mit TZR-L<sup>-</sup> KT195 in niedriger (1x) und hoher Zelldichte (10x) in Kontakt (A und C) oder ohne Kontakt im „Transwell“ (B und D) kokultiviert. Als Kontrolle wurden ZTL mit 10x PBMZ (B und D) ohne Kontakt für 40 h kokultiviert. CD45<sup>-</sup> Tumorzellen wurden mittels des Auswerteprogramms FlowJo von den CD45<sup>+</sup> ZTL abgetrennt und anschließend Perforin (A und B) bzw. Granzym B (C und D) nachgewiesen. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der ZTL. Die Balken sind die Mittelwerte mehrerer Experimente (n = 1 bis 7). Die Fehlerbalken sind die SEM. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis ermittelt. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunn (\*p < 0,05).

Es kann zusammengefasst werden, dass eine längere Exposition von ZTL im Tumormilieu zum Verlust der Zytotoxizität führt. Die Degranulation wurde durch die lange Kokultur nicht beeinflusst und war daher nicht für den Zytotoxizitätsverlust ursächlich. Granzym B scheint für die Zytotoxizität nicht ausreichend zu sein, da die Expression durch die Kokultur der ZTL mit den Tumorzellen im „Transwell“ unbeeinflusst war, die ZTL aber keine lytische Aktivität besaßen. Das Zytotoxin Perforin hingegen scheint für die Vermittlung der Zytotoxizität von essentieller Bedeutung zu sein, da es

sowohl durch die Kokultur mit Kontakt, als auch ohne Kontakt, bei einer hohen Tumorzell-dichte, analog zur lytischen Aktivität der ZTL, zu einem vollständigen Verlust kam.

## 7 Diskussion

Da der adoptive Transfer von ex vivo expandierten Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) über die letzten Jahre hinweg reproduzierbar gute klinische Ergebnisse (50 % Ansprechraten) bei Patienten mit therapieresistentem metastasiertem Melanom erzielt hat, wird die adoptive T-Zell-Therapie als vielversprechende zukünftige Therapieoption betrachtet (Rosenberg et al., 2008). Allerdings spricht nicht jeder Patient auf die Therapie an und es kommt häufig nach ersten Erfolgen zu Rezidiven (June, 2007). Es werden verschiedene Gründe diskutiert, welche das meist zeitlich limitierte Ansprechen der Therapie erklären sollen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass T-Zellen den Tumor nicht erreichen, das Überleben der T-Zellen nach Infusion in den Patienten nur kurz ist, keine Entwicklung von antitumoralen Gedächtnis-T-Zellen stattfindet oder aber, dass es in vivo zu einem Funktionsverlust der transferierten T-Zellen kommt (Bathe et al., 2001; Dudley et al., 2001; Mitchell et al., 2002; Fischer et al., 2007; June, 2007; Berger et al., 2008; Ngo et al., 2011). In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass adoptiv transferierte T-Zellen in vivo adoptiv transferierte Zielzellen lysierten, nach Migration ins Tumormilieu allerdings die Fähigkeit Zytokine zu produzieren verloren (Bai et al., 2008). Auch natürliche TIL, welche aus dem Tumorgewebe isoliert wurden, sind in ihrer Zytotoxizität und Zytokinproduktion inhibiert (Finke et al., 1990; Radoja et al., 2001). Wurden die isolierten TIL allerdings für 12 h mit IL-2 kultiviert, so konnte eine gute lytische Aktivität beobachtet werden (Radoja et al., 2001). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass aus Nierenzellkarzinomgewebe isolierte TIL Defizite aufweisen, welche nach Kultur außerhalb des Mediums teils revertiert werden. Lymphozyten, welche aus dem gesunden Teil einer tumortragenden Niere isoliert wurden, zeigen hingegen keine Defizite, was für eine tumorspezifische, nicht eine gewebeinduzierte Inhibition der Lymphozyten spricht (Dissertationsarbeit Prinz, 2010; Prinz et al., 2012). All diese Befunde sprechen für eine Inhibition, die durch das Tumormilieu induziert wird. Gleichzeitig gibt es jedoch auch Berichte, dass TIL keine funktionellen Defizite aufweisen (Willimsky und Blankenstein, 2007). Aufgrund dieser gegensätzlichen Befunde, aber letztendlich weil es von entscheidender klinischer Bedeutung ist, ob und gegebenenfalls wie die T-

Zellen durch das Tumormilieu beeinflusst werden, war es Ziel dieser Doktorarbeit, das Tumormilieu und dessen Einfluss auf die Funktion differenzierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Detail aufzuschlüsseln. In diesem Zusammenhang sollte gezeigt werden, ob die unterschiedlichen Effektorfunktionen gleichermaßen oder unterschiedlich beeinflusst werden.

### **7.1 Dem Tumormilieu ausgesetzte Effektor-T-Zellen weisen funktionelle Defizite auf**

Es wurden verschiedene In-vitro-Modelle eingesetzt, um den Einfluss verschiedener Faktoren des Tumormilieus auf CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen zu untersuchen. Durch Verwendung dieser In-vitro-Tumormodelle wurde gezeigt, dass die beiden Haupteffektorfunktionen der T<sub>EFF</sub>-Zellen - Degranulation und Produktion von Zytokinen - durch das Tumormilieu inhibiert werden. Jedoch wurde die Zytokinproduktion viel stärker inhibiert als die Degranulation und war sowohl durch Zell-Zell-Interaktionen als auch durch zellfreies, von Tumorzellen konditioniertes Milieu supprimiert. Die Degranulation hingegen wurde im Wesentlichen durch Zellinteraktionen und weniger durch das zellfreie Tumormilieu (zTM) gestört. Für die Inhibition beider Effektorfunktionen waren eine hohe Tumorzelldichte sowie ein durch eine hohe Zelldichte generiertes lösliches Milieu nötig. Diese Beobachtung entspricht Ergebnissen aus Mausmodellen, laut denen adoptiv transferierte T-Zellen in der Lage sind, kleine Tumoren abzustoßen, große hingegen nicht (Hanson et al., 2000; Imai et al., 2009). Weiterhin wurde von Imai et al. gezeigt, dass die inhibitorische Kapazität eines soliden Tumors (Sarkom) zunahm, je mehr Zeit dem Tumor gegeben wurde, sich in der Maus zu etablieren.

Es sind einige Rezeptoren beschrieben, welche die Aktivität von T-Zellen mindern. Allerdings sind viele dieser Rezeptoren wie PD1, Tim-3, CTLA4 und Lag3 im Zusammenhang mit T-Zell-Erschöpfung und daraus folgender Nicht-Funktionalität beschrieben und nicht mit einer Inhibition eigentlich funktioneller T<sub>EFF</sub>-Zellen (Wherry, 2011). Da in dem hier verwendeten Testsystem aktive und nicht erschöpfte ZTL eingesetzt wurden, ist es unwahrscheinlich, dass einer dieser Rezeptoren bei den beobachteten Funktionsdefiziten eine Rolle spielt.

Durch Verwendung von durch Tumorzellproliferation-konditionierten Überständen, die frei von Zellbestandteilen waren, wurde gezeigt, dass zellfreie Faktoren die Zytokinproduktion inhibierten, wenn die Milieukonditionierung mit hoher Tumorzelldichte geschah. Die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion wurde in einer schnellen on-off Kinetik reguliert, d.h. sie wurde unmittelbar supprimiert, wenn die ZTL dem Milieu ausgesetzt wurden (keine Vorinkubation nötig), und war schnell wieder hergestellt, wenn die ZTL aus dem Milieu entfernt wurden.

Die Degranulation war unter diesen Bedingungen wenig und die Zytotoxizität nicht inhibiert. Diese Ergebnisse scheinen zunächst nicht mit den in der Literatur beschriebenen Daten sowie Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe im Einklang zu sein, wo gezeigt wurde, dass aus Tumorgewebe isolierte TIL eine reduzierte Zytotoxizität besitzen (Holmes, 1985; Finke et al., 1994; Van den Hove et al., 1997). Die Zytotoxizität ist jedoch nicht nur eine Konsequenz der Degranulation, sondern im Wesentlichen von der Übertragung zytotoxischer Moleküle abhängig. Bedenkt man die zentrale Rolle der Zytotoxine, so klärt sich dieser scheinbare Widerspruch. Bei dem verwendeten System wurden ZTL mit voller Ausstattung an Zytotoxinen dem Tumormilieu nur über die Dauer des 4-stündigen Zytotoxizitätstests ausgesetzt. Die Untersuchung der Zytotoxine in den ZTL zeigte, dass in diesem Zeitraum keine Reduktion des Perforins oder Granzym B auftrat. Wurden die  $T_{\text{EFF}}$ -Zellen im In-vitro-Modell länger mit einer hohen Dichte an Tumorzellen kokultiviert, so kam es zu einem Verlust der Zytotoxine Perforin und Granzym B und auch zu einem Verlust der Zytotoxizität. Zell-Zell-Kontakt zwischen Tumor- und T-Zellen war dabei nicht essentiell, da es auch ohne Kontakt zu einem Verlust der Zytotoxizität kam. In einem Tumormilieu ohne Zellkontakt wurde allerdings nur Perforin herunter reguliert, während Granzym B erhalten blieb. Da ZTL mit Granzym B aber ohne Perforin nicht zytotoxisch waren, lässt sich daraus schließen, dass Granzym B nicht ausreichend und Perforin essentiell für die zytotoxische Funktion der ZTL ist. Es gibt Berichte in der Literatur, die zeigen, dass die Expression von Perforin und Granzym B unterschiedlich reguliert ist (Johnson et al., 2003; Pham et al., 2003).

Es zeigte sich weiterhin, dass nicht nur Überstände, welche von Tumorzellen generiert worden waren, einen inhibitorischen Einfluss auf die  $T_{\text{EFF}}$ -Funktion



hatten, sondern auch solche, welche von „Nicht-Tumorzellen“, so z.B. von Zellen einer gesunden Niere (NN50) oder von mikrovaskulären Endothelzellen des humanen Gehirns (HBMEC: human brain-microvascular endothelial cells), generiert worden waren. Die inhibitorische Kapazität korrelierte mit den in den Überständen gemessenen Laktatkonzentrationen direkt und invers mit dem pH-Wert. Die Laktatproduktion von „Nicht-Tumorzellen“ kann dadurch erklärt werden, dass auch diese stark proliferierten. Um den hohen Energieverbrauch zu decken, wechseln stark proliferierende Zellen von der Atmung zur Glykolyse, was zur Laktatproduktion und Ansäuerung des extrazellulären Milieus führt (Lunt und Van der Heiden, 2011). In Überständen von ruhenden PBL oder ZTL wurden nur geringe Laktatkonzentrationen bei einem neutralen pH-Wert gemessen und die Überstände waren auch nicht inhibitorisch.

Otto Warburg beschrieb 1924 das Phänomen, dass Tumorzellen oft, trotz der Anwesenheit von Sauerstoff, Glykolyse an Stelle der oxidativen Phosphorylierung betreiben (Warburg, 1924). Als Endprodukt der Glykolyse entsteht Pyruvat. Dieses wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zur Milchsäure reduziert, um neues  $\text{NAD}^+$  zu generieren, welches für weitere Runden der Glykolyse benötigt wird. Die Milchsäure wird im wässrigen Milieu unter physiologischem pH deprotoniert, wodurch das Säureanion Laktat und  $\text{H}^+$ -Ionen entstehen (Roth und Brooks, 1990; Lane et al., 2009). Diese werden zusammen über den Monocarboxylattransporter MCT, bei welchem es sich um einen Symporter für Protonen und Monocarboxylate handelt, aus der Zelle abgegeben. Die extrazelluläre Akkumulation von Laktat und Azidifikation des Tumormilieus sind die Folge (Kennedy und Dewhirst, 2010). Die Laktatkonzentrationen in den Überständen waren direkt proportional zum Inhibitionspotential des jeweiligen Überstandes. So lagen die Laktatwerte der stark inhibierenden Überstände bei etwa 20 mM. Walenta et al. beschrieben Laktatwerte von 5 - 15  $\mu\text{M/g}$  Tumorgewebe beim Gebärmutterkarzinom (Walenta et al., 2000). Ein Tumor von 1  $\text{cm}^3$  wiegt etwa 1 g (Carter und Isaacs, 1990; Friberg und Mattson, 1997; Frangioni, 2008). Demnach würde das zTM<sub>10</sub> mit einem Laktatgehalt von 18 - 24 mM einem Tumor von etwa 12 - 16 cm Durchmesser mit einem Gewicht von 1,2 - 1,6 kg entsprechen. zTM<sub>1</sub> mit 12 mM Laktat würde einem Tumor mit 7 - 8 cm Durchmesser entsprechen. Tumoren dieser Größe sind gerade beim Nierenzellkarzinom

nicht selten, so dass die hier verwendeten Testbedingungen durchaus als physiologisch betrachtet werden können (Uchida et al., 1998; Guillaume et al., 2003).

Laktat und saurer pH wurden als Inhibitoren der T<sub>EFF</sub>-Zell-Funktion bestätigt, indem komplettes nicht inhibitorisches Medium mit kommerziell erhältlicher Milchsäure („Milchsäure-Medium“) versetzt wurde, wodurch dieses inhibitorisch wurde. Die Milchsäure dissoziiert im verwendeten Medium fast vollständig zu Laktat und Protonen. Das Inhibitionspotential von „Milchsäure-Medium“ war etwas größer als das von Zellüberständen, welche vergleichbare Konzentrationen an Laktat aufwiesen. Die mitverwendeten „Milchsäure-Medien“ waren um einen pH-Wert von ca. 0,4 azider als Zellüberstände mit ähnlichen Laktatkonzentrationen. Es ist bekannt, dass Laktat zusammen mit Protonen transportiert wird. Deshalb war auch der inhibitorische Effekt des Laktats abhängig vom pH-Wert, und ZTL wurden in Natriumlaktat-supplementiertem Medium („Natriumlaktat-Medium“) mit neutralem pH auch nicht inhibiert. Entsprechend konnte der negative Effekt des sauren „Milchsäure-Mediums“ durch die Neutralisierung der inhibitorischen Milieus deutlich abgeschwächt werden. Saures Medium ohne Laktat war nicht inhibitorisch. Während die Neutralisation des sauren „Milchsäure-Mediums“ die IFN<sub>γ</sub>-Produktion verbesserte und die Degranulation wieder vollständig herstellte, führte die Neutralisation des inhibitorischen Tumorüberstands bei beiden Effektorfunktionen nur zu einer teilweisen Verbesserung. Diese Beobachtung könnte auf die Anwesenheit weiterer inhibitorischer Faktoren im Tumorzellüberstand zurückzuführen sein. Es werden verschiedene weitere Faktoren beschrieben, die im Tumormilieu akkumulieren und zur Inhibition der im Milieu befindlichen T-Zellen führen können (Hoskin et al., 1994; Blay et al., 1997; Walenta et al., 2000; Taylor und Gercel-Taylor, 2005; Gajewski et al., 2006; Riesenberber et al., 2007). Galektin-3 ist beispielsweise ein Protein, welches von vielen Tumoren exprimiert wird. Es kann ein Netzwerk aus Glykoproteinen auf der Zelloberfläche bilden, welches die TZR umlagert und zu einer Dissoziation des TZR vom Korezeptor CD8 bzw. CD4 führt. Die Folge ist eine gestörte Signalinduktion am TZR mit reduzierter IFN<sub>γ</sub>-Produktion. Das Netzwerk aus Galektin-3 kann laut Literatur durch Zugabe eines Galektin-Liganden gelöst werden, weshalb sich die inhibitorische Wirkung vom Galektin-3 durch

einfaches Waschen der Zellen nicht revertieren lässt (Demotte et al., 2010). Daher scheint Galektin-3 als inhibitorischer Faktor in dem hier untersuchten Modell unwahrscheinlich, da die ZTL-Funktion nach Wegwaschen des zellfreien Tumormilieus sofort wiederhergestellt war.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ , welche von Tumorzellen produziert werden, negativ auf die Proliferation und die Zytokinproduktion von T-Zellen wirken können (Vieira et al., 1991; Taga et al., 1994; Zou, 2005). Aktives TGF- $\beta$  wurde in den inhibitorischen zTM in nur sehr geringen Konzentrationen (3,5 pg/ml), welche am Rande der Nachweisgrenze lagen, gemessen. Dr. Skrablin zeigte im Rahmen ihrer Doktorarbeit bei uns in der Arbeitsgruppe, dass TGF- $\beta$  erst ab viel höheren Konzentrationen ( $> 10$  ng/ml) die IFN $\gamma$ -Produktion von ZTL negativ beeinflusste (Dissertationsarbeit Skrablin, 2007). Deshalb wird vermutet, dass TGF- $\beta$  in diesem System keine Rolle spielt. IL-10 wird klassischerweise als immuninhibitorisches Zytokin beschrieben, welches die Proliferation und die IFN $\gamma$ -Produktion von T-Zellen inhibieren kann (Vieira et al., 1991; Taga et al., 1994). Gleichzeitig gibt es auch Berichte über die immunstimulierende Wirkung von IL-10 (Mocellin et al., 2005). Hier wurde gezeigt, dass IL-10 die IFN $\gamma$ -Produktion von ZTL nicht inhibiert und dass IL-10 die Abstoßung von Melanoma und Brusttumoren vermittelt. IL-10 wurde in den inhibitorischen Überständen nachgewiesen. Dessen Rolle bei der Inhibition der T<sub>EFF</sub>-Zellen bleibt allerdings noch zu klären. Dies wäre beispielsweise durch die Verwendung eines blockierenden IL-10-Antikörpers möglich.

Von Tumorzellen produzierte Exosomen wurden ebenfalls als inhibitorische Faktoren beschrieben (Taylor und Gercel-Taylor, 2005; Huber et al., 2008; Clayton et al., 2011). Sie können den Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen und so bei Bindung an den Fas-Rezeptor der T-Zellen Apoptose induzieren. Auch die Funktion von NK-Zellen und T-Zellen kann durch Exosomen eingeschränkt werden (Taylor und Gercel-Taylor, 2005; Liu et al., 2006). Mechanistisch scheinen Signalkaskaden über CD3 $\zeta$  und Jak durch Exosomen inhibiert zu werden (Taylor und Gercel-Taylor, 2005). In den hier untersuchten inhibitorischen Milieus können Exosomen allerdings als inhibitorische Komponente ausgeschlossen werden, weil die T<sub>EFF</sub>-Funktion in

ultrazentrifugiertem konditioniertem Medium immer noch reduziert war und die vesikelhaltige Fraktion nicht inhibierend war.

Die Ecto-Nukleotidasen CD39 und CD73 katalysieren den Abbau von ATP zu Adenosin. Durch deren Expression auf Tumorzellen kommt es im Tumormilieu zu einer Akkumulation von Adenosin, welches 10- bis 20-fach erhöhte Konzentrationen im Vergleich zum Normalgewebe erreichen kann (Kolon-, Lungenkarzinom und Fibrosarkom) (Blay et al., 1997; Zhang, 2012). Es ist beschrieben, dass Adenosin die Zytotoxizität und die Zytokinproduktion von T<sub>EFF</sub>-Zellen inhibieren kann (Huang et al., 1997; Raskovalova et al., 2007; Hoskin et al., 2008). Adenosin war in den hier verwendeten inhibitorischen Überständen jedoch nicht vorhanden und ist somit in dem von mir verwendeten System an der Inhibition nicht beteiligt. Allerdings wurden in den inhibitorischen Überständen hohe Konzentrationen an Inosin gefunden, welches ein Abbauprodukt des Adenosins ist. Auch in den Überständen der „Nicht-Tumorzelle“ HBMEC wurde Inosin in hohen Konzentrationen gefunden, nicht aber in den Überständen der PBMZ, d.h. auch von „Nicht-Tumorzellen“ wurde Adenosin gebildet. Es wurde nicht untersucht, ob diese Zellen CD39 und CD73 exprimieren. Dies ist aber anzunehmen, da die Expression dieser Ecto-Nukleotidasen für viele Gewebe beschrieben ist (Zimmermann, 2000). Da kein Adenosin in den inhibitorischen Überständen gefunden wurde, ist anzunehmen, dass die inhibitorische Wirkung nicht von Adenosin vermittelt wird. Es ist allerdings vorstellbar, dass das Abbauprodukt Inosin zur Inhibition der ZTL beiträgt, denn in Mausmodellen wurde beschrieben, dass Inosin die IFN $\gamma$ -Produktion von CD3-stimulierten T-Zellen inhibiert (Hasko et al., 2000). Auch ist gezeigt, dass Inosin vor Diabetes Typ1, Colitis und Entzündungen beim akuten Atemnotsyndrom schützt (Mabley et al., 2003; Mabley et al., 2003; Mabley et al., 2008; Mabley et al., 2009). Inosin bindet, wie Adenosin, an die G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren (Hasko et al., 2004). Aufgrund der Anwesenheit des Laktats im sauren pH war es nicht möglich, in dem hier verwendeten System eine mögliche Inhibition durch Inosin wahrzunehmen. Es wäre zukünftig interessant zu testen, ob die T<sub>EFF</sub>-Funktion durch Zugabe von Adenosin-Rezeptor-Antagonisten (Koffein; ZM241,385) in neutralisierten Tumorüberstand, in welchem die Laktatinhibition verhindert, aber die

Funktion nicht vollständig wiederhergestellt war, weiter verbessert werden kann.

In soliden Tumoren wird häufig die Überexpression der Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) beschrieben (Gajewski et al., 2006; Riesenberg et al., 2007). IDO katalysiert den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu L-Kynurenin. Nicht nur der Tryptophanmangel ist für die T-Zellen schädlich, indem es die Proliferation hemmt, sondern auch die Akkumulation von L-Kynurenin induziert Apoptose in T-Zellen (Fallarino et al., 2002). Nachdem weder L-Kynurenin in den Tumorüberständen enthalten war, noch dessen Zugabe zum nicht-inhibierenden Medium einen Einfluss auf die T-Zell-Funktion hatte, kann L-Kynurenin als inhibitorischer Faktor in dem hier verwendeten System ausgeschlossen werden.

Im verwendeten zTM kann es nicht nur zur Anhäufung von potenziell inhibitorischen Faktoren kommen, sondern im Zuge des Tumormetabolismus werden auch Stoffe wie Glukose und Aminosäuren entfernt, die möglicherweise von ZTL benötigt werden, wenn sie zur Funktionsausübung stimuliert werden. Glukose war im Tumorüberstand mit  $< 0,1$  mg/ml im Vergleich zu  $1,8$  mg/ml im unkonditionierten Medium stark reduziert. Glukosemangel kann die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in T-Zellen beeinträchtigen. Allerdings wurde von Cham et al. gezeigt, dass die IL-2-Produktion nicht durch Glukosemangel beeinflusst wurde, was in dem hier verwendeten Modell im Tumorüberstand schon der Fall war (Cham und Gajewski, 2005; 2008). Um die Rolle des Glukosemangels in der Inhibition der  $T_{\text{EFF}}$ -Zellen im Tumormilieu eindeutig klären zu können, wäre es nötig, Glukose zum inhibitorischen Milieu zu supplementieren. Dazu wäre es allerdings nötig, wie für Inosin bereits beschrieben, die inhibitorische Kapazität des Laktats durch Neutralisation des Milieus auszukoppeln, um eine mögliche Funktionsverbesserung der T-Zellen durch Zusatz von Glukose sichtbar zu machen. Weiterhin wäre es interessant, die T-Zellen in glukosefreiem Medium zu stimulieren, um so den Einfluss des Glukosemangels alleine - ohne die Anwesenheit eventueller zusätzlicher inhibitorischer Faktoren - zu erkennen. Neben einer Inhibition der Zytokinproduktion wurde auch gezeigt, dass Glukosemangel zum Zellzyklusarrest und zur Inhibition der Perforinexpression führt (Cham et al., 2008). Ob der durch die Kultur in

zTM<sub>10</sub> induzierte Perforinverlust auf Glukosemangel zurückzuführen ist, wird in zukünftigen Experimenten untersucht.

## **7.2 Laktat inhibiert die Phosphorylierung von Signalproteinen in T<sub>EFF</sub>-Zellen**

Die beiden Haupteffektorfunktionen von T-Zellen, die Zytokinproduktion und die Degranulation, waren bei TZR-Stimulation durch Zielzellen, durch die Anwesenheit von Laktat in saurem Milieu eingeschränkt. Daher lag es nahe, dass Signalkaskaden, welche vom TZR aus diese Funktionen induzieren, ebenfalls durch „Milchsäure-Medium“ beeinflusst werden. Die Inhibition der T<sub>EFF</sub>-Funktion in saurem laktathaltigem Medium konnte auch durch Stimulation mit PMA und Ionomycin nicht überwunden werden. PMA ist ein DAG-Homolog und Ionomycin induziert den Kalziumeinstrom in die Zelle. Das bedeutet, dass Laktat distal zu DAG und Kalzium in die Signalkaskade eingreift. Es können jedoch zusätzlich proximale Signalproteine inhibiert werden. Untersuchungen von Dr. Hu in der Arbeitsgruppe zeigten allerdings, dass die Phosphorylierung von ZAP70 und LAT bei Stimulation in „Milchsäure-Medium“ bzw. in zTM der im Medium entsprach.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mit Hilfe des Phosphoprotein-Multiplexes TZR-distale Signalproteine untersucht und festgestellt, dass die Phosphorylierung der MAPK p38 und JNK sowie des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors c-Jun deutlich reduziert waren. C-Jun bildet unter anderem zusammen mit c-Fos den Transkriptionsfaktor AP-1, der für die Transkription verschiedener Zytokine verantwortlich ist. Somit könnte über eine reduzierte AP-1-Aktivität die verminderte IFN<sub>γ</sub>-Produktion im „Milchsäure-Medium“ erklärt werden.

Die Phosphorylierung der MAPK ERK, welche mit der Degranulation assoziiert wird, sowie die ihr vorgeschaltete Kinase MEK1 waren nicht beeinflusst (Berg et al., 1998). Adachi et al. zeigten, dass die p38-Aktivierung, nicht aber die ERK-Aktivierung für die IFN<sub>γ</sub>-Produktion in ZTL von entscheidender Bedeutung ist (Adachi und Davis, 2011). Neben p38 sind JNK und c-Jun mit der Zytokinproduktion assoziiert. Diese Proteine wurden durch „Milchsäure-Medium“ negativ beeinflusst, während der ERK- und der GSK3-Signalweg, welche mit der Degranulation assoziiert werden, nicht bzw.

kaum beeinflusst wurden (Berg et al., 1998). Dies könnte erklären, warum die Zytokinproduktion von T<sub>EFF</sub>-Zellen durch „Milchsäure-Medium“ vollständig inhibiert wurde, wohingegen die Degranulation nur partiell gestört war. Der Mechanismus, welchem die partielle Inhibition der Degranulation im „Milchsäure-Medium“ und im zTM zugrunde liegt, ist derzeit noch ungeklärt. Das Signalmolekül Vav könnte von Bedeutung sein, weil es als GEF (eng. Guanin exchange factor) der Rho-Familien-Proteine Cdc42 und Rac1 eine wichtige Rolle bei der MTOC (engl. microtubule organizing center) Polarisation und der resultierenden Exozytose spielt (Billadeau et al., 1998; Abe et al., 2000; de Saint Basile et al., 2010). Vav ist auch für die Aktivierung von p38 und JNK wichtig (Hegner et al., 2000). Somit könnte die reduzierte Degranulation und die geringere Phosphorylierung von p38 und JNK im „Milchsäure-Medium“ oder zTM durch inaktives Vav erklärt werden.

Die Phosphorylierung von GSK3 war nur im „Milchsäure-Medium“, aber nicht im zTM inhibiert. Es handelt sich bei GSK3 um eine Kinase, welche den Transkriptionsfaktor NFAT durch Phosphorylierung inhibiert. Bei einem aktivierenden Stimulus wird GSK3 phosphoryliert und somit inaktiviert, wodurch NFAT als Transkriptionsfaktor aktiv wird. Es gibt Berichte, dass NFAT neben der IL-2 Expression, auch die IFN $\gamma$ -Produktion reguliert (Sica et al., 1997; Chow et al., 1999; Teixeira et al., 2005). GSK3 wird auch als Inhibitor der Mikrotubulistabilität beschrieben (Cunningham et al., 2011). Wenn im „Milchsäure-Medium“ GSK3 inhibiert ist, im zTM jedoch nicht, könnte dies eine Erklärung dafür sein, weshalb die funktionelle Inhibition der T<sub>EFF</sub>-Zellen im „Milchsäure-Medium“ stärker war als im zTM mit vergleichbaren Laktatkonzentrationen. Ein Unterschied zwischen den beiden Medien ist, dass „Milchsäure-Medium“ mit einem pH-Wert von 6,1 etwas azider war als vergleichbare Tumorzellüberstände (pH 6,5). Laktat wird entlang eines Protonengradienten in die Zelle transportiert (Garcia et al., 1994; Juel, 1996; Fischer et al., 2007). Daher könnte der azidere pH-Wert im „Milchsäure-Medium“ für einen größeren Laktateinstrom in die Zelle ursächlich sein. Eventuell wird die GSK3-Phosphorylierung erst ab einer gewissen intrazellulären Laktatkonzentration inhibiert. Dies könnte getestet werden, indem die GSK3-Phosphorylierung in verschiedenen „Milchsäure-Medien“, bei denen der pH-Wert graduell neutralisiert wird, untersucht wird. Der Mechanismus, der für das Ausbleiben der GSK3-Phosphorylierung

verantwortlich ist, ist bisher nicht geklärt, da die für die Phosphorylierung von GSK3 klassischerweise verantwortliche Kinase AKT in „Milchsäure-Medium“ phosphoryliert wurde. Eventuell werden die Phosphatasen PP1 und PP2A, welche GSK3 dephosphorylieren, durch Laktat beeinflusst.

Defekte in der Zytokinproduktion und Zytotoxizität sind auch für aus Tumoren isolierte TIL beschrieben (Bai et al., 2008; Imai et al., 2009; Ngo et al., 2011). Abhängig vom untersuchten Tumortyp wurden Defizite in der Aktivierung verschiedener Signalmoleküle beschrieben. Mausmodelle zeigten, dass aus Adenokarzinom isolierte nicht-lytische TIL in der Phosphorylierung von ZAP70 und LAT inhibiert waren (Koneru et al., 2005; Monu und Frey, 2007). In unserer Arbeitsgruppe wurde von Dr. Prinz gezeigt, dass TIL aus Nierenzellkarzinomen in der Phosphorylierung von AKT und ERK inhibiert waren (Dissertationsarbeit Prinz, 2010; Prinz et al., 2012). TIL aus Melanom wiesen eine reduzierte Phosphorylierung der STATs (engl. signal transducer and activator of transcription) auf und der Notch-Signalweg ist in vielen Tumoren verändert (Mortarini et al., 2009). Aus Tumorgewebe isolierte TIL waren jedoch über einen längeren Zeitraum sowohl zellulären als auch löslichen Faktoren des Tumormilieus ausgesetzt. Hingegen wurden die T<sub>EFF</sub>-Zellen im Rahmen dieser Doktorarbeit für die Untersuchung der Signalproteine nur für 4,5 Stunden dem zTM ausgesetzt, was die Unterschiede in den Inhibitionen der verschiedenen Signalmoleküle erklären könnte.

T<sub>EFF</sub>-Zellen werden aber im Tumormilieu nicht nur durch verschiedene Faktoren aktiv inhibiert, sondern es kann auch durch die Tumorzellerkennung zur Erschöpfung kommen. T-Zellerschöpfung wird klassischerweise in chronisch viralen Situationen beschrieben und zeichnete sich durch den Verlust der Zytokinproduktion, der Zytotoxizität und der Proliferationsfähigkeit aus (Zajac et al., 1998). Auch der Tumor wird als chronische Erkrankung betrachtet und TIL exprimieren häufig mit T-Zell-Erschöpfung in Zusammenhang gebrachten Rezeptoren (PD1, Tim-3, CTLA-4, Lag3) (Beyer, 1995; Thompson et al., 2004; Ahmadzadeh et al., 2009; Crawford und Wherry, 2009; Sakuishi et al., 2010; Wherry, 2011). Einige dieser Rezeptoren haben intrazelluläre ITIMs (engl. immunotyrosine inhibitory motifs), ITSMs (engl. immunotyrosinase switch motifs) oder beide, welche negative Signale vermitteln können. Auch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NFAT, c-



Jun und c-Fos werden in erschöpften T-Zellen unterschiedlich zu T<sub>EFF</sub>-Zellen oder Gedächtnis T-Zellen reguliert. Die Signalkaskaden, die an die inhibitorischen Rezeptoren gekoppelt sind, sind noch nicht genau bekannt (Wherry et al., 2007; Wherry, 2011). Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass die im Rahmen dieser Doktorarbeit beobachteten funktionellen Inhibitionen die Folge eines Erschöpfungszustandes sind. Zum einen wurden aktive ZTL verwendet, die entweder nur über einen kurzen Zeitraum von 5 Stunden im Tumormilieu stimuliert wurden, oder aber über einen längeren Zeitraum dem Milieu ohne Stimulus ausgesetzt wurden. Zum anderen unterscheidet sich die Art des induzierten Funktionsdefekts im In-vitro-Modell von erschöpften T-Zellen: Die erschöpften T-Zellen waren auch ex vivo funktionell gestört (Wherry, 2011). Im In-vitro-Modell waren die funktionellen Defizite hingegen durch Entfernen des inhibitorischen Milieus revertierbar.

### **7.3 Reversibilität der beobachteten Defizienzen**

In den in dieser Doktorarbeit aufgeführten In-vitro-Modellen zeigte sich, dass die Inhibition der IFN<sub>γ</sub>-Produktion und die Reduktion der Degranulation nach Entfernung des inhibitorischen Milieus aufgehoben war. Diese Funktionswiederherstellung ging mit einer verbesserten Phosphorylierung der Signalproteine p38, JNK, c-Jun und GSK3 einher.

Die Wiederherstellung der IFN<sub>γ</sub>-Produktion und Degranulation in laktatenthaltendem Medium war auch möglich, indem der saure pH-Wert neutralisiert wurde trotz kontinuierlicher Anwesenheit des Laktats. Dies lässt sich durch den Kotransport von Laktat entlang eines Protonengradienten über den MCT-Transporter erklären (Garcia et al., 1994; Juel, 1996; Fischer et al., 2007). Ist dieser Gradient nicht vorhanden, wie bei einem neutralen pH-Wert, so kann Laktat auch nicht in die Zelle transportiert werden.

Der Verlust der lytischen Aktivität trat nur dann auf, wenn die T<sub>EFF</sub>-Zellen kein Perforin aufwiesen. Die Expression des Perforins und die Zytotoxizität konnten nicht durch bloßes Entfernen der T-Zellen aus dem inhibitorischen Milieu wiederhergestellt werden. Unsere Arbeitsgruppe sowie andere Publikationen zeigten, dass die Kultur außerhalb des Tumormilieus nötig war, um die Zytotoxizität von TIL wiederherzustellen (Itoh et al., 1986; Monu und Frey, 2007; Dissertationsarbeit Prinz, 2010; Prinz et al., 2012).

#### 7.4 Relevanz der erzielten Ergebnisse

Die Beobachtung, dass ZTL, wenn sie das Tumormilieu erreichen, in ihrer Funktion inhibiert werden, ist für die adoptive T-Zell-Therapie von essentieller Bedeutung. Denn selbst wenn ZTL wie bei der adoptiven T-Zell-Therapie ex vivo hinsichtlich guter Funktion und Tumorspezifität ausgewählt werden, so wird deren Effektivität bei Eintritt in den Tumor durch das Tumormilieu limitiert. Tatsächlich bleibt der klinische Erfolg des adoptiven T-Zell-Transfers trotz des Einsatzes von T-Zellen mit hoher Avidität und guter funktioneller Kapazität oftmals aus (June, 2007; Ngo et al., 2011).

Um die Effektivität der ZTL und den Erfolg der Therapie zu verbessern, muss das Tumormilieu berücksichtigt werden und es müssen Maßnahmen gefunden werden, um das Tumormilieu zu modulieren bzw. T<sub>EFF</sub>-Zellen so auszustatten, dass sie dem inhibitorischen Tumormilieu besser widerstehen können. Es wird oftmals beschrieben, dass T-Zellen mit einer hohen Avidität für ein tumorspezifisches Antigen Tumoren besser abstoßen als T-Zellen mit niedriger Avidität (Zeh et al., 1999). Gleichzeitig wurde aber auch gezeigt, dass hoch-avide adoptiv transferierte T-Zellen im Tumormilieu ihre Funktion verloren oder es durch Apoptose zum Verlust der hoch-aviden T-Zellen kam (Molldrem et al., 2003; Jarnicki et al., 2006). Somit ist die Diskussion, ob die Verwendung hoch-avider TZR die Effektivität der adoptiven T-Zell-Therapie tatsächlich verbessern wird, nicht abschließend geklärt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit gab es erste Hinweise, dass hoch-avide T-Zellen der Inhibition des Tumormilieus möglicherweise etwas besser widerstehen können als niedrig-avide T-Zellen. Allerdings war dies auch nur dann der Fall, wenn die Inhibition durch das Milieu nicht zu stark war und die Stimulation durch eine hohe Antigendichte auf den Zielzellen stark war. Um eine eindeutige Aussage über die Rolle der T-Zell-Avidität bei der Tumorabwehr treffen zu können, wird es zukünftig nötig sein, weitere T-Zellen zu untersuchen, die mit TZR unterschiedlicher Affinität ausgestattet sind.

Der Befund, dass Laktat die Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion durch T<sub>EFF</sub>-Zellen ohne Vorinkubation im sauren Milieu sofort erheblich reduzierte, ist von essentieller Bedeutung für alle Therapieansätze, die darauf abzielen, Tumorkontrolle über T-Zell-vermittelte Immunität zu erreichen. IFN $\gamma$  ist ein wichtiger Faktor der Tumorabstoßung und Laktat ein zwingendes Beiprodukt

des Tumormetabolismus, welches in den meisten, wenn auch nicht in allen, soliden Tumoren zu inhibitorischen Konzentrationen akkumuliert (Fisher et al., 1989; Walenta et al., 2000; Brizel et al., 2001; Meunier et al., 2005; Wang et al., 2008).

Die Ansäuerung des Tumormilieus ist ebenfalls ein Resultat aus dem Tumormetabolismus und es gibt Korrelationen zur Tumoraggressivität (McCarty und Whitaker, 2010). In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die Metastasierung und der Lymphknotenbefall in Brust- und Prostatakrebs reduziert wurde, wenn den Mäusen Bikarbonat über das Trinkwasser gegeben wurde, was den pH-Wert im Tumor von 7,0 auf 7,4 erhöhte (Robey et al., 2009). Auch in der Klinik gibt es Berichte, dass Bikarbonat („Backpulver“) die Tumorkontrolle verbesserte. So wird von einem Patienten mit Nierenzellkarzinom berichtet, welcher in einer Selbsttherapie täglich Bikarbonat zu sich nahm, nachdem er konventionelle Therapien ablehnte (Silva et al., 2009). Zum Zeitpunkt der Publikation ging es dem Patienten, dessen Tumor vor der Bikarbonatbehandlung progressiv gewachsen war, mit einem seit 10 Monaten stabilen Tumor gut (Silva et al., 2009). Obwohl es sich hierbei um Einzelfälle handelt, kann man daraus doch auf eine Bedeutung der pH-Regulation bei der Tumorkontrolle schließen. Weder im klinischen Beispiel noch im Mausmodell wurde nachgeprüft, ob eine Wirkung auf das Immunsystem eintrat. Aufgrund der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten wäre eine intratumorale Aktivierung von infiltrierenden T-Zellen durchaus denkbar. Denn die erhobenen Daten zeigten, dass die Neutralisierung des pH-Werts des *in vitro* generierten Tumormilieus zu einer Verbesserung der funktionellen Kapazität der T-Zellen führt trotz des weiterhin anwesenden Laktats. Gerade für die adoptive T-Zell-Therapie ist diese Erkenntnis von Bedeutung. Denn man kann daraus schließen, dass die Effektivität adoptiv transferierter T-Zellen in Kombination mit adjuvanten Therapien zur Pufferung des Milieus erhöht werden könnte. Protonen-Pumpen-Inhibitoren (PPI) werden bereits seit längerem klinisch eingesetzt, um säurebedingte Krankheiten, wie Magen- und Zwölffingerdarm-Geschwüre oder gastroösophagealen Reflux zu behandeln (Horn, 2000). Auch in Mausmodellen wurde gezeigt, dass sich bei Behandlung mit PPI der intratumorale pH-Wert von Melanomtumoren erhöhte und sich das Wachstum des Tumors verlangsamte, was mit einem verbesserten

Überleben einherging (De Milito et al., 2010). Dabei wurde gezeigt, dass der Tumor nekrotische Bereiche aufwies und schwächer proliferierte, allerdings wurde nicht auf die Rolle des Immunsystems eingegangen. In Italien gibt es erste klinische Studien zur Behandlung von metastasiertem Melanom mit dem PPI Esomeprazol als Einzelmedikament. All diese Daten sprechen dafür, dass die Rolle des pH-Werts bei der Tumorbekämpfung immer größere Bedeutung findet und birgt die Hoffnung, dass der Einfluss des Immunsystems, welcher im Moment noch unterbewertet wird, in Zukunft stärker berücksichtigt wird.

## 8 Literaturverzeichnis

Abe K, Rossman KL, Liu B et al. Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem.* 2000;275:10141-9.

Adachi K, Davis MM. T-cell receptor ligation induces distinct signaling pathways in naive vs. antigen-experienced T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:1549-54.

Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009;114:1537-44.

Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Sarin A, Berzofsky JA. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med.* 1996;184:485-92.

Anderson MJ, Shafer-Weaver K, Greenberg NM, Hurwitz AA. Tolerization of tumor-specific T cells despite efficient initial priming in a primary murine model of prostate cancer. *J Immunol.* 2007;178:1268-76.

Bai A, Higham E, Eisen HN et al. Rapid tolerization of virus-activated tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in prostate tumors of TRAMP mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:13003-8.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357:539-45.

Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. The role of galectins in colorectal cancer progression. *Int J Cancer.* 2011;129:1-8.

Bathe OF, Dalyot-Herman N, Malek TR. IL-2 during in vitro priming promotes subsequent engraftment and successful adoptive tumor immunotherapy by persistent memory phenotypic CD8(+) T cells. *J Immunol.* 2001;167:4511-7.

Benlalam H, Labarriere N, Linard B et al. Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2001;31:2007-15.

Berg NN, Puente LG, Dawicki W, Ostergaard HL. Sustained TCR signaling is required for mitogen-activated protein kinase activation and degranulation by cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1998;161:2919-24.

Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM et al. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest.* 2008;118:294-305.

Betts MR, Koup RA. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol.* 2004;75:497-512.

Beyer DA. Cancer is a chronic disease. *Nurse Pract Forum.* 1995;6:201-6.

Billadeau DD, Brumbaugh KM, Dick CJ et al. The Vav-Rac1 pathway in cytotoxic lymphocytes regulates the generation of cell-mediated killing. *J Exp Med.* 1998;188:549-59.

Blay J, White TD, Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res.* 1997;57:2602-5.

Blohm U, Roth E, Brommer K et al. Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.* 2002;169:5522-30.

Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B et al. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:337-65.

Brizel DM, Schroeder T, Scher RL et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:349-53.

Carter H, Isaacs J. Why do cells metastasize? *World J Urol.* 1990;8:2-5.

Cham CM, Gajewski TF. Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8+ effector T cells. *J Immunol.* 2005;174:4670-7.

Cham CM, Driessens G, O'Keefe JP, Gajewski TF. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:2438-50.

Chow CW, Rincon M, Davis RJ. Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2300-7.

Chuang MJ, Sun KH, Tang SJ et al. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2008;99:905-13.

Clayton A, Al-Taei S, Webber J et al. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol.* 2011;187:676-83.

Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:179-86.

Cunningham NR, Hinchcliff EM, Kutys VI et al. GSK3-mediated instability of tubulin polymers is responsible for the failure of immature CD4+CD8+ thymocytes to polarize their MTOC in response to TCR stimulation. *Int Immunol.* 2011;23:693-700.

Daubener W, Wanagat N, Pilz K et al. A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *J Immunol Methods.* 1994;168:39-47.

de Jong RA, Nijman HW, Boezen HM et al. Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21:1320-7.

De Milito A, Canese R, Marino ML et al. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer.* 2010;127:207-19.

de Saint Basile G, Menasche G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:568-79.

Demotte N, Wieers G, Van Der Smissen P et al. A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Res.* 2010;70:7476-88.

Dietl K, Renner K, Dettmer K et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol.* 2010;184:1200-9.

Djafarzadeh R, Noessner E, Engelmann H et al. GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing. *Oncogene.* 2006;25:1496-508.



Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI et al. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother*. 2001;24:363-73.

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;298:850-4.

Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1909;5:273-90.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*. 2002;9:1069-77.

Fan Z, Zhang Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol*. 2005;2:259-64.

Finke JH, Rayman P, Alexander J et al. Characterization of the cytolytic activity of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1990;50:2363-70.

Finke JH, Rayman P, Hart L et al. Characterization of tumor-infiltrating lymphocyte subsets from human renal cell carcinoma: specific reactivity defined by cytotoxicity, interferon-gamma secretion, and proliferation. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1994;15:91-104.

Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109:3812-9.

Fisher B, Packard BS, Read EJ et al. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1989;7:250-61.

Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:844-52.

Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol.* 2008;26:4012-21.

Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol.* 2004;172:4661-5.

Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost.* 2003;1:1655-62.

Friberg S, Mattson S. On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. *J Surg Oncol.* 1997;65:284-97.

Gajewski TF, Meng Y, Blank C et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev.* 2006;213:131-45.

Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK et al. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell.* 1994;76:865-73.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4:891-9.

Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF et al. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res.* 2006;66:5216-23.

Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 2004;18:2183-94.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51:1417-23.

Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006;107:2013-21.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36:59-74.

Guillaume MP, Baldassarre S, Takeh H, da Costa PM. Localized renal cell carcinoma of an unusually large size: case report. *Acta Chir Belg.* 2003;103:321-3.

Hahn BH, Singh RP, La Cava A, Ebling FM. Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFbeta-secreting CD8+ T cell suppressors. *J Immunol.* 2005;175:7728-37.

Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* 1999;343 Pt 2:281-99.

Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H et al. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity.* 2000;13:265-76.

Hasko G, Kuhel DG, Nemeth ZH et al. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol.* 2000;164:1013-9.

Hasko G, Sitkovsky MV, Szabo C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:152-7.

Hehner SP, Hofmann TG, Dienz O et al. Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell receptor- and CD28-mediated activation of JNK, p38, and interleukin-2 transcription. *J Biol Chem.* 2000;275:18160-71.

Holmes EC. Immunology of tumor infiltrating lymphocytes. *Ann Surg.* 1985;201:158-63.

Horn J. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin Ther.* 2000;22:266-80; discussion 5.

Hoskin DW, Reynolds T, Blay J. Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumours. *Int J Cancer.* 1994;59:854-5.

Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ et al. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *Int J Oncol.* 2008;32:527-35.

Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood.* 1997;90:1600-10.

Huber V, Filipazzi P, Iero M et al. More insights into the immunosuppressive potential of tumor exosomes. *J Transl Med.* 2008;6:63.

Imai N, Ikeda H, Tawara I, Shiku H. Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2009;39:241-53.

Itoh K, Tilden AB, Balch CM. Interleukin 2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into human metastatic melanomas. *Cancer Res.* 1986;46:3011-7.

Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;177:896-904.

Johnson BJ, Costelloe EO, Fitzpatrick DR et al. Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8+ T cells in influenza virus-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2657-62.

Juel C. Lactate/proton co-transport in skeletal muscle: regulation and importance for pH homeostasis. *Acta Physiol Scand.* 1996;156:369-74.

June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest.* 2007;117:1466-76.

Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol.* 2010;6:127-48.

Klebanoff CA, Finkelstein SE, Surman DR et al. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:1969-74.

Koneru M, Schaer D, Monu N et al. Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J Immunol.* 2005;174:1830-40.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008;13:472-82.

Lane AN, Fan TWM, Higashi RM. Metabolic acidosis and the importance of balanced equations. *Metabolomics.* 2009;5:163-5.

Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*. 2010;468:447-51.

Leisegang M, Turqueti-Neves A, Engels B et al. T-cell receptor gene-modified T cells with shared renal cell carcinoma specificity for adoptive T-cell therapy. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2333-43.

Linden J. Adenosine metabolism and cancer. Focus on "Adenosine downregulates DPPIV on HT-29 colon cancer cells by stimulating protein tyrosine phosphatases and reducing ERK1/2 activity via a novel pathway". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:C405-6.

Liu C, Yu S, Zinn K et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol*. 2006;176:1375-85.

Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*. 1997;233:423-9.

Lunt SY, Van der Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:441-64.

Mabley JG, Pacher P, Liaudet L et al. Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:G138-44.

Mabley JG, Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W et al. Inosine protects against the development of diabetes in multiple-low-dose streptozotocin and nonobese diabetic mouse models of type 1 diabetes. *Mol Med*. 2003;9:96-104.

Mabley JG, Pacher P, Murthy KG et al. The novel inosine analogue, INO-2002, protects against diabetes development in multiple low-dose streptozotocin and non-obese diabetic mouse models of type I diabetes. *J Endocrinol.* 2008;198:581-9.

Mabley JG, Pacher P, Murthy KG et al. The novel inosine analogue INO-2002 exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury. *Shock.* 2009;32:258-62.

Macintyre AN, Finlay D, Preston G et al. Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity.* 2011;34:224-36.

Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet.* 2008;371:771-83.

Martini M, Testi MG, Pasetto M et al. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine.* 2010;28:3548-57.

Matsumoto S, Yasui H, Mitchell JB, Krishna MC. Imaging cycling tumor hypoxia. *Cancer Res.* 2010;70:10019-23.

McCarty MF, Whitaker J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. *Altern Med Rev.* 2010;15:264-72.

Meidenbauer N, Zippelius A, Pittet MJ et al. High frequency of functionally active Melan-a-specific T cells in a patient with progressive immunoproteasome-deficient melanoma. *Cancer Res.* 2004;64:6319-26.

Mendler AN, Hu B, Prinz PU et al. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int J Cancer*. 2011;10.1002/ijc.26410.

Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J et al. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med*. 2005;11:1222-9.

Mitchell MS, Darrah D, Yeung D et al. Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope. *J Clin Oncol*. 2002;20:1075-86.

Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol*. 2005;78:1043-51.

Moldrem JJ, Lee PP, Kant S et al. Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J Clin Invest*. 2003;111:639-47.

Monu N, Frey AB. Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating T cells. *Cancer Res*. 2007;67:11447-54.

Mortarini R, Vegetti C, Molla A et al. Impaired STAT phosphorylation in T cells from melanoma patients in response to IL-2: association with clinical stage. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4085-94.

Nakagawa T, Tsuruoka M, Ogura H et al. IL-6 positively regulates Foxp3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in vivo. *Int Immunol*. 2010;22:129-39.

Ngo MC, Rooney CM, Howard JM, Heslop HE. Ex vivo gene transfer for improved adoptive immunotherapy of cancer. *Hum Mol Genet*. 2011;20:R93-9.



Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:13132-7.

Oldham RK, Dillman RO. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J Clin Oncol*. 2008;26:1774-7.

Parmiani G. Tumor-infiltrating T cells--friend or foe of neoplastic cells? *N Engl J Med*. 2005;353:2640-1.

Pham BN, Martinot-Peignoux M, Valla D et al. Differential expression of perforin and granzyme B in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Hum Pathol*. 2003;34:770-7.

Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem*. 2005;94:1-14.

Prinz P. Dissertation: Tumorbedingte Störungen der funktionellen Kapazität tumorinfiltrierender natürlicher Killer- und T-Zellen: Nachweis der Funktionsdefizite und Evaluation von Gegenmaßnahmen. 2010.

Prinz PU, Mendler AN, Masouris I et al. High DGK-alpha and Disabled MAPK Pathways Cause Dysfunction of Human Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells That Is Reversible by Pharmacologic Intervention. *J Immunol*. 2012;188:5990-6000.

Puente LG, He JS, Ostergaard HL. A novel PKC regulates ERK activation and degranulation of cytotoxic T lymphocytes: Plasticity in PKC regulation of ERK. *Eur J Immunol*. 2006;36:1009-18.

Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96.

Radoja S, Saio M, Schaer D et al. CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol.* 2001;167:5042-51.

Raskovalova T, Lokshin A, Huang X et al. Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. *Cancer Res.* 2007;67:5949-56.

Riesenberg R, Weiler C, Spring O et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6993-7002.

Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND et al. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res.* 2009;69:2260-8.

Rodriguez PC, Hernandez CP, Morrow K et al. L-arginine deprivation regulates cyclin D3 mRNA stability in human T cells by controlling HuR expression. *J Immunol.* 2010;185:5198-204.

Romero P, Dunbar PR, Valmori D et al. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998;188:1641-50.

Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects. *Cancer Treat Rep.* 1984;68:233-55.

Rosenberg SA. The immunotherapy of solid cancers based on cloning the genes encoding tumor-rejection antigens. *Annu Rev Med.* 1996;47:481-91.

Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC et al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:299-308.

Roth DA, Brooks GA. Lactate and pyruvate transport is dominated by a pH gradient-sensitive carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *Arch Biochem Biophys*. 1990;279:386-94.

Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int J Oncol*. 2010;37:1361-78.

Saito T, Tanaka R, Yoshida S et al. Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes and major histocompatibility antigens in human gliomas and metastatic brain tumors. *Surg Neurol*. 1988;29:435-42.

Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010;207:2187-94.

Samten B, Townsend JC, Weis SE et al. CREB, ATF, and AP-1 transcription factors regulate IFN-gamma secretion by human T cells in response to mycobacterial antigen. *J Immunol*. 2008;181:2056-64.

Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R et al. Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol*. 1993;151:4209-20.

Seiter S, Monsurro V, Nielsen MB et al. Frequency of MART-1/MelanA and gp100/PMel17-specific T cells in tumor metastases and cultured tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother*. 2002;25:252-63.

Sica A, Dorman L, Viggiano V et al. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem*. 1997;272:30412-20.

Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, Gatenby RA. The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res.* 2009;69:2677-84.

Skrablin P. Dissertation: Tumormilieu-induzierte Inaktivierung zytotoxischer Lymphozyten. 2007.

Snell GD. The immunogenetics of tumor transplantation. *Cancer Res.* 1952;12:543-6.

Srivastava MK, Sinha P, Clements VK et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010;70:68-77.

Stins MF, Gilles F, Kim KS. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 1997;76:81-90.

Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer.* 2010;67:361-5.

Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 2002;110:993-1002.

Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol.* 1992;148:1143-8.

Taga K, Chretien J, Cherney B et al. Interleukin-10 inhibits apoptotic cell death in infectious mononucleosis T cells. *J Clin Invest.* 1994;94:251-60.

Taylor DD, Gercei-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer*. 2005;92:305-11.

Teixeira LK, Fonseca BP, Vieira-de-Abreu A et al. IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol*. 2005;175:5931-9.

Terman BS, K. VEGF and Tumor Angiogenesis. *Einstein Journal of Biology and Medicine*. 2011;18:59-66.

They C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3 22.

Thompson RH, Gillett MD, Chevillie JC et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17174-9.

Trinder P, Seitzer U, Gerdes J et al. Constitutive and IFN-gamma regulated expression of IL-7 and IL-15 in human renal cell cancer. *Int J Oncol*. 1999;14:23-31.

Uchida J, Sato H, Kawa G et al. Renal cell carcinoma of extraordinarily large size: a case report. *Int J Urol*. 1998;5:176-7.

Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9:1269-74.

Valitutti S, Muller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med*. 1996;183:1917-21.

Van den Hove LE, Van Gool SW, Van Poppel H et al. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol.* 1997;109:501-9.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991;254:1643-7.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989;49:6449-65.

Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:225-39.

Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:1172-6.

Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:55-62.

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000;60:916-21.

Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol.* 2009;1:20-36.

Wang E, Worschech A, Marincola FM. The immunologic constant of rejection. *Trends Immunol.* 2008;29:256-62.

Warburg OP, K.; Negelein E. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Biochemische Zeitschrift. 1924;152:319-44.

Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. Nat Rev Cancer. 2011;11:671-7.

Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. Immunity. 2007;27:670-84.

Wherry EJ. T cell exhaustion. Nat Immunol. 2011;12:492-9.

Wilde S, Sommermeyer D, Frankenberger B et al. Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity. Blood. 2009;114:2131-9.

Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer. I. Establishment of cells in culture. In Vitro. 1976;12:623-7.

Willimsky G, Blankenstein T. The adaptive immune response to sporadic cancer. Immunol Rev. 2007;220:102-12.

Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. J Exp Med. 1998;188:2205-13.

Zeh HJ, 3rd, Perry-Lalley D, Dudley ME et al. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. J Immunol. 1999;162:989-94.

Zhang B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. Oncol Immunology. 2012;1:67 - 70

---

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362:299-309.

Zippelius A, Batard P, Rubio-Godoy V et al. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res.* 2004;64:2865-73.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:263-74.



## 9 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADA	Ecto-Adenosinedeaminase
ADP	Adenosindiphosphat
Ado	Adenosin
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	engl.: activating protein 1
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende-Zelle
ATCC	engl.: American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
ATT	adoptiven T-Zell-Transfer
BCA	engl.: bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	eng.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CD	engl.: cluster of differentiation
Cdc42	engl.: Cell division control protein 42 homolog
CML	engl.: cell mediated lysis (zellvermittelte Lyse)
DAG	Diacetylglycerol
Cpm	engl.: counts per minute (Zählungen pro Minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
E:Z	Effektor- zu Zielzell Verhältnis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	engl.: epidermal-growth-factor
ELISA	engl.: enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Engl.: extracellular-regulated kinase-1
FACS	engl.: phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzösung)
FGF	engl.: basic fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

## Abkürzungsverzeichnis

FKS	fötales Kälberserum
FSC	engl.: forward scatter (Vorwärtsstreuung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	engl.: granulocyte colony-stimulating factor
GEF	engl.: guanin exchange factor
GFP	engl.: green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GM-CSF	engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSK3	Glykogensynthase 3
h	Stunde
HBMEC	engl.: human brain microvascular endothelial cell
HBSS	engl.: Hank's balanced salt solution
HEK	engl.: human embryonic kidney cells (humane embryonale Nierenzellen)
HIF1 $\alpha$	engl.: hypoxia inducible factor 1 alpha
HLA	engl.: human leukocyte antigen
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography
HS	humanes Serum
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IDO	Indolamin 2, 3-Dioxygenase
IE	Internationale Einheiten
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMI	Institut für Molekulare Immunologie
Ino	Inosin
IP <sub>3</sub>	Inositol-3-Phosphat
ITAM	engl.: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITAM	engl.: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	engl.: . immunotyrosinase switch motifs
I $\kappa$ B	engl.: inhibitor of kappa B
JNK	engl.: c-Jun N-terminal Kinase
K	T-Zell-Medium-Kontrolle

## Abkürzungsverzeichnis

KT	engl.: kidney tumor (Nierentumor)
L	engl.: lactic acid (Milchsäure)
LAMP	engl.: lysosomal-associated membrane proteine
LAT	Linker aktivierter T-Zellen
LCL	engl.: lymphoblastoid cell line (lymphoblastoide Zelllinie)
LDH	Laktatdehydrogenase
LOX	Laktatoxydase
M	T-Zell-Medium
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MCF	engl.: macrophage chemotactic factor
MCT	Monocarboxylattransporter
MHC	engl.: major histocompatibility complex
min	Minute
MIP1 $\beta$	engl.: macrophage inflammatory protein
MP	Meerrettich-Peroxidase
MTOC	engl.: microtubule organizing center
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NFAT	engl.: nuclear factor of activated T cells
NF $\kappa$ B	engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF $\beta$	engl.: nerve growth factor beta
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
PAMP	engl.: pathogen associated molecular patterns
PBMZ	engl.: peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	engl.: phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid
PI3K	PI3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

PKA	Proteinkinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMA/I	PMA und Ionomycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Photomultiplier
POD	Peroxidase
PPI	Protonen-Pumpen-Inhibitoren
PRR	engl.: pattern-recognition-receptor
Rac1	engl.: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Raf	engl.: rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma
Ras	engl.: rat sarcoma
RCC	engl.: renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom)
ROS	engl.: reactive oxygen species (reactive Sauerstoffspezies)
rpm	engl.: rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI 1640	engl.: Roeswell Park Memorial Institute Medium 1640
sek	Sekunde
SEM	engl.: standard error of the mean
SSC	engl.: sideward scatter (Seitwärtsstruung)
STAT	engl.: signal transducers and activator of transcription
TAP	engl.: transporter associated with antigen processing
T <sub>EFF</sub> -Zelle	T-Effektor-Zelle
TGF- $\beta$	engl.: transforming growth factor beta
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TYR	Tyrosinase
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZR-L	T-Zell-Rezeptor-Ligand
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
VLA	engl.: Very Late Antigen

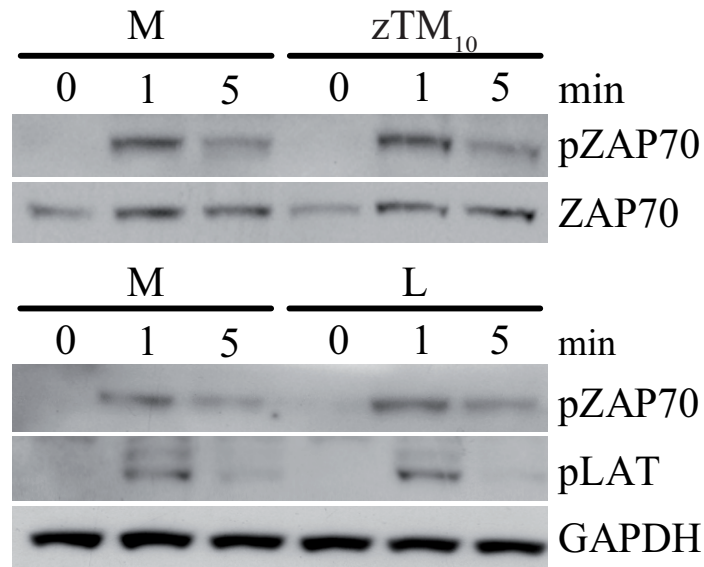
## Abkürzungsverzeichnis

---

V-ATPasen	engl.: Vacuolar proton-translocating ATPases
VHL	von-Hippel-Lindau
ZAP70	engl.: zeta-chain-associated protein kinase 70
zM	zellfreies Milieu
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
zTM	zellfreies Tumormilieu

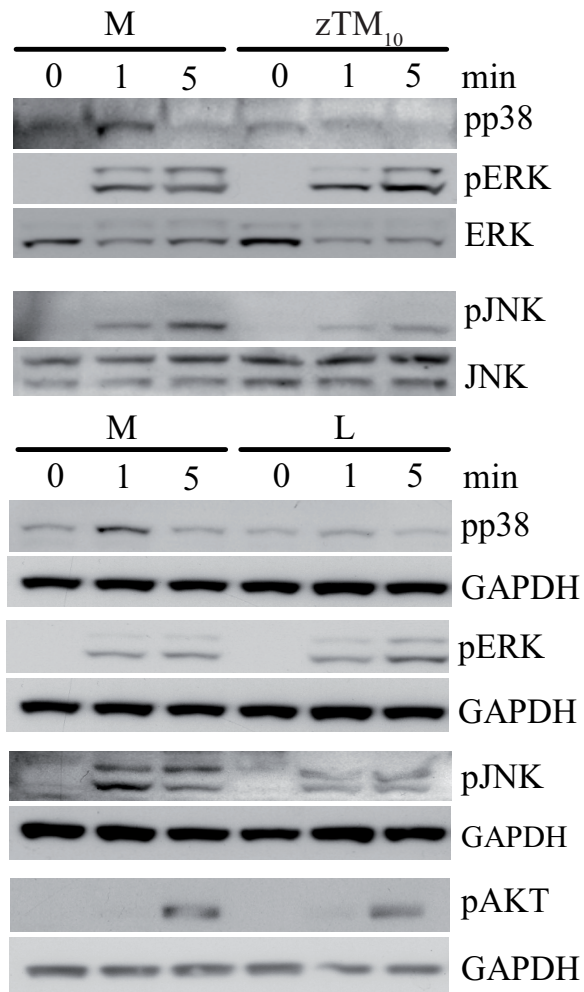
## 10 Anhang

Daten von Dr. Bin Hu aus der Arbeitsgruppe und publiziert in Mendler et al. 2011



**Abbildung 10-1: Einfluss des zellfreien Tumormilieu bzw. des „Milchsäure-Mediums“ auf die TZR proximalen Signalmoleküle**

ZTL-JB4 wurden für 4,5 h in Medium (M) bzw. in zellfreiem Tumormilieu hoher Zelldichte (zTM<sub>10</sub> = 5 x 10<sup>6</sup> KT195 für 40 h), oder in 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über CD3-Kreuzvernetzung für 0, 1 bzw. 5 min stimuliert und lysiert und die Proteine pZAP70 (Tyr<sup>493</sup>) und pLAT (Tyr<sup>191</sup>) im Westernblot untersucht. Als Beladungskontrolle dienten die Proteine entweder im unphosphorylierten Zustand oder GAPDH.



**Abbildung 10-2: Einfluss des zellfreien Tumorüberstandes bzw. des „Milchsäure-Mediums“ auf die TZR distalen Signalmoleküle**

ZTL-JB4 wurden für 4,5 h in Medium (M), von bzw. in zellfreiem Tumormilieu hoher Zelldichte (zTM<sub>10</sub> =  $5 \times 10^6$  KT195 für 40 h), oder in 20 mM „Milchsäure-Medium“ (L = lactic acid) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über CD3-Kreuzvernetzung für 0, 1 bzw. 5 min stimuliert und lysiert und die Proteine pp38 (Thr<sup>180</sup>/Thr<sup>182</sup>), pERK (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), pJNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), und pAKT (Ser<sup>473</sup>) im Westernblot untersucht. Als Beladungskontrolle dienten die Proteine entweder im unphosphorylierten Zustand oder GAPDH.

### **Danksagung**

Ich möchte mich zunächst ganz besonders herzlich bei Frau Prof. Dr. Elfriede Nößner dafür bedanken, dass ich in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anfertigen konnte, dass ich dieses sehr spannende Projekt bearbeiten durfte, was mir wirklich sehr viel Freude bereitet hat und natürlich für die tolle Betreuung. Sie hatte immer ein offenes Ohr wenn ich Fragen hatte, hat sich stets viel Zeit genommen um verschiedenste Fragestellungen zu diskutieren und hat mich immer unterstützt und motiviert, wenn es mal nicht so gut lief. Gerade am Ende der Arbeit war ihre Betreuung sehr intensiv, was nicht selbstverständlich ist und ich sehr zu schätzen weiß.

Bei Frau Prof. Dr. Weiss möchte ich mich für die Vertretung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der LMU München bedanken, sowie für die sehr hilfreichen Anregungen und Tipps für meine Arbeit.

Frau Prof. Dr. Schendel möchte ich danken, dass sie es mir ermöglicht hat am Institut für Molekulare Immunologie meine Doktorarbeit anzufertigen.

Ein riesiges Dankeschön an unsere ganze Arbeitsgruppe Petra, Anna, Doro, Ramona und Ilias. Ohne euch wäre die Zeit sicherlich nicht so schön gewesen. Die Arbeit mit euch hat sehr viel Spaß gemacht, wir haben immer viel zusammen gelacht, aber ich konnte auch zu jedem von euch kommen wenn es mal nicht so gut lief, ich einfach Ergebnisse diskutieren wollte oder sonstige Probleme hatte. Dabei seid ihr mir alle sehr ans Herz gewachsen!

Bei Anna Brandl möchte ich mich ganz besonders bedanken. Sie hat ohne zu klagen viele, viele hunderte Millionen JB4 für mich restimuliert ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Zusätzlich habe ich immer wieder von ihrem Wissen, was Zellkultur, Versuchsdurchführung, Bestellungen oder Ähnliches betraf, profitieren können. Sie hat mich bei vielen Versuchen unterstützt, bei deren Planung und Durchführung wir immer sehr viel gelacht haben, aber trotzdem immer zum Ziel gekommen sind.



## Danksagung

---

Dr. Bin Hu hat mich in die Welt des Signalings eingeführt, wofür ich mich bei ihm herzlich bedanken möchte. Ohne sein Wissen hätte ich sicherlich nicht so viele tolle Ergebnisse erzielt.

Ich möchte mich auch bei allen ehemaligen Labormitgliedern bedanken, die zur guten Atmosphäre im Labor beigetragen haben. Adri, Ulli, Stefan, Katha, Tina, Michi, Quirin und Melli sind nur einige der Doktoranden, Diplomanden, Masteranden, Bacheloranden und Praktikanten die mit mir im Labor Zeit verbracht haben. Mit einigen wird der Kontakt sicherlich auch in Zukunft noch bestehen.

Beim ganzen IMI möchte ich mich für die große Unterstützung in verschiedensten Themenbereichen bedanken. Steffi für die Hilfe mit der Transduktion, Susanne für die Ermöglichung der Versuche mit den transduzierten T-Zellen, Josef für alle Fragestellungen rund um Antikörper, Kompensation und Ähnliches, Judith für verschiedenste Tipps zum FACS, Babs für die Hilfe beim Phosphoprotein-Multiplex, aber auch alle Themen rund um CML und Stimulation von T-Zellen. Insgesamt möchte ich mich bei allen für das tolle Arbeitsklima, aber auch die gemeinschaftlichen Aktivitäten, wie Lunch-Clubbing, After-Work und die Schoko-Kaffeepausen bedanken, die das Arbeiten versüßt haben.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Marina Kreutz, Dr. Eva Gottfried und Gabi Hartmannsgruber, die die Laktat-Messungen meiner Proben am Universitätsklinikum Regensburg durchführten, bedanken. Ohne diese Daten wäre ich in meiner Arbeit nicht so weit gekommen. Vielen Dank!

Bei Dr. Matthias Leisegang und Herrn Prof. Dr. Uckert möchte ich mich für die Bereitstellung der TZR-Vektoren bedanken.

Herr PD. Dr. Chouker und insbesondere Marion Hoerl möchte ich für die Adenosinmessung ganz herzlich danken.

## Danksagung

---

Zusätzlich möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, insbesondere meinen Eltern, die mich mein Leben lang bei allem was ich getan habe immer unterstützt haben. Sie sind immer für mich da und haben immer an mich geglaubt. Aber auch auf meine Brüder, Philip und Cookie, kann ich mich immer verlassen, wofür ich sehr dankbar bin.

Schließlich möchte ich mich von tiefem Herzen bei meinem Mann, Michi, bedanken. Ohne ihn hätte ich v.a. die letzte Zeit nicht überstanden. Er ist mein Fels, der immer für mich da ist. Wenn es mir nicht gut ging hatte er immer tröstende Worte und eine Umarmung für mich parat, die mir sehr viel bedeutet haben.

Letztlich möchte ich mich noch bei allen bedanken, die ich nicht namentlich erwähnt habe, die mir bei meiner Arbeit, dem Korrekturlesen und bei Fragen zu Formatierungen, usw. geholfen haben.

# Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation

Anna N. Mendler<sup>1,\*</sup>, Bin Hu<sup>1,\*</sup>, Petra U. Prinz<sup>1</sup>, Marina Kreutz<sup>2</sup>, Eva Gottfried<sup>2</sup> and Elfriede Noessner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Helmholtz Zentrum München-Germany Research Center for Environmental Health, Institute of Molecular Immunology, Munich, Germany

<sup>2</sup>Department of Hematology and Oncology, University Medical School Regensburg, Regensburg Bavaria, Germany

Lactic acidosis is common to most solid tumors and has been found to affect infiltrating immune cells. Here we document effector phase inhibition of cytotoxic T cells (CTLs) involving complete blockage of cytokine production and partial impairment of lytic granule exocytosis. Lactic acidosis impaired TCR-triggered phosphorylation of JNK, c-Jun and p38, while not affecting MEK1 and ERK. The select targeting of signaling proteins involved in IFN $\gamma$  production (JNK/c-Jun, p38) without affecting those jointly used in cytokine regulation and granule exocytosis (MEK1/ERK) explains the observed split effect of lactic acidosis on the CTL responses. CTL inhibition by lactic acidosis showed fast dynamics with immediate onset and reversion. Functional recovery by neutralizing the extracellular pH despite continuous presence of lactate holds promise that CTL activity can be improved in the milieu of solid tumors with appropriate anti-acidosis treatment, thereby increasing the efficacy of adoptive T cell therapy.

Recent results from clinical trials showing response rates greater than 50% following the infusion of *ex vivo* expanded tumor-infiltrating lymphocytes in treatment-resistant metastatic melanoma patients suggest that adoptive T cell therapy (ATT) could be a promising treatment for tumor patients.<sup>1</sup> Considering that high quality T cells are transferred into patients one would, however, expect a higher success rate. Mouse models showed that adoptively transferred T cells lost their effector functions when entering the tumor environment as demonstrated by reduced degranulation and cytokine production.<sup>2,3</sup> Effector T cells (eCD8-cells) were able to regain activity after removal from the tumor milieu, suggesting that the milieu created by a growing tumor influ-

ences eCD8-cells in a way which makes them unable to fulfill their effector activity.<sup>4,5</sup>

Inhibition of eCD8-cells by the tumor milieu can be caused by (i) upregulation of inhibitory receptors like programmed death 1 (PD1) on the effector cells, (ii) cells within the tumor, like regulatory T cells or myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) or (iii) soluble factors, such as cytokines (TGF- $\beta$ , IL10), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), arginase, nucleotides or metabolites produced by the tumor cells.<sup>5-7</sup> Of the latter, high lactate and extracellular acidosis are common characteristics of solid tumors.<sup>8,9</sup> Accumulation of lactic acid in solid tumors is a byproduct of hypoxia as tumors are forced to switch to an anaerobic energy production. Some tumors perform glycolysis even in the presence of oxygen, a phenomenon known as the Warburg Effect.<sup>10</sup> Lactic acid and extracellular acidosis have been shown to influence tumor growth, invasion and metastasis.<sup>9,11,12</sup> Interference with signaling cascades, in particular activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in tumor cells, has been documented, possibly explaining the association with increased proliferative capacity.<sup>13,14</sup> Effects on different cells of the immune system have also been reported<sup>15,16</sup>; yet, little is known about the mechanisms by which eCD8-cells are influenced.

Here we document that tumor lactic acidosis, with the combined presence of lactate and protons, selectively targets p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK)/c-Jun activation in CTLs while interfering little with the ERK or AKT pathway. Targeting of select pathways provides an explanation for the observed split inhibition where CTL cytokine response was completely blocked while granule exocytosis was only partly inhibited in lactic acid milieu. The reversibility of CTL inhibition by buffering the extracellular pH of the lactic acid milieu suggests that neutralization of the tumor milieu might

**Key words:** effector phase inhibition, lactic acid, T cell receptor signaling, adoptive T cell therapy, cytotoxic T cells

**Abbreviations:** ATT: adoptive T cell therapy; eCD8-cells: effector CD8<sup>+</sup> T cells; LAT: linker of activated T cells; M: T cell medium; MFI: median fluorescence intensity; pMHC<sup>+</sup>: peptide-major histocompatibility complex<sup>+</sup>; PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA/I: PMA/ionomycin; TS: tumor supernatant; ROS: reactive oxygen species

\*A.N.M. and B.H. contributed equally to this work.

**Grant sponsor:** Deutsche Forschungsgemeinschaft; **Grant numbers:** SFB-TR36, SFB455, DFG KR1418/7-1

**DOI:** 10.1002/ijc.26410

**History:** Received 12 May 2011; Accepted 11 Aug 2011; Online 2 Sep 2011

**Correspondence to:** Elfriede Noessner, Institute of Molecular Immunology, Helmholtz Zentrum München – German Research Center for Environmental Health, Marchioninstr. 25, 81377 Munich, Germany, Tel: +49-89-7099-303, Fax: +49-89-7099300, E-mail: noessner@helmholtz-muenchen.de

not only suppress metastatic capacity, as has been suggested,<sup>11,12</sup> but could also improve the targeting of the tumor by immune effector cells, thereby enhancing the effect of ATT.

## Material and Methods

### Cells

The cytotoxic T effector cell clone, CTL-JB4, recognizing the human leukocyte antigen (HLA)-A2 molecule, was cultured as described.<sup>17</sup> RCC-26 is an HLA-A2 positive renal cell carcinoma (RCC) line, originating from a moderately differentiated clear cell RCC.<sup>18</sup> KT195 is a HLA-A2 negative renal cell carcinoma line (tumor cell collection, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany). T cells retrovirally transduced with the RCC-reactive HLA-A2 restricted T cell receptor (TCR53) are described in Leisegang *et al.*<sup>19</sup> The cell population was frozen until use. One day before the experiment, cells were thawed and rested overnight in CTL medium (M) with 50 U/ml IL-2.

### Milieu conditions used during stimulation of eCD8-cell activity

Normal CTL milieu (M) was RPMI 1640 supplemented with 1 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, 7.5% fetal bovine serum and 7.5% human serum. Tumor lactic acidosis milieu (L) was created by adding 20 mM lactic acid (Sigma) to M resulting in pH values of  $6.3 \pm 0.07$ . The lactic acid concentration and the corresponding pH value correspond to values measured in human solid tumors.<sup>8,9</sup> Lactosis condition (N) was created by adding 20 mM sodium lactate to M (pH  $7.7 \pm 0.1$ ). Acidosis was created by titrating phosphoric acid into M or into lactosis medium to pH 6.5, respectively. Neutralization of lactic acidosis was done by titrating NaOH to lactic acidosis medium to pH 7.6. Cell-free tumor supernatant was generated by cultivating  $5 \times 10^6$  KT195 tumor cells (TS<sub>hi</sub>) or  $0.5 \times 10^6$  KT195 tumor cells (TS<sub>lo</sub>), respectively, for 40 hr in 1 ml of normal CTL milieu. Cell-free supernatants were harvested and frozen until use.

When CTLs were cultured for 16 hr prior to stimulation, 10 ng/ml IL-15 (Peprotech) was added to the respective milieus.

### Stimulation of CTLs

CTL-JB4 or TCR53-expressing T effector cells (eCD8-TCR53) were stimulated in different milieus with either cognate (pMHC<sup>+</sup>) tumor cells (RCC-26) (ratio 1:2) or Phorbol Myristate Acetate (50 ng/ml)/ionomycin (500 ng/ml) (PMA/I) for 5 hr in the presence of Golgi-stop, brefeldin A and anti-CD107a-FITC and anti-CD107b-FITC antibodies (all from BD Biosciences). Cells were then harvested and IFN $\gamma$  production and lytic granule exocytosis were analyzed by multiparameter flow cytometry. For Phosphoprotein Multiplex (Bio-Rad Laboratories) and western blot analysis, CTL-JB4 ( $1-2 \times 10^6$ /ml) were incubated in different milieus (see above) for 4.5 hr at 37°C/6.5% CO<sub>2</sub> after which they were ei-

ther directly stimulated or transferred to CTL medium for 30 minutes or 2 hr. For stimulation, the cells were cooled to 0°C on ice before addition of anti-CD3 antibody (OKT3, 1  $\mu$ g/ml) for 10 min followed by crosslinking with 10  $\mu$ g/ml goat-anti-mouse F(ab)<sub>2</sub> IgG (Serotec). Stimulation was initiated by raising the temperature to 37°C. Cells were harvested after 1, 5, 15 and 30 minutes and lysed using lysis buffer 6 of the Phosphoprotein Multiplex kit (30 minutes, 4°C) following the manufacturer's protocol.

### Multiparameter flow cytometry for IFN $\gamma$ production and granule exocytosis

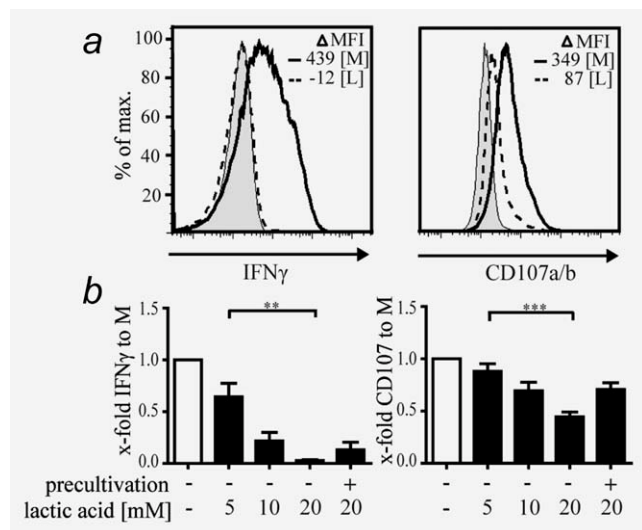
After 5 hr of stimulation in the presence of anti-CD107a/b-FITC, Golgi-stop and brefeldin A (see above), cells were harvested and membrane staining was done with anti-CD45-PeCy7, 7-aminoactinomycin D and, additionally, anti-CD8-V500, if transduced eCD8-TCR53 cells were analyzed. After fixation (1% paraformaldehyde) and permeabilization (0.1% and 0.35% saponin), anti-IFN $\gamma$ -allophycocyanin and, additionally, anti-mouse-TCR $\beta$ -PE for the eCD8-TCR53 cells were added. All antibodies were from BD Pharmingen. Data acquisition and analysis employed the LSRII (BD Pharmingen) and FlowJo (TreeStar). The median fluorescence intensity (MFI) of IFN $\gamma$  and CD107a/b were determined for the gated live (7-aminoactinomycin-negative) CD45<sup>+</sup> (CTL-JB4) or 7-aminoactinomycin-negative CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR53<sup>+</sup> eCD8 T cells using unstimulated CTL/RCC-26 cocultures (0 hr) as reference. The median fluorescence intensity (MFI) value of the 0 hr time point was subtracted from the corresponding MFI of the 5 hr time point ( $\Delta$ MFI). Presented in the graph are the *x*-fold-changes of the  $\Delta$ MFI of the test condition to the corresponding  $\Delta$ MFI of the medium control  $\pm$  SEM.

### Phosphoprotein Multiplex

Lysates of CTLs ( $1.5-2 \times 10^6$  cell equivalents) were analyzed for the content of various phosphoproteins: pp38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>), pJNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), pc-Jun (Ser<sup>63</sup>), pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>), pMEK1 (Ser<sup>217</sup>/Ser<sup>221</sup>) and pAKT (Ser<sup>473</sup>), using the Phosphoprotein Multiplex kit (Bio-Rad Laboratories) and Luminex technology (LABScanTM100) following the manufacturer's protocol. Lysates were analyzed in parallel with the Total Target Assays Multiplex kit (Bio-Rad Laboratories) to determine total level of non-phosphorylated proteins which were found not to be changed under different conditions (not shown). Phosphoprotein Multiplex data were calculated as *x*-fold-change to the corresponding value of unstimulated CTLs.

### Western blot

Lysates of CTLs ( $2 \times 10^6$  cell equivalents) were resolved on a NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris gel (Invitrogen), transferred to PVDF membranes and probed with pLAT (Tyr<sup>191</sup>), pZAP-70 (Tyr<sup>493</sup>), pJNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), pp38 (Thr<sup>180</sup>/Thr<sup>182</sup>), pERK (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) and pAKT (Ser<sup>473</sup>). Equal loading of membranes was confirmed by staining of GAPDH or antibodies



**Figure 1.** Lactic acidosis inhibits CTL responses in a concentration dependent manner. CTLs were stimulated with pMHC<sup>+</sup> tumor cells (RCC-26) in the presence or absence of lactic acid. Degranulation and cytokine production were measured by flow cytometry. Representative histograms of IFN $\gamma$  and CD107 fluorescence are shown in (a). Gray filled histograms: fluorescence intensity without stimulation (time point 0 hr), black line: 5 hr stimulation in CTL medium (M, pH 7.6), dashed line: stimulation in 20 mM lactic acid (L, pH 6.3).  $\Delta$ MFI: median fluorescence intensity at 5 hr of stimulation subtracted by the value observed at 0 hr. (b) Summarized graph of multiple experiments ( $\geq 7$ ). CTLs were stimulated without precultivation (–) in indicated concentrations [mM] of lactic acid ( $n = 6$ ) or CTLs were precultivated for 16 hr in 20 mM lactic acid and then stimulated in 20 mM lactic acid for 5 hr ( $n = 3$ ). Bars are the mean of the x-fold-values of  $\Delta$ MFI to the corresponding  $\Delta$ MFI observed in CTL medium  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis and Dunn's *post hoc* test were used for statistical analysis of significance.

against respective total proteins. All antibodies were from Cell Signaling, except GAPDH which was from Affinity BioReagents.

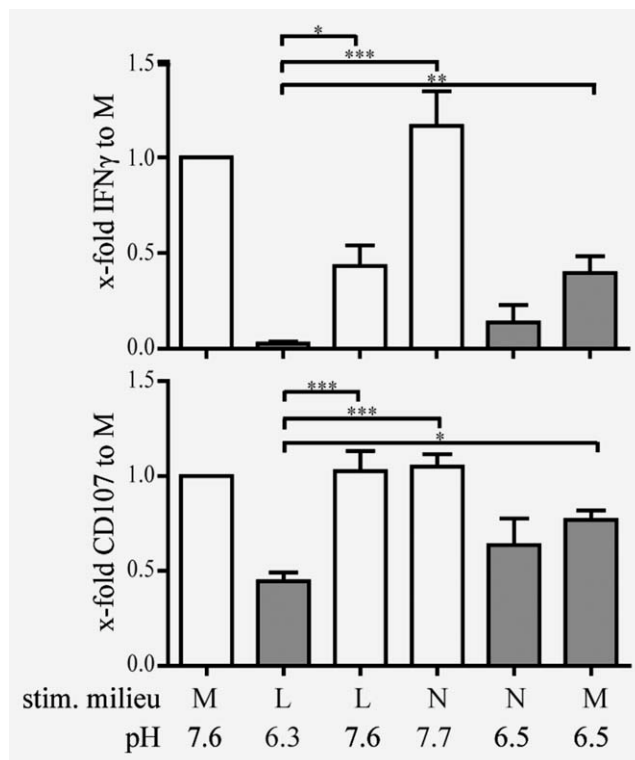
### Statistical analysis

Statistical analysis was done using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software; San Diego, USA). Mann Whitney U test was used to determine statistical differences between two groups, and differences between more than two groups were examined for statistical significance using the Kruskal-Wallis and Dunn's *post hoc* test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  indicate the level of statistical significance.

## Results

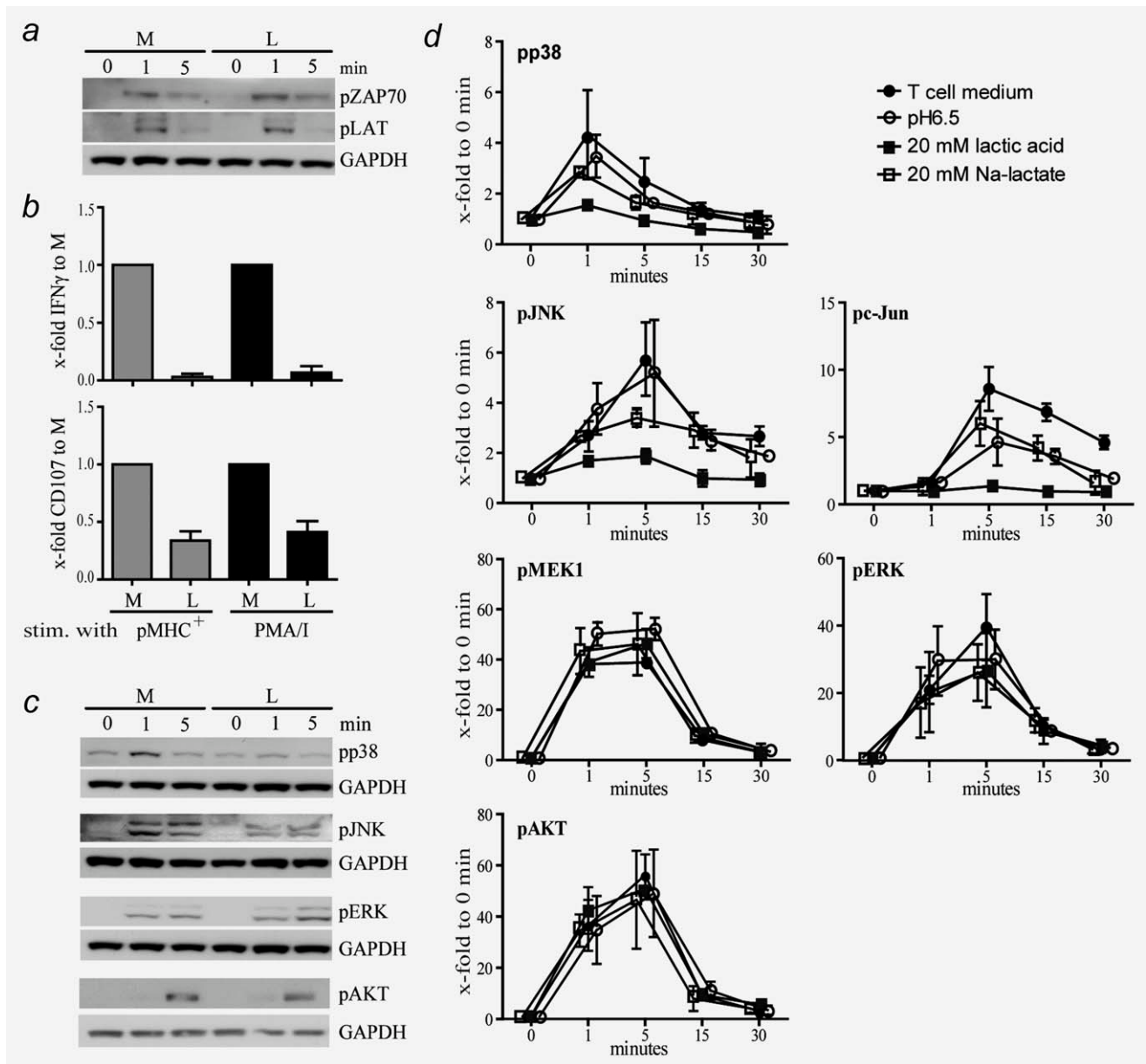
### Lactic acid inhibits eCD8-cell responses

CD8<sup>+</sup> lymphocytes are powerful effector cells that can destroy tumor cells either through lytic attack or IFN $\gamma$  pro-



**Figure 2.** Inhibition of CTL function depends on the presence of protons. CTLs were stimulated with pMHC<sup>+</sup> tumor cells (RCC-26) in CTL medium (M, pH 7.6), lactic acid (L, pH 6.3), lactic acid buffered with NaOH (L, pH 7.6), sodium lactate (N, pH 7.7), sodium lactate or medium acidified with phosphoric acid (N, pH 6.5; M, pH 6.5). Degranulation and cytokine production were measured by flow cytometry. Shown is the summary of at least three independent experiments (grey columns indicate acidic milieus). Bars are the mean of the x-fold-values of  $\Delta$ MFI to the corresponding  $\Delta$ MFI observed in CTL medium  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis and Dunn's *post hoc* test were used for statistical analysis of significance.

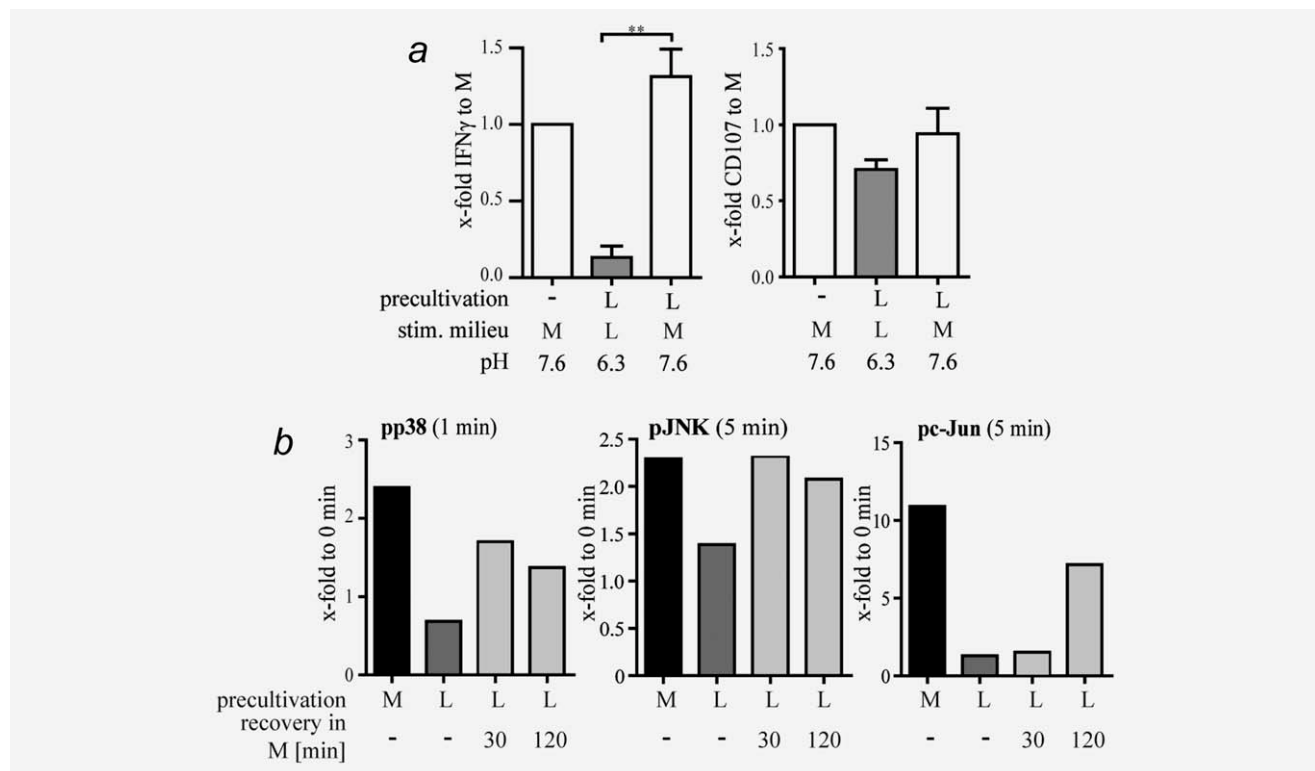
duction.<sup>20–22</sup> However, within the milieu of a solid tumor, suppression of both IFN $\gamma$  secretion and degranulation associated with loss of tumor control has been observed.<sup>2,3</sup> It has been shown previously that exposure of CTLs to lactic acidosis milieu strongly diminished their capacity to produce cytokines.<sup>16</sup> We now document that the inhibitory effect of lactic acidosis on TCR-triggered cytokine production does not require preincubation but occurs immediately as soon as CTLs are placed into the lactic acidosis milieu (Fig. 1), consistent with the previously reported fast uptake of lactate.<sup>16</sup> When CTLs were stimulated with pMHC<sup>+</sup> cells (RCC-26) in lactic acidosis milieu without prior exposure to lactic acid, TCR-triggered IFN $\gamma$  production was reduced in a concentration dependent manner with complete suppression at 20 mM lactic acid (Figs. 1a and 1b). The same results were observed for TNF $\alpha$  and IL2 (data not shown). Lytic granule exocytosis was also impaired, albeit less severely, with on average 50%



**Figure 3.** Lactic acid interferes with TCR distal signaling pathways. (a) CTLs were stimulated for 1, 5, 15 or 30 minutes by crosslinking CD3 antibodies in indicated conditions and proximal signaling molecules were analyzed by western blot. M and L refer to stimulation in CTL medium or 20 mM lactic acid, respectively. GAPDH is used as loading control. (b) CTLs were stimulated for 5 hr with either pMHC<sup>+</sup> tumor cells (RCC-26) or PMA/I in CTL medium (M, pH 7.6) or in 20 mM lactic acid (L, pH 6.3). Degranulation and cytokine production were measured by flow cytometry. Shown is the summary of four independent experiments. Bars are the mean of the x-fold-values of  $\Delta$ MFI to the corresponding  $\Delta$ MFI observed in CTL medium  $\pm$  SEM; (c, d) CTLs were stimulated as described in (a) and analyzed by western blot (c) or Phosphoprotein Multiplex (d). Phosphoprotein Multiplex data were calculated as the x-fold-change to the corresponding value of unstimulated CTLs. Each symbol is the mean of three experiments  $\pm$  SEM. Western blots show one representative blot of several independent experiments with similar results.

reduction of degranulating CTLs in 20 mM lactic acid. The viability of the CTLs was not affected, with 70–80% viable cells after 16 hr in either normal CTL medium or 20 mM lactic acid. To analyze if the inhibitory effect of tumor lactic acidosis would also affect an eCD8-cell population as used in

clinical settings of ATT,<sup>1</sup> the function of a TCR-transduced eCD8-cell population (eCD8-TCR53 cells)<sup>19</sup> was analyzed in the presence of lactic acid. The observed 90% suppression of IFN $\gamma$  production and 40% reduction of degranulation were comparable to that seen for CTL-JB4 (data not shown).



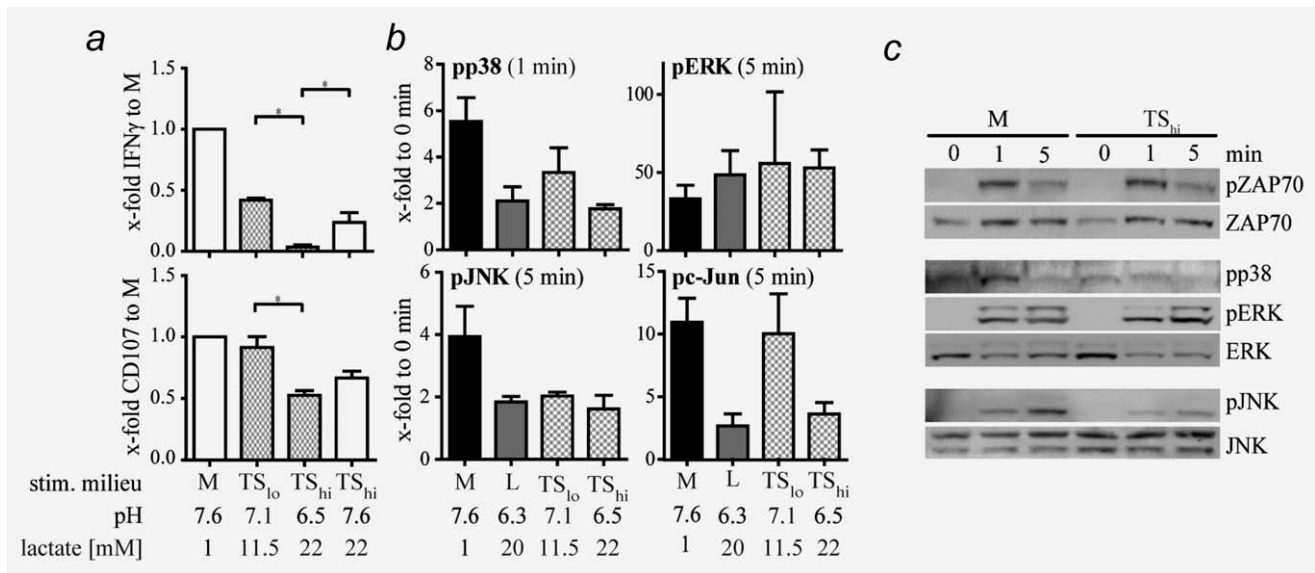
**Figure 4.** Inhibition of CTL function is reversible. (a) CTLs were preincubated for 16 hr in 20 mM lactic acid (L, pH 6.3) and then stimulated either in 20 mM lactic acid (L, pH 6.3) or fresh CTL medium (M, pH 7.6). Degranulation and cytokine production were measured by flow cytometry. Shown is the summary of three independent experiments (grey columns indicate acidic milieus). Bars are the mean of the x-fold values of  $\Delta$ MFI to the corresponding  $\Delta$ MFI observed in CTL medium  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis and Dunn's *post hoc* test were used for statistical analysis of significance. (b) CTLs were preincubated in CTL medium (M, pH 7.6) or 20 mM lactic acid (L, pH 6.3) for 4.5 hr and then either stimulated directly for 1, 5, 15 or 30 minutes by CD3 crosslinking or transferred from lactic acid to CTL medium for 30 min or 2 hr, respectively, before stimulation. The phosphorylation level of signaling molecules was determined using Phosphoprotein Multiplex. For each protein (p38, JNK, c-Jun), the x-fold change between 0 hr and the time point of the highest phosphorylation (see figure 3d) is graphically presented. Shown is one of two experiments with similar results.

Further analysis revealed that lactosis milieu (20 mM Na-lactate, N, pH 7.7) did not suppress CTL function (Fig. 2). Acidification of the lactosis milieu (20 mM Na-lactate, N, pH 6.5) led to an inhibition comparable to that seen in lactic acidosis milieu (20 mM lactic acid, L, pH 6.3). Acidifying normal CTL medium (M, pH 6.5) partially reduced CTL function, similar to that observed in 5 mM lactic acid condition (Fig. 1b). Indeed, lactic acid concentrations of up to 7 mM were produced by the tumor cells used for the 5 hr- T cell stimulation. This confirms lactate as the inhibitory component which requires co-transport with protons for uptake to unleash its inhibitory activity.<sup>16,23</sup>

Notably, neutralization of the extracellular pH of lactic acidosis condition (20 mM lactic acid, L, pH 7.6) counteracted the inhibitory effect of lactic acid on CTL function, despite the continuous presence of lactate (Fig. 2). Likely, the observed reacidification (pH 7.1) of the milieu during the 5 hr stimulation prevented complete restoration of CTL function. Thus, better maintenance of CTL function should be possible if the pH is better controlled.

#### Lactic acid interferes with distal components of the TCR signaling pathway

TCR-initiated functional responses are mediated by fast on-off phosphorylation of TCR proximal signaling molecules followed by the activation of downstream MAPKs and transcription factors.<sup>21,24,25</sup> Phosphorylation of TCR proximal ZAP70 and immediate downstream anchoring protein LAT (linker of activated T cells) was found to be similar when CTL functional responses were stimulated in CTL medium (M) or lactic acidosis (L) as seen by western blotting (Fig. 3a). Consistent with a normal initiation of the TCR signaling cascade, inhibition of CTL responses in lactic acidosis condition remained when CTLs were stimulated with PMA and ionomycin (PMA/I) (Fig. 3b), which circumvents proximal TCR signaling events. Strong reduction of phosphorylation of the TCR distal MAPK pathways p38 and JNK with its downstream effector c-Jun was observed using Phosphoprotein Multiplex analysis (Fig. 3d) and confirmed by western blotting (Fig. 3c). In contrast, lactic acid did not interfere with the phosphorylation of MEK1 and its downstream kinase



**Figure 5.** Effects of tumor supernatants on CTL function and phosphorylation of TCR signaling molecules. (a) Degranulation and cytokine production of CTLs stimulated with pMHC<sup>+</sup> tumor cells (RCC-26) in CTL medium (M, pH 7.6) or cell-free tumor supernatants produced by tumor cells grown in low (TS<sub>lo</sub>, pH 7.1) or high density (TS<sub>hi</sub>, pH 6.5) or TS<sub>hi</sub> neutralized to pH 7.6 with NaOH (TS<sub>hi</sub>, pH 7.6). Shown is the summary of multiple independent experiments (TS<sub>lo</sub>: *n* = 3; TS<sub>hi</sub>: *n* = 23). Bars are the mean of the x-fold-values of  $\Delta$ MFI to the corresponding  $\Delta$ MFI observed in CTL medium  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis and Dunn's *post hoc* test were used for statistical analysis of significance. (b) Phosphorylation level of signaling molecules in CTLs stimulated in either CTL medium (M, pH 7.6), lactic acid (pH 6.3), TS<sub>lo</sub> (pH 7.1) or TS<sub>hi</sub> (pH 6.5) for 1, 5, 15 or 30 minutes determined using Phosphoprotein Multiplex. For each protein shown (p38, JNK, c-Jun), the x-fold change between 0 hr and the time point of the highest phosphorylation (see Fig. 3d) was calculated. Bars are the mean of the x-fold-change of 2–5 independent experiments. (c) Western blot of signaling molecules of CTLs stimulated by CD3 crosslinking in CTL medium (M, pH 7.6) or TS<sub>hi</sub> (pH 6.5). A representative blot of several independent experiments with similar results is shown.

ERK. Phosphorylation of AKT was also not affected (Figs. 3c and 3d). The inhibitory effects were specific for lactic acidosis, as they were not seen when CTLs were stimulated in lactic acid milieu or acidic milieu without lactic acid.

#### Recovery of eCD8 function after removal from the lactic milieu

As shown in Figure 1b, CTL effector activities were impaired in lactic acidosis milieu without the requirement of prior incubation in the lactic milieu. At the same time, CTLs that had been precultivated in lactic acid rapidly recovered functional activity when removed from the lactic acid milieu and stimulated under normal T cell conditions (Fig. 4a). Concomitantly with this gain of function, it was observed that the signaling defects in p38, JNK and c-Jun, which were detected in lactic acid containing medium (Figs. 3c and 3d), recovered within 30 minutes for p38 and JNK and 2 hr for c-Jun, when transferring the cells to normal CTL medium (Fig. 4b).

#### Cell-free supernatant generated from tumor cells show similar effects as lactic acid milieu

To determine if the inhibition in the presence of lactic acid had any significance in a tumor relevant context, we compared the inhibitory effect of lactic acid to that induced by

the supernatants generated through cultivation of kidney tumor cells (KT195) in low (tumor supernatant: TS<sub>lo</sub>:  $0.5 \times 10^6$  cells/ml) or high density (TS<sub>hi</sub>:  $5 \times 10^6$  cells/ml). TS<sub>hi</sub> showed similar inhibitory capacity as lactic acid in a high concentration, completely blocking IFN $\gamma$  production and reducing the degranulation capacity by 50% (Fig. 5a). TS<sub>lo</sub> had less effect, suppressing IFN $\gamma$  production by 60% and only marginally impairing degranulation. Determining the lactic acid concentration of the tumor supernatants revealed concentrations of 11.5 mM ( $\pm 1.5$  mM) for TS<sub>lo</sub> and 22 mM ( $\pm 1.5$ ) for TS<sub>hi</sub>. Thus, the effects on eCD8-cell function induced by TS showed a strong correspondence to those observed with medium supplemented with 10 and 20 mM lactic acid, respectively (Fig. 1b). Neutralizing the pH of TS<sub>hi</sub> improved CTL function, albeit to a lesser extent than observed in neutralized lactic acidosis milieu (Fig. 2). This could be the result of other inhibitory factors, in addition to lactic acid, present in the TS.<sup>5–7</sup>

As seen for 20 mM lactic acid, CTL stimulation within TS<sub>hi</sub> showed reduced phosphorylation of p38, JNK and c-Jun, but not ERK or ZAP70 (Figs. 5b and 5c). In TS<sub>lo</sub>, phosphorylation of JNK was decreased to the same extent as in TS<sub>hi</sub>, whereas p38 phosphorylation remained higher and c-Jun was not affected, explaining the partial inhibition of degranulation and IFN $\gamma$  production in TS<sub>lo</sub>.



## Discussion

Effector phase inhibition of CTLs by solid tumors is an acknowledged phenomenon contributing to the tumors' escape from the naturally occurring antitumor immune effector cells.<sup>5,8,26</sup> In recent years, functional repression in the milieu of solid tumors has been shown to also affect adoptively transferred CTLs which are preselected for strong antitumor reactivity *ex vivo*, thereby limiting the success of ATT.<sup>2,3</sup> Yet, the tumor-inflicted CTL inhibition remains poorly understood on a mechanistic level. Here we provide evidence that lactic acidosis, a common characteristic of most solid tumors,<sup>9</sup> is one factor that causes CTL inhibition. Tumors adopt glycolysis, resulting in the accumulation and secretion of lactic acid into the extracellular space, to sustain oxygen-independent energy production and prevent excessive generation of cell-damaging reactive oxygen species (ROS).<sup>8</sup> With lactate suppressing the function of infiltrating T cells, this tumor-associated metabolic adaptation provides an additional benefit to the tumor by protecting it from immune attack.

The fast dynamics of CTL functional suppression can be explained by the observed interference of lactic acid with the TCR-triggered phosphorylation of signaling molecules. Lactic acidosis was found to selectively target downstream signaling pathways of the MAPKs p38 and JNK/c-Jun as observed by reduced phosphorylation when CTLs were stimulated in the presence of lactic acid, whereby similar effects were seen when lactic acid was either externally added to CTL medium or naturally produced by tumor cells (cell free supernatants). However, phosphorylation of MEK1/ERK, another TCR distal pathway and phosphorylation of TCR proximal signaling components ZAP70 and LAT were not affected. C-Jun cooperates with p38-activated c-Fos to form the transcriptional activator complex AP-1 which is essential for cytokine gene transcription.<sup>24,27</sup> Suppressed phosphorylation of p38 and JNK/c-Jun can, thus, explain the observed inhibition of IFN $\gamma$  production when CTLs are stimulated in lactic acid milieu. Lactic acid in low concentrations, as found in TS<sub>10</sub>, had less effect on CTL function. While c-Jun phosphorylation was not affected, incomplete activation of p38 could potentially cause insufficient phosphorylation of c-Fos and, ultimately, could explain the reduced IFN $\gamma$  production observed in TS<sub>10</sub>.

The preference of lactic acidosis to interfere with p38, JNK/c-Jun, which are selectively involved in cytokine regulation,<sup>4,27-29</sup> rather than with other downstream pathways shared by IFN $\gamma$  production and degranulation (MEK1/ERK, AKT) and the common proximal TCR signaling components, explains the observed split effect of lactic acidosis on the CTL functional responses, whereby cytokine production was completely suppressed while lytic granule exocytosis was only partially impaired. Considering

the special role of IFN $\gamma$  in the antitumor response,<sup>20,22</sup> which includes sensitization of tumor cells for CTL attack by MHC class I upregulation on tumor cells, activation of resident macrophages and destruction of tumor vessels, the loss of IFN $\gamma$  secretion is particularly detrimental to sustaining the antitumor pursuit.

Currently, with the obtained results, the partial inhibition of lytic granule exocytosis cannot be explained. No evidence was found that lactic acidosis interferes with MEK1/ERK activation, which is implicated in the regulation of granule exocytosis.<sup>21,24,25,27</sup> Moreover, it appears unlikely that lactic acidosis affects calcium influx, another central component of the exocytosis process, as granule exocytosis was still suppressed when CTLs were stimulated with PMA/I, which provides the calcium. Yet unexplored targets of lactic acidosis could be Vav and downstream GTPases (Rac/Cdc42), which play essential roles in cytoskeletal rearrangements and granule exocytosis.<sup>21,24,25</sup>

It is interesting that lactic acid does not seem to moderate ERK and AKT in CTLs, as it has been reported that acidic milieu and lactate induce phosphorylation and thus activation of these molecules in tumor cells.<sup>13,14</sup> AKT and ERK pathways are positively associated with survival, cell cycle and proliferation. The oppositional, cell type specific, regulation of these pathways by lactic acidosis provides growth support for tumor cells while not transferring this advantage to CTLs which would strengthen their antitumor activity and could ultimately be to the disadvantage of the tumor.

Inhibition of signaling pathways that control CTL effector function by tumor lactic acidosis provides an explanation for the low success rate of ATT, as CTLs, even though selected for high functional capacity, will face effector phase inhibition by lactic acid when entering the tumor milieu. However, the observation that lactic acid inhibition of CTL function is reversible and CTLs recover function when neutralizing the milieu even with the continuous presence of lactate provides venues for therapeutic intervention. Clinically, neutralization of the extracellular tumor milieu may be achieved with oral application of anti-acids or bicarbonate. The latter has been successfully applied in mouse models to change the tumor metabolism, thereby reducing aggressiveness and metastasis.<sup>11,12</sup> Our results now suggest that counteracting tumor acidosis by neutralization could unleash an additional tumor-destructive mechanism by helping maintain CTL activity.

## Acknowledgements

We thank Anna Brandl for her excellent technical support and Barbara Mosetter and Dietmar Hillmann for their expertise concerning the Phosphoprotein Multiplex.

## References

- Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 2009;21:233-40.
- Janicki CN, Jenkinson SR, Williams NA, Morgan DJ. Loss of CTL function among high-avidity tumor-specific CD8+ T cells following tumor infiltration. *Cancer Res* 2008;68:2993-3000.
- Imai N, Ikeda H, Tawara I, Shiku H. Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 2009;39:241-53.
- Blohm U, Roth E, Brommer K, Dumrese T, Rosenthal FM, Pircher H. Lack of effector cell function and altered tetramer

- binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2002;169:5522–30.
5. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, Harlin H. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev* 2006;213:131–45.
  6. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:263–74.
  7. Frankenberger B, Noessner E, Schendel DJ. Immune suppression in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2007;17:330–43.
  8. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891–9.
  9. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 2000;60:916–21.
  10. Warburg O. [On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy]. *Munch Med Wochenschr* 1961;103:2504–6.
  11. Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Dosescu J, Sloane BF, Hashim AI, Morse DL, Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res* 2009;69:2260–8.
  12. Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, Gatenby RA. The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res* 2009;69:2677–84.
  13. Huang WC, Swietach P, Vaughan-Jones RD, Ansorge O, Glitsch MD. Extracellular acidification elicits spatially and temporally distinct Ca<sup>2+</sup> signals. *Curr Biol* 2008;18:781–5.
  14. Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J, Dewhirst M, West M, Chi JT. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS Genet* 2008;4:e1000293.
  15. Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:65–77.
  16. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007;109:3812–9.
  17. Krause M, Schmitz M, Noessner E, Skrablin PS, Wehner R, Rieber EP, Baumann M. Adoptive transfer of cytotoxic T-cells for treatment of residual disease after irradiation. *Int J Radiat Biol* 2007;83:827–36.
  18. Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, Segurado OG. Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol* 1993;151:4209–20.
  19. Leisegang M, Turqueti-Neves A, Engels B, Blankenstein T, Schendel DJ, Uckert W, Noessner E. T-cell receptor gene-modified T cells with shared renal cell carcinoma specificity for adoptive T-cell therapy. *Clin Cancer Res* 2010;16:2333–43.
  20. Hollenbaugh JA, Dutton RW. IFN-gamma regulates donor CD8 T cell expansion, migration, and leads to apoptosis of cells of a solid tumor. *J Immunol* 2006;177:3004–11.
  21. Radoja S, Frey AB, Vukmanovic S. T-cell receptor signaling events triggering granule exocytosis. *Crit Rev Immunol* 2006;26:265–90.
  22. Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J, Rineau V, Baron C, Perreault C. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat Med* 2005;11:1222–9.
  23. Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999;343 Pt 2:281–99.
  24. Huse M. The T-cell-receptor signaling network. *J Cell Sci* 2009;122:1269–73.
  25. de Saint Basile G, Menasche G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol* 2010;10:568–79.
  26. Frey AB, Monu N. Effector-phase tolerance: another mechanism of how cancer escapes antitumor immune response. *J Leukoc Biol* 2006;79:652–62.
  27. Rincon M, Davis RJ. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol Rev* 2009;228:212–24.
  28. Teixeira LK, Fonseca BP, Vieira-de-Abreu A, Barboza BA, Robbs BK, Bozza PT, Viola JP. IFN-gamma production by CD8<sup>+</sup> T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol* 2005;175:5931–9.
  29. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 1997;275:1930–4.

**Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist. Die Arbeit wird erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Frau Prof. Dr. Elfriede Nößner am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrums München betreut und wird von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München vertreten.

München, den 27.02.2012

---

(Anna N. Mandler)