

DISSERTATION

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



INTRATUMORALE T-ZELLEN IN EINEM SPONTANLYMPHOMMODELL DER MAUS: AKTIVIERENDE UND SUPPRIMIERENDE MECHANISMEN

Angefertigt am
Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz-Zentrum München
(Leitung: Prof. Dr. Dolores J. Schendel)
unter der Betreuung von Prof. Dr. Ralph Mocikat

vorgelegt von
Tanja Riedel
München, den 22. August 2013

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter: Herr PD Dr. Josef Mautner

Mitgutachter: Herr Prof. Dr. Heinrich Jung
Herr PD Dr. Daniel Krappmann

Dissertation eingereicht am: 22. August 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2013

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Das Immunsystem	5
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	5
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	6
1.1.2.1 T-Effektorzellen	6
1.1.2.2 Kostimulation und Koinhibition	7
1.1.2.3 Regulatorische T-Zellen.....	8
1.2 Tumormunologie	10
1.2.1 Tumor-Immunität.....	10
1.2.2 Das immunsuppressive Tumormilieu	10
1.3 Spontanlymphommodell	12
1.4 Aufgabenstellung	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien.....	15
2.1.3 Kits	16
2.1.4 Medien und Puffer	16
2.1.5 Mäuse.....	17
2.1.6 Antikörper.....	18
2.1.7 Primer.....	19
2.1.8 Software.....	20
2.2 Methoden	20
2.2.1 Herstellung von Einzelzellsuspension aus Organen.....	20
2.2.2 Maus-Genotypisierungen.....	20

2.2.3	Zelllinien und Zellkulturbedingungen	22
2.2.4	Durchflusszytometrie	23
2.2.5	CD107a-Degranulierungs-Versuch	24
2.2.6	<i>In-vitro</i> -Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-AK.....	25
2.2.7	CFSE-Proliferations-Test	25
2.2.8	MACS-Zell-Separation	25
2.2.9	Kokulturen zur Induktion der Foxp3-Expression.....	26
2.2.10	<i>In-vivo</i> -Versuche	26
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Fehlende Hilfe der angeborenen Immunität und Konsequenzen für T-Zellen in <i>c-MYC</i>-Tumoren	28
3.1.1	Funktionsanalysen der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	28
3.1.2	Rolle der T-Zellen bei der Tumorkontrolle <i>in vivo</i>	31
3.2	Charakterisierung der intratumoralen T-Zellen	34
3.2.1	Regulatorische T-Zellen	34
3.2.2	Aktivierungszustand von Treg, CD4 ⁺ Teff und CD8 ⁺ ZTL	36
3.2.3	T-Zell-Proliferation in <i>c-MYC</i> -Tumoren	39
3.2.4	Immuninhibierende Mechanismen.....	41
3.2.4.1	<i>Expression von IL-10</i>	41
3.2.4.2	<i>Suppressiver Mechanismus der Treg</i>	42
3.2.4.3	<i>Koinhibitorische Moleküle auf T-Zellen</i>	43
3.2.4.4	<i>PD-1- und PD-L1-Expression</i>	43
3.3	Stimulierbarkeit intratumoraler T-Zellen	48
3.3.1	Verminderte Stimulierbarkeit der T-Effektorzellen.....	48
3.3.2	Blockierung koinhibitorischer Signalwege	50
3.4	Therapieansätze <i>in vivo</i>	53
3.4.1	Blockierung von PD-1 und CTLA-4.....	53
3.4.1.1	<i>Verbessertes Überleben durch anti-PD-1/anti-CTLA-4-Therapie</i>	53
3.4.1.2	<i>Treg nach anti-PD-1/anti-CTLA-4-Therapie</i>	54
3.4.2	Treg-Depletion in Dereg/ <i>c-MYC</i> -Mäusen	54

4	<i>DISKUSSION</i>	58
4.1	Intratumorale T-Zellen übernehmen keine Immun-überwachende Funktion	58
4.2	Charakterisierung der intratumoralen regulatorischen T-Zellen	59
4.3	T-Zell-Erschöpfung durch chronische Stimulation	62
4.4	PD-1/CTLA-4-Blockade reaktiviert erschöpfte T-Zellen	65
4.5	Treg-Depletion	66
4.6	Tumor-Immuntherapien in der Klinik	67
4.7	Zukünftige Fragestellungen	68
5	<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	70
6	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	72
7	<i>ANHANG</i>	80
	Danksagung	80

ZUSAMMENFASSUNG

Es gibt zahlreiche Bemühungen, neue Immuntherapien zur Behandlung von malignen Tumoren zu entwickeln, da die Prognose vieler Krebserkrankungen immer noch schlecht ist. Dazu muss das Verständnis, wie die verschiedenen Immunzellen innerhalb des Tumormilieus miteinander interagieren, verbessert werden. Mausmodelle für Spontantumoren spiegeln die klinische Situation besser wider als transplantierbare Tumoren und stellen somit eine gute Möglichkeit dar, die während der Tumorentwicklung stattfindenden Immunreaktionen zu analysieren.

In der vorliegenden Dissertation wurde mit Mäusen gearbeitet, in deren B-Zellen das Onkogen *c-MYC* konstitutiv exprimiert wird und die nach einigen Wochen spontan B-Zell-Lymphome entwickeln. Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aus *c-MYC*-Tumoren im Vergleich zu Organen aus Wildtyp (wt)-Mäusen kaum Interferon-gamma (IFN- γ) produzierten und die Fähigkeit, Zielzellen zu töten, stark reduziert war. Dementsprechend sezernierten Tumor-infiltrierende dendritische Zellen (TIDZ) geringere Mengen Interleukin-12 (IL-12), das für die Induktion einer Th1 (T-Helferzelle 1) / ZTL (zytotoxischer T-Lymphozyt)-Antwort essenziell ist, aber vermehrt das immuninhibierende Zytokin IL-10. Für die Aktivierung von naiven T-Zellen ist die Hilfe von NK-Zellen und DZ notwendig, die in *c-MYC*-Mäusen offenbar nicht gegeben war. Es wurde daher erwartet, dass intratumorale T-Zellen nicht bzw. nur ungenügend aktiviert werden.

Überraschenderweise wiesen Tumor-infiltrierende T-Zellen jedoch einen aktivierten Phänotyp auf, zeigten zum Teil sogar eine erhöhte IFN- γ -Produktion, konnten degranulieren und proliferierten *in vivo*. Trotzdem übernahmen intratumorale T-Zellen im Gegensatz zu NK-Zellen keine immunüberwachende Funktion über die Lymphomentstehung, da *c-MYC*-Mäuse nach Depletion der T-Zell-Population nicht früher erkrankten als unbehandelte Tiere.

Offenbar wurden T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren Antigen-spezifisch aktiviert, was dazu führte, dass sie aufgrund der langanhaltenden Stimulation in einen Erschöpfungszustand geraten sind. Dies spiegelte sich in einer hohen Expression des Erschöpfungsmarkers PD-1 (Programmed Cell Death 1) wider. Die Interaktion des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 mit dem entsprechenden Liganden PD-L1, der vor allem auf DZ in *c-MYC*-Tumoren detektiert wurde, führt in T-Effektorzellen zur Inhibierung des aktivierenden T-Zell-Rezeptor (TZR)-Signals. So konnten T-Zellen aus *c-MYC*-Tumoren im Vergleich zu T-Zellen aus normalen Mäusen *in vitro* über den TZR tatsächlich nicht mehr stimuliert werden, was ebenfalls für eine Erschöpfung sprach. Zudem exprimierten intratumorale T-Zellen neben PD-1 die koinhibitorischen Moleküle CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4) und LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3). Die Stimulierbarkeit der T-Zellen *in vitro* konnte durch Zugabe

blockierender Antikörper (AK) gegen PD-1 und CTLA-4 verbessert werden. Aufgrund dieser Beobachtung wurden junge, noch gesunde *c-MYC*-Mäuse mit diesen AK behandelt. Durch die PD-1/CTLA-4-Blockade *in vivo* zeigten die Tiere ein signifikant verlängertes Überleben.

Neben CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten wurde in *c-MYC*-Tumoren innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation ein sehr hoher Anteil Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen (Treg) detektiert. Diese waren aktiviert, proliferierten *in vivo* und produzierten IL-10. Die koinhibitorischen Moleküle, welche auch auf erschöpften T-Zellen zu finden waren (PD-1, LAG-3 und CTLA-4), wurden ebenfalls von Treg exprimiert, was bekanntlich zur Verstärkung ihrer suppressiven Aktivität führt. Es wurden vor allem Helios-exprimierende natürliche Treg (nTreg) detektiert. Doch auch IL-10-produzierende, regulatorische Foxp3⁺ Tr1-Zellen (T Regulatory Type 1 Zelle), die zu den induzierten Treg (iTreg) zählen, waren in *c-MYC*-Tumoren zu finden. Schließlich fanden sich auch T-Zellen, die sowohl IFN- γ als auch IL-10 produzierten. Diese könnten aus Th1-Zellen entstanden sein, welche die Zytokinexpression umgestellt haben.

Treg unterdrückten in *c-MYC*-Tieren anscheinend eine effektive Antitumor-Immunantwort. Daher wurden Foxp3⁺ Treg in DEREK/*c-MYC*-Mäusen, die einen transgenen Diphtherietoxin (DT)-Rezeptor tragen, spezifisch durch DT-Injektionen *in vivo* depletiert. Erstmals wurde der DEREK-Mechanismus zur Treg-Depletion in einem endogenen Tumormodell angewandt. Die Depletion der Foxp3⁺ Treg verschaffte den DEREK/*c-MYC*-Mäusen einen leichten Überlebensvorteil.

Diese Ergebnisse sind relevant für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Verfahren zur Behandlung maligner Erkrankungen in der Klinik.

ABSTRACT

The prognosis for many cancers is still poor. Therefore, much effort is made to develop new strategies for immunotherapy targeting malignant tumours. For this purpose, the understanding of how immune cells in tumour microenvironments interact with each other has to be improved. Mouse models of spontaneously arising tumours reflect the clinical situation better than transplantable tumours. So, these models provide a good tool for analysing the occurring immune reactions.

In the present work mice that constitutively express the oncogene *c-MYC* in their B cells and that develop B-cell lymphomas after a few weeks served as a tumour model. Former work has already demonstrated that natural killer (NK) cells derived from *c-MYC* tumours rarely produced interferon-gamma (IFN- γ) compared to NK cells from wildtype (wt) mice and showed strongly diminished killing of target cells. Accordingly, tumour-infiltrating dendritic cells (TIDC) only secreted low levels of interleukin-12 (IL-12) required for the induction of a Th1 (T-helper cell 1) / CTL (cytotoxic T lymphocyte)-response. Instead, TIDC increased the production of the immunosuppressing cytokine IL-10. A proper NK-cell and DC help that was obviously missing in *c-MYC* mice is required for activating naïve T cells. Hence, it was expected that intratumoural T cells are not or only insufficiently activated.

Surprisingly, tumour infiltrating T cells exhibited an activated phenotype, partly even showed an increased IFN- γ production, could degranulate and proliferated *in vivo*. However, in contrast to NK cells, intratumoural T cells did not exert a tumour-protective function during lymphoma formation, since *c-MYC* mice did not develop lymphomas earlier after T-cell depletion.

T cells in *c-MYC* tumours were activated through their specific antigen. However, due to prolonged stimulation, T cells got into an exhausted state. This was reflected by high expression of the exhaustion marker PD-1. The interaction of the coinhibitory receptor PD-1 (Programmed Cell Death 1) with the corresponding ligand PD-L1, which was detected mainly on DC in *c-MYC* tumours, leads to the inhibition of the activating T-cell receptor (TCR) signal in T-effector cells. Thus, in contrast to wt-T cells, T cells derived from *c-MYC* tumours could not be stimulated *in vitro* through the TCR. This also argued for T-cell exhaustion. In addition to PD-1, intratumoural T cells also expressed the coinhibitory molecules CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4) and LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3). T-cell stimulation *in vitro* could be improved through the addition of blocking antibodies (Ab) targeting PD-1 and CTLA-4. Based on this observation *c-MYC* mice that

did not yet show clinical signs of tumour growth were treated with these Abs. As a result of the PD-1/CTLA-4 blockade, animals showed a significantly longer survival.

Besides CD4⁺ T-helper cells and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes an augmented fraction of Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) within the CD4⁺ T-cell population was detected in tumour-bearing *c-MYC* animals. These cells were activated, proliferated *in vivo* and produced IL-10. The coinhibitory molecules that were found on exhausted T cells (PD-1, LAG-3 and CTLA-4) were also expressed on Treg. It is known that this increases the suppressive activity of Treg. Mainly Helios expressing natural Treg (nTreg) were detected. However, IL-10 producing regulatory Foxp3⁺ Tr1 (T Regulatory Type 1) cells that belong to the induced Treg population (iTreg) were also found in *c-MYC* tumours. Finally, T cells producing IFN- γ as well as IL-10 were detected. These could originate from Th1 cells that switched their cytokine expression.

Treg in *c-MYC* tumours apparently suppress an effective anti-tumour immune response. Therefore, Foxp3⁺ Treg were specifically depleted *in vivo* in DEREK/*c-MYC* mice carrying a transgenic diphtheria-toxin (DT) receptor by the injection of DT. For the first time, this DEREK mechanism is utilised in an endogenous tumour model. The depletion of Foxp3⁺ Treg provided a survival benefit for the DEREK/*c-MYC* mice.

These results are relevant for the development of new immunotherapeutic approaches for treating malignant disease in the clinic.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper vor eindringenden Krankheitserregern wie Mikroorganismen oder Viren. Um körperfremde Zellen zu erkennen und zu bekämpfen, bedient es sich eines komplexen Systems aus Organen, Zellen und löslichen Faktoren. Diese werden aber erst dann aktiv, wenn Pathogene oder auch toxische Stoffe die physikalischen, chemischen und mikrobiellen Barrieren überwunden haben und in den Körper gelangen. Generell existieren zwei Gruppen des Immunsystems, die eng zusammenarbeiten. Das angeborene Immunsystem, welches als der phylogenetisch ältere Teil gilt und bereits in einfachen Organismen vorkommt, reagiert schnell, aber unspezifisch auf potenziell gefährliche Eindringlinge. Bei der erworbenen oder adaptiven Immunität werden Erreger dagegen durch eine Antigen-spezifische Immunantwort vernichtet und zusätzlich wird ein immunologisches Gedächtnis aufgebaut. Allerdings dauert die Entstehung einer effektiven adaptiven Immunantwort deutlich länger als die Reaktion des angeborenen Immunsystems. (Medzhitov und Janeway 2000; Parkin und Cohen 2001; Murphy et al. 2009).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zu den Kompartimenten der angeborenen Immunität gehören das Komplementsystem, sowie verschiedene Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (DZ) und NK-Zellen. Diese Zellen erkennen über Mustererkennungsrezeptoren („Pattern Recognition Receptors“ = PRR) auf ihrer Zelloberfläche fremde Strukturen, die nur von Mikroorganismen exprimiert werden, beispielsweise Lipopolysaccharide oder bakterielle DNS. Dringen Pathogene in den Organismus ein, werden sie von Makrophagen als fremd erkannt und phagozytiert. Daraufhin sezernieren Makrophagen Zytokine und Chemokine und lösen einen Entzündungsprozess aus. Weitere Zellen des Immunsystems werden so aus dem Blutkreislauf zum Entzündungsort gelockt und aktiviert. Rekrutierte neutrophile Granulozyten und unreife DZ töten Bakterien über Phagozytose ab. Die Hauptfunktion der DZ ist aber weniger das Eliminieren von Pathogenen, als vielmehr die Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität. Nach Aufnahme von Mikroorganismen oder deren Bestandteile reifen DZ und präsentieren antigene Peptide der aufgenommenen Pathogene auf ihrer Oberfläche, welche von T-Lymphozyten, die zum adaptiven Immunsystem zählen, erkannt werden.

NK-Zellen erkennen körperfremde oder virusinfizierte Zellen und Tumorzellen an deren „fehlenden Selbst“. Körpereigene gesunde Zellen tragen Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC), welche von NK-Zellen erkannt werden, so dass die NK-Zellen inaktiv bleiben. Verlieren infizierte Körperzellen oder auch entartete Tumorzellen ihre MHC-Moleküle, werden NK-Zellen aktiviert. Die Zielzellen werden sodann durch Ausschüttung von Perforin und Granzymen vernichtet. Zusätzlich sezernieren NK-Zellen in großen Mengen das wichtige Signalmolekül IFN- γ , welches weitere Makrophagen stimuliert und aktivierte CD4⁺ T-Zellen dazu veranlasst, zu inflammatorischen Th1-Zellen zu differenzieren. (Parkin und Cohen 2001; Gustafsson et al. 2008; Murphy et al. 2009)

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist mit der angeborenen Immunität verzahnt, benötigt für die Aktivierung jedoch mehr Zeit. Die erworbene Immunität wird u.a. durch das Zytokinmilieu, welches von den Zellen der angeborenen Immunantwort aufgebaut wurde, stimuliert. B- und T-Lymphozyten erkennen spezifische Antigene über deren B-Zell- bzw. T-Zell-Rezeptoren (BZR bzw. TZR). Dieser Vorgang findet in lymphoiden Geweben statt und wird als Priming bezeichnet, worauf die Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten folgt. B-Zellen reifen zu Plasmazellen heran und sezernieren AK, welche dieselbe Antigenspezifität aufweisen wie der BZR. Das riesige Repertoire an spezifischen Antigenrezeptoren auf B- und T-Lymphozyten entsteht durch Umlagerung von Genen und klonale Selektion. (Parkin und Cohen 2001; Murphy et al. 2009)

1.1.2.1 *T-Effektorzellen*

Vorläuferzellen der T-Lymphozyten entstehen wie alle Immunzellen im Knochenmark und wandern in den Thymus ein, wo sie ausreifen. Anschließend entwickeln sich T-Zellen in zwei Hauptklassen, in ZTL, die das Oberflächenprotein CD8 exprimieren, und in Th-Zellen mit dem Marker CD4 auf deren Oberfläche. Diese reifen naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verlassen sodann den Thymus und zirkulieren solange im Blut, in der Lymphflüssigkeit und in den lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz), bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Anders als B-Zellen, welche Antigene auch in freier Form erkennen, bindet der Antigenrezeptor der T-Zellen ausschließlich an spezifische Peptide, die von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) über MHC-Moleküle auf deren Zelloberfläche präsentiert werden. Zu den APZ zählen dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen (Parkin und Cohen 2001; Driessens et al. 2009; Murphy et al. 2009).

MHC-Moleküle werden in Klasse I und II eingeteilt. Zellen, die von einem Pathogen infiziert wurden, präsentieren Peptide des Krankheitserregers über MHC-Klasse-I-Moleküle, welche zytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktivieren. Infizierte Körperzellen werden anschließend von den stimulierten ZTL getötet, indem CD8⁺ ZTL Perforin und Granzyme in den Extrazellularraum zwischen Effektor- und Zielzelle freisetzen. Zusätzlich sezernieren aktivierte ZTL IFN- γ , um andere Immunzellen zu stimulieren. Werden antigene Peptide dagegen an MHC-II-Moleküle gebunden, werden sie von CD4⁺ T-Zellen erkannt, die dann zu unterschiedlichen T-Helferzellen differenzieren. Welcher Th-Zell-Typ sich entwickelt, ist abhängig von den Zytokinen in der unmittelbaren Umgebung. Die Entstehung von Th1-Zellen wird durch IL-12 induziert. Durch die Produktion von IFN- γ aktivieren Th1-Zellen APZ, welche wiederum vermehrt IL-12 produzieren. Th1-Zellen sezernieren zudem IL-2, was die Proliferation von T-Zellen im Allgemeinen fördert. Eine Th1-Zell-vermittelte Immunantwort bekämpft vor allem Infektionen mit intrazellulären Bakterien oder Viren. Das von Th1-Zellen produzierte IFN- γ hemmt gleichzeitig die Polarisierung zu Th2-Zellen. Letztere werden durch IL-4 induziert. Durch die eigene IL-4-Produktion der Th2-Zellen entsteht eine positive Rückkopplung, und naive B-Zellen werden aktiviert. Somit induzieren Th2-Zellen eine humorale Immunantwort und spielen bei Allergien eine große Rolle (Parkin und Cohen 2001; Murphy et al. 2009).

1.1.2.2 *Kostimulation und Koinhibition*

Um naive T-Zellen zu aktivieren und eine effektive T-Zell-Antwort hervorzurufen, ist die Interaktion des TZR mit dem MHC-Peptid-Komplex alleine jedoch nicht ausreichend. Zusätzlich müssen APZ kostimulierende Moleküle exprimieren, die an Rezeptoren auf T-Zellen binden. Fehlt diese Kostimulation, fallen T-Zellen in einen Zustand fehlender Reaktivität, der als Anergie bezeichnet wird, oder sterben (Parkin und Cohen 2001; Driessens et al. 2009; Crespo et al. 2013). Die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle auf APZ sind CD80 und CD86 (= B7-Moleküle B7.1 und B7.2) und CD40, die an CD28 bzw. CD40L auf T-Zellen binden. CTLA-4 bindet wie CD28 an CD80/86, allerdings mit deutlich höherer Bindungsaffinität. Anders als CD28 sendet CTLA-4 jedoch ein inhibierendes Signal, was zu Inaktivierung und verringerter Proliferation und Zytokin-Produktion der T-Zelle führt. Eine ähnliche koinhibierende Wirkung besitzt der Rezeptor PD-1 auf T-Zellen, der an PD-L1 und PD-L2 auf APZ bindet und das aktivierende TZR-Signal an die T-Zelle unterdrückt. PD-1 kann auch von NK- und B-Zellen exprimiert werden, so dass auch die Aktivität dieser Zellen nach Bindung an PD-L1 oder PD-L2 negativ beeinflusst wird. Weitere koinhibitorische Rezeptoren auf T-Zellen sind u.a. LAG-3, das mit größerer Affinität als das CD4-Molekül an MHC-Klasse-II bindet, und TIM-3 (T-Cell Membrane protein 3), das mit Galectin 9 interagiert.

T-Zellen exprimieren nach Aktivierung koinhibitorische Moleküle, um so Immunantworten nach Infektionen wieder zu stoppen und/oder um Autoimmunreaktionen zu verhindern. (Seliger et al. 2008; Driessens et al. 2009; Pardoll 2012; Greaves und Gribben 2013)

1.1.2.3 Regulatorische T-Zellen

Neben Th1- und Th2-Zellen, deren Aufgabe es ist, andere Immunzellen zu aktivieren, gehen aus der CD4⁺ T-Zelllinie auch regulatorische T-Zellen hervor. Die Funktion der Treg ist es, Immunantworten zu unterdrücken, beispielsweise nach Erkennung körpereigener Antigene oder von Peptiden kommensaler Mikroorganismen. So wird gewährleistet, dass autoreaktive T-Zellen, die trotz klonaler Depletion den Thymus verlassen, in ihrer Funktion reguliert werden und Autoimmunität verhindert wird.

Bereits 1972 war in der Veröffentlichung von Gershon et al. von „Suppressor-T-Zellen“ die Rede. Sakaguchi und Kollegen charakterisierten schließlich 1995 CD4⁺ CD25⁺ Treg, die Autoimmunität verhinderten. Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des IL-2-Rezeptors (Banerjee et al. 2013). Allerdings wurde schnell klar, dass CD25 zu einem geringen Teil auch von T-Effektorzellen nach deren Aktivierung exprimiert wird und nicht als eindeutiger Marker für regulatorische T-Zellen einsetzbar ist (Lahl et al. 2007; Josefowicz et al. 2012). Später wurde der Transkriptionsfaktor Foxp3 (Forkhead box protein 3), ein Mitglied der forkhead/winged-Helix-Familie, als wichtigster Regulator der Treg-Entwicklung und -Funktion identifiziert und gilt seitdem als der Treg-Marker schlechthin (Fontenot et al. 2003; Banham 2006; Sakaguchi, S. et al. 2008; Oleinika et al. 2012).

Treg machen etwa 10 % der CD4⁺ T-Zellpopulation aus (Nishikawa und Sakaguchi 2010; Oleinika et al. 2012) und werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: nTreg entstehen im Thymus, wo hoch-affine Bindungen über den Treg-TZR an Antigen/MHC-II-Komplexe stattfinden. nTreg zeigen eine stabile Foxp3-Expression und eine hohe Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CTLA-4. Sie stellen die „klassischen Treg“ dar.

Zur zweiten Gruppe zählen adaptive oder induzierte Treg (iTreg). Diese entwickeln sich unter bestimmten Umständen außerhalb des Thymus nach TZR-vermittelter Stimulation aus naiven Foxp3⁻ CD4⁺ T-Zellen (Banham 2006; Häringer et al. 2009; Byrne et al. 2011; Gabryšová et al. 2011; Banerjee et al. 2013; Savage et al. 2013; Vogel et al. 2013). Anhand des Transkriptionsfaktors Helios, der zur Ikaros-Familie zählt und nur in nTreg vorkommt, können iTreg von nTreg unterschieden werden (Thornton et al. 2010; Oleinika et al. 2012). Verschiedene Signalmoleküle können die Entwicklung zu

iTreg induzieren, beispielsweise TGF- β (Tumour Growth Factor beta), IL-10 oder Retinsäure (Lindau et al. 2013; Savage et al. 2013). Die Gruppe der iTreg ist allerdings sehr heterogen und wird auch in der Literatur teilweise unterschiedlich definiert. Neben Foxp3⁺ nTreg-ähnlichen iTreg enthält diese Gruppe nämlich auch Foxp3-negative suppressive T-Zellen, die entweder als „Treg“ oder auch als regulatorische Th1-Zellen bezeichnet werden. Zu den Foxp3⁻ Treg zählen Tr1-Zellen, die das immuninhibierende Zytokin IL-10 produzieren, und Th3-Zellen, die über die Produktion von TGF- β charakterisiert werden (Han et al. 2009; Häringer et al. 2009; Cope et al. 2011).

Treg inhibieren Immunantworten über verschiedene Mechanismen. Durch lösliche Faktoren wie IL-10 und TGF- β werden einerseits Immunreaktionen, wie beispielsweise Th1-Antworten, unterdrückt, andererseits wird die Entwicklung von neuen iTreg begünstigt. Neben T-Effektorzellen (Teff) werden auch NK-Zellen durch Treg in ihrer Funktion gehemmt. NK-Zellen benötigen IL-2, welches von Th1-Zellen produziert wird, für die Aktivierung und die zytotoxische Funktion. Für Teff ist IL-2 essenziell für deren Überleben und Proliferation. Da Treg meist eine hohe Expression des IL-2-Rezeptors, also CD25, aufweisen, entziehen sie den NK-Zellen und Teff das benötigte IL-2, so dass diese supprimiert werden (Sakaguchi, S. et al. 2008; Josefowicz et al. 2012; Kerdiles et al. 2013). Zellmembranständiges TGF- β erzeugt ebenso eine Inhibierung der Immunzellen. Über Zell-Zell-Kontakt können Treg die Kostimulation von Teff durch DZ verhindern. CTLA-4 auf Treg bindet hoch-affin an CD80/86 auf DZ und besetzt so die Bindungsstelle für das kostimulierende Molekül CD28. Ein korrektes Priming von Teff kann somit nicht stattfinden. Neben CTLA-4 exprimieren Treg weitere koinhibitorische Moleküle auf ihrer Oberfläche, wie zum Beispiel PD-1, LAG-3 und TIM-3. Anders als bei Teff, die durch solche Signalwege in ihrer Funktion gehemmt werden, erhöhen diese Moleküle suppressive Aktivität, Proliferation und Überleben der Treg. So wurde gezeigt, dass PD-1-negative Treg eine schwächere T-Zell-Suppression aufweisen als PD-1⁺ Treg (Driessens et al. 2009; Josefowicz et al. 2012; Pardoll 2012; Banerjee et al. 2013; Greaves und Gribben 2013).

1.2 Tumorimmunologie

1.2.1 Tumor-Immuneditierung

Dass das Immunsystem nicht nur fremde, krankheitserregende Mikroorganismen, sondern auch körpereigene, entartete Tumorzellen erkennen und beseitigen kann, wurde bereits 1909 von Paul Ehrlich postuliert und später durch Burnet (1957) und Thomas (1959) durch deren Theorie der Tumor-Immunüberwachung erweitert (Dunn et al. 2002; Schreiber et al. 2011; Vesely et al. 2011). Da es im gesunden Organismus jedoch nicht nur zur Tumorabstoßung, sondern auch zu Tumorentstehung kommt, charakterisierten Dunn und Kollegen 2002 eine passendere These, die als Tumor-Immuneditierung bezeichnet wird. Die Immuneditierung wird in drei Phasen eingeteilt: „Eliminierung, Equilibrium und Evasion“. Die Eliminierungsphase, in der erste Tumorzellen von Immunzellen erkannt und vernichtet werden, entspricht der ursprünglichen Theorie der Immunüberwachung. Die Tumorerkrankung bricht in der Gleichgewichtsphase zwar nicht aus, allerdings entwickeln restliche Tumorzellen durch Mutationen Überlebensstrategien, um dem Angriff des Immunsystems zu entgehen. Dabei gilt das Darwinsche Gesetz „survival of the fittest“. In der letzten Phase können Tumorzellen durch das Immunsystem nicht mehr erkannt werden und werden klinisch als Krebserkrankung sichtbar (Dunn et al. 2002; Schreiber et al. 2011; Vesely et al. 2011).

1.2.2 Das immunsuppressive Tumormilieu

Tumorzellen entwickeln eine Vielzahl von Abwehrmechanismen, um den Angriff der angeborenen und erworbenen Immunität zu umgehen. Dabei bedienen sie sich Strategien, die auch in gesunden Zellen vorkommen, und deren eigentliche Aufgabe es ist, Autoimmunität oder übermäßige Immunreaktionen einzudämmen. So entstehen Toleranz und Inhibierung der Antitumor-Immunität. Bereits die Erkennung durch Immunzellen wird von den Tumorzellen unterdrückt. Die Expression von MHC-Molekülen und Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) wird so weit minimiert, dass T-Zellen die entarteten Zellen nicht erkennen und somit nicht aktiviert werden (Byrne et al. 2011; Lindau et al. 2013). Erfolgt trotzdem eine Aktivierung der Immunzellen, bewirkt die Sekretion immunsupprimierender Zytokine wie IL-10 und TGF- β durch Krebszellen die Unterdrückung der DZ-Reifung und der NK- und T-Zell-Funktionen (Wherry 2011; Banerjee et al. 2013). Tumor-infiltrierende T-Zellen werden durch das Tumormilieu in einen Zustand der Inaktivität gedrängt. Wenn die Expression kostimulierender Moleküle wie CD80/86 verringert wird und dagegen vermehrt

inhibierende Liganden (PD-L1, PD-L2, etc.) auftreten, wird anstelle der Aktivierung der T-Zellen Anergie induziert. Anergie T-Zellen sind inaktiv, produzieren wenig IL-2 und zeigen keine Proliferation (Pardoll 2012; Crespo et al. 2013).

Anders als anerge T-Zellen entstehen erschöpfte T-Zellen aus T-Effektorzellen, die durch chronischen Antigen-Kontakt in Bereichen chronischer Infektion (bei Tumoren, aber auch bei Autoimmunität und chronischen Viruserkrankungen) ständig spezifisch aktiviert werden. Erschöpfte T-Zellen werden einerseits anhand ihrer verringerten Zytokin-Produktion, ihres Verlusts der Effektorfunktion und ihrer verringerten Reaktivität beschrieben, andererseits ist die Expression verschiedener koinhibierender Rezeptoren charakteristisch. PD-1 gilt als der bekannteste Erschöpfungsmarker, der graduell mit Fortschreiten des Erschöpfungszustandes verstärkt von T-Zellen exprimiert wird. Ein manifester Erschöpfungszustand kann auch durch die Koexpression von PD-1 mit anderen koinhibierenden Rezeptoren wie LAG-3, TIM-3 oder CTLA-4 charakterisiert werden (Wherry 2011; Pardoll 2012; Crespo et al. 2013).

PD-1 führt nur zu einer negativen T-Zell-Regulation, wenn entsprechende Liganden vorhanden sind. Die Expression von PD-L1 auf infiltrierenden DZ und auf Tumorzellen selbst wird durch das Tumormilieu und durch IFN- γ , das von aktivierten NK-Zellen und Th1-Zellen stammt, induziert. IFN- γ wird demnach als negativer Rückkopplungsmechanismus durch den Tumor missbraucht, was zu peripherer Toleranz führt (Pardoll 2012; Banerjee et al. 2013; Greaves und Gribben 2013).

Eine starke Inhibierung des Immunsystems in Tumoren erfolgt durch Tumor-infiltrierende Treg, die in Abschnitt 1.1.2.3 bereits genauer charakterisiert wurden. Die suppressive Treg-Aktivität ist Dosis-abhängig, wobei es folgende Theorien zur Treg-Infiltration in Tumoren gibt:

- Aktives Einwandern von bereits vorhandenen nTreg, die körpereigene Antigene erkennen. Durch die Sekretion des Chemokins CCL22 rekrutiert der Tumor vornehmlich Treg, die im Vergleich zu T-Effektorzellen eine höhere Expression der entsprechenden Rezeptoren CCR4 und CCR8 aufweisen. Eine alternative Ligand/Rezeptor-Interaktion stellen CCL28/CCR10 dar.
- Proliferation der Treg *in situ*. Intratumorale T-Effektorzellen fördern aufgrund des produzierten IL-2 die Proliferation von Treg.
- *De-novo*-Differenzierung von iTreg aus naiven, TAA-spezifischen Foxp3⁻ CD4⁺ T-Zellen. Das Tumormilieu begünstigt die iTreg-Entstehung beispielsweise über IL-10, TGF- β oder unreife DZ.

Tumor-infiltrierende Treg zeigen zudem eine hohe Expression koinhibierender Rezeptoren (PD-1, CTLA-4, LAG-3), was deren suppressive Aktivität zusätzlich verstärkt (Byrne et al. 2011; Oleinika et al. 2012; Lindau et al. 2013; Savage et al. 2013).

Durch Anergie, Erschöpfung und Treg-Infiltration wird eine anhaltende T-Zell-Immunität beeinträchtigt und der Ausbruch der Krebserkrankung ermöglicht.

1.3 Spontanlymphommodell

Für die Entwicklung neuer Therapien ist es nötig, den Prozess der Immuneditierung weiter zu erforschen und das Zusammenspiel von Tumorzellen und Immunsystem zu verstehen. Dazu wurde früher vor allem mit transplantierbaren Tumor-Mausmodellen gearbeitet. Hierbei werden gesunden Tieren bereits entartete, transformierte Tumorzellen appliziert, welche im Körper nach einer gewissen Zeit anwachsen. Dies spiegelt jedoch nicht die klinische Situation wider. Krebserkrankungen im Menschen entwickeln sich aus einer entarteten Zelle, die durch Mutationen den Immunangriff umgeht und aus der langsam ein Tumor entsteht. Mit transgenen Spontantumormausmodellen, bei denen ein transgenes Onkogen in das Erbgut der Maus eingeschleust wurde, lassen sich hingegen präzisere Aussagen über die Mechanismen treffen, die zum Entkommen des Tumors und zum Ausbruch einer Krebserkrankung führen. Spontantumoren in der Maus ähneln somit dem klinischen Bild im Menschen, sowohl in Bezug auf Entstehung, als auch auf Symptomatik.

Für die vorliegende Arbeit wurden transgene Mäuse verwendet, die das humane Onkogen *c-MYC* unter der Regulation des B-Zell-spezifischen $Ig\lambda$ -Enhancers exprimieren (Kovalchuk et al. 2000). *c-MYC*-Mäuse entwickeln nach etwa 14 Wochen spontan B-Zell-Lymphome, was sich in stark vergrößerten Lymphknoten (LK) und einer vergrößerten Milz zeigt (Abbildung 1). Die Erkrankung ist dem humanen Burkitt-Lymphom ähnlich, welches zu den malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zählt (Harris et al. 1999).

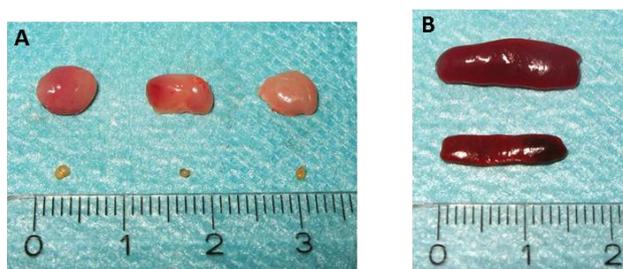


Abbildung 1: Vergrößerte LK (A) und Milz (B) aus einer kranken *c-MYC*-Maus (oben) im Vergleich zu einer wt-Maus (unten).

1.4 Aufgabenstellung

Frühere Arbeiten anhand von transplantierten Tumoren haben gezeigt, dass durch die Interaktion von aktivierten NK-Zellen und DZ eine ZTL-vermittelte Lyse der Tumorzellen induziert wird. Zusätzlich wird ein immunologisches Gedächtnis aufgebaut (Mocikat et al. 2003; Adam et al. 2005). Die injizierten Tumorzellen exprimierten vermindert MHC-Klasse-I auf ihrer Oberfläche, was zur Aktivierung der NK-Zellen führte. Diese aktivierten wiederum DZ. Über die Ausschüttung von IFN- γ durch NK-Zellen und IL-12 durch DZ wurde unabhängig von T-Helferzellen eine ZTL-Antwort induziert, so dass der Tumor vernichtet werden konnte.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde das *c-MYC*-Mausmodell (siehe Abschnitt 1.3) herangezogen, welches die klinische Situation von B-Zell-Lymphomen besser widerspiegelt als Transplantationsmodelle. Es wurde bereits beobachtet, dass NK-Zellen anders als in transplantierten Tumoren in den endogen entstandenen *c-MYC*-Tumoren zwar einen aktivierten Phänotyp aufwiesen, funktionell jedoch stark beeinträchtigt waren. NK-Zellen aus erkrankten Tieren zeigten den fast vollständigen Verlust der IFN- γ -Produktion und der zytotoxischen Fähigkeit (Brenner et al. 2010). Auch Tumor-infiltrierende DZ wurden in *c-MYC*-Mäusen aktiviert, konnten aber aufgrund unzureichender IL-12-Produktion und erhöhter Expression des immunsuppressiven Zytokins IL-10 keine Th1-Antwort, die für die erfolgreiche Tumor-Bekämpfung notwendig wäre (Egeter et al. 2000; Ziegler et al. 2009), hervorrufen. Zudem war die Fähigkeit der DZ, T-Zellen zu stimulieren, insgesamt stark vermindert (Naujoks et al., Manuskript eingereicht; Naujoks 2012).

Das Thema dieser Arbeit ist die Rolle der T-Zellen im *c-MYC*-Modell. Es wurde erwartet, dass intratumorale T-Zellen nicht adäquat stimuliert werden, da die Hilfe von NK-Zellen und DZ fehlt und somit keine effektive Th1/ZTL-Antwort aufgebaut werden kann. Daher sollte der phänotypische Aktivierungszustand und die Zytokinproduktion verschiedener T-Zell-Subpopulationen charakterisiert werden. Wie in Abschnitt 1.2.2 genauer beschrieben ist, kann es im Tumormilieu zu Anergie oder Erschöpfung der T-Zellen kommen. Demnach sollte überprüft werden, ob auch T-Zellen aus *c-MYC*-Tumoren charakteristische koinhibitorische Rezeptoren exprimieren und Zeichen der Erschöpfung aufweisen. In früheren Arbeiten wurde bereits ein hoher Anteil an Foxp3⁺ Treg in *c-MYC*-Tumoren nachgewiesen (Brenner 2009), die nun weiter untersucht werden sollten. Auf Grundlage der unter Abschnitt 1.2.2 beschriebenen Immunevasionsmechanismen sollte schließlich untersucht werden, ob durch das Eingreifen in diese Mechanismen der Zeitpunkt der Lymphom-Entstehung in *c-MYC*-Mäusen hinausgezögert werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflussszytometer LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten 5/10/25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmalzählkammer C-Chip	Peqlab, Erlangen
FACS-Röhrchen, klein	Greiner bio-one, Frickenhausen
Heizblock DRI-Block DB2A	Techne, Cambridge, UK
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Heidelberg
Light-Cycler™ (Gerät und Kapillaren)	Roche, Mannheim
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrlochplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Pipetten Eppendorf/Gilson	Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg
Pipettenspitzen Gilson/Greiner	Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg
Plattenzentrifuge Labofuge 400	Heraeus Instruments, Hanau
Reaktionsgefäße 1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15/20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Air liquid, Düsseldorf
Thermocycler, TGradient 48	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellsiebe	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge, biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau

Zentrifuge, Megafuge 1.0R

Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Ammoniumchlorid

Merck, Darmstadt

Brefeldin A

eBioscience, Frankfurt

1-Brom-3-Chlor-Propan

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

CFSE

Invitrogen, Carlsbad (USA)

Diphtherietoxin
(unnicked, *Corynebacterium diphtheriae*)

EMD Chemicals, San Diego (USA)

DirectPCR® Lysis Reagent (Tail)

peqLab, Erlangen

DMSO

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

dNTP

Invitrogen, Carlsbad (USA)

EDTA

Merck, Darmstadt

FKS

Invitrogen, Karlsruhe

Foxp3 Staining Buffer Set

eBioscience, San Diego (USA)

Ionomycin (Calcium-Salz)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

IC Fixation Buffer

eBioscience, Frankfurt

Isopropanol

Carl Roth, Karlsruhe

Kaliumhydrogencarbonat

Merck, Darmstadt

Live/Dead® Fixable Blue-Lösung

Invitrogen, Carlsbad (USA)

MgCl₂

Invitrogen, Carlsbad (USA)

Monensin

BD Biosciences Pharmingen, San Diego (USA)

Natriumazid

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natriumcarbonat

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

10x Permeabilization Buffer

eBioscience, Frankfurt

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PBS

Invitrogen, Carlsbad (USA)

Propidiumiodid

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Proteinase K

peqLab, Erlangen

Reaction Buffer, 10x

Invitrogen, Carlsbad (USA)

RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Salzsäure, 1 M	Merck, Darmstadt
Taq Polymerase	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Trypanblau	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.1.3 Kits

CD4 ⁺ CD62L ⁺ T Cell Isolation Kit II, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit FITC	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.4 Medien und Puffer

Basismedium:	RPMI 1640 ohne L-Glutamin
	5 oder 10 % hitzeinaktiviertes FKS
	100 U/ml Penicillin-G-Natrium
	100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat
	2 mM L-Glutamin
	1 mM Natriumpyruvat
	5 ml nicht essenzielle Aminosäuren (100x)
	50 µm 2-Mercaptoethanol
	alles von Invitrogen, Karlsruhe
Einfrüermedium:	90 % hitzeinaktiviertes FKS
	10 % DMSO

Erythrozyten-Lysepuffer 10x: NH₄Cl 8,25 g
K₂HCO₃ 1 g
Na-EDTA 37 mg
H₂O ad 100 ml
pH 7,4

FACS-Puffer: PBS
2 % hitzeinaktiviertes FKS
2 mM EDTA
1 % NaN₃

MACS-Puffer: PBS
2 mM EDTA
0,5 % hitzeinaktiviertes FKS

2.1.5 Mäuse

Alle Mäuse wurden unter spezifiziert Pathogen-freien Bedingungen im Tierstall des Hämatologikums Großhadern gehalten.

Die Grundlage für diese Arbeit sind *c-MYC*-transgene Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund. Für die Aufrechterhaltung der Zucht wurden diese mit wt-C57BL/6-Mäusen (Jackson Laboratory, USA) verpaart. *C-MYC*-Mäuse tragen das Transgen für humanes *c-MYC*, welches unter der Kontrolle des Enhancers für Ig λ steht (Kovalchuk et al. 2000). Im Alter von etwa 14 Wochen entwickeln die Tiere spontan B-Zell-Lymphome, wobei sich die Tumoren vor allem in den Lymphknoten und der Milz manifestieren. Als Kontrolltiere dienten nicht-transgene C57BL/6-Mäuse, die im Folgenden als wt-Mäuse bezeichnet werden.

DEREG-Mäuse ("Depletion of Regulatory T-Cells") wurden freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt und zusätzlich bei Jackson Lab. (USA) erworben. DEREГ-Mäuse basieren auf C57BL/6-Mäusen und exprimieren ein Fusionsprotein, das aus dem Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR)

und GFP (grün-fluoreszierendes Protein) besteht. Dieses DTR-GFP-Fusionsprotein steht unter der Kontrolle des *foxp3*-Locus (Lahl und Sparwasser 2011). Foxp3-exprimierende Treg können somit einerseits über GFP direkt detektiert, andererseits durch die Gabe von DT spezifisch depletiert werden. Dereg-Mäuse wurden mit wt-C57BL/6- und *c-MYC*-Mäusen verpaart.

Alle Mäuse, die das *c-MYC*-Gen trugen, entwickelten spontan Lymphome, die vor allem durch verdickte LK in den Achseln und am Hals an der lebenden Maus sichtbar werden. Nach dem Erkennen der ersten Symptome mussten die Tiere gemäß Tierschutzgesetz innerhalb der nächsten drei bis maximal fünf Tage oder je nach Krankheitsverlauf auch früher getötet werden. Die im Tierversuchsantrag aufgelisteten Abbruchkriterien waren folgende:

- Verdickte LK in Achseln oder am Hals
- Kurzatmigkeit
- Abdomenschwellung
- Struppiges Fell
- Schmerzsymptomatik: gekrümmter Rücken
- Absonderung von der Gruppe
- Apathie/Vitalitätsverlust
- Gewichtsverlust

2.1.6 Antikörper

Folgende Antikörper, die spezifisch für Maus-Antigene sind, wurden verwendet:

Tabelle 1: Fluoreszenz-markierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a	BD Pharmingen
CD8	53-6.7	Ratte IgG2a	eBioscience
CD8	eBioH35-17.2	Ratte IgG2b	eBioscience
CD3	17A2	Ratte IgG2b	eBioscience
CD69	H1.2F3	Arm. Hamster IgG1, λ 3	BD Pharmingen
CD62L	MEL-14	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
PD-1	J43	Arm. Hamster IgG	eBioscience
PD-L1	MIH5	Ratte IgG2a, κ	eBioscience

LAG-3	C9B7W	Ratte IgG1, κ	BioLegend
CD137	17B5	Gold. Syr. Hamster IgG	eBioscience
Ki-67	SolA15	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
Helios	22F6	Arm. Hamster IgG	eBioscience
CTLA-4	UC10-4B9	Arm. Hamster IgG	BioLegend
IFN- γ	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	BioLegend
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b	eBioscience
IL-2	JES6-5H4	Ratte IgG2b, κ	BioLegend
B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a, κ	BD Pharmingen
CD19	1D3	Ratte IgG2a	BD Pharmingen
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	BD Pharmingen
CD11c	HL3	Arm. Hamster IgG1, λ 2	BD Pharmingen
CD107a	1D4B	Ratte IgG2a	BD Pharmingen

Tabelle 2: Unmarkierte Antikörper für *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuche

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
PD-1	J43	Arm. Hamster IgG	eBioscience
CTLA-4	UC10-4B9	Arm. Hamster IgG	BioLegend
Thy-1.2 (MmTC)	2G5	Maus IgG2a	AG Kremmer
CD3	145-2C11	Arm. Hamster	AG Kremmer
CD28	37N	Syr. Hamster	AG Kremmer

2.1.7 Primer

Für die Genotypisierung der *c-MYC*- und *DEREG/c-MYC*-Mäuse (siehe Abschnitt 2.2.2) wurden zwei verschiedene Primer-Paare in die PCR eingesetzt (Tabelle 3). Eines amplifiziert das humane *c-MYC*-Gen (Fragmentgröße ~450 bp), das andere dient als interne PCR-Kontrolle und amplifiziert das Maus-spezifische Haushaltsgen *Cd79b*, welches die Ig- β -Kette des BZR codiert (Fragmentgröße ~350 bp).

Tabelle 3: Primer für die Genotypisierung der *c-MYC*- und *DEREG/c-MYC*-Mäuse

Primer	Gen	Sequenz
E2 intfwd	<i>c-MYC</i> (human)	GCTCGTCTCAGAGAAGCTGG
12 rev	<i>c-MYC</i> (human)	ATCTCTCCAGATCTGCTATCTC
B29-18F	<i>Cd79b</i> (murin)	GTGGCACGGAAGCTTCTAGTC
B29-9R	<i>Cd79b</i> (murin)	CTTGTCAAGTAGCAGGAAGA

2.1.8 Software

BD FACSDiva™	Becton Dickinson
FlowJo	Treestar Inc., Ashland, OR (USA)
GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla, CA (USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft Redmond, CA (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Einzelzellsuspension aus Organen

Nach Euthanasie durch CO₂ wurden den Mäusen axilläre, inguinale und mandibuläre Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Diese wurden durch ein Zellsieb in Medium gedrückt, sodass eine Einzelzellsuspension entstand. Nach einer kurzen Inkubation in 1x Erythrozyten-Lysepuffer wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Einmalzählkammern die Zellzahl bestimmt.

2.2.2 Maus-Genotypisierungen

Die Genotypisierung der *c-MYC*-Mäuse erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dazu wurde den Mäusen ein kleines Stück des Schwanzendes abgeschnitten und über Nacht in 200 µl „DirectPCR Lysis Reagent“ und 0,3 mg/ml Proteinase K bei 55°C im Heizblock inkubiert. Nach 45 min bei 85°C konnten die Proben in die PCR eingesetzt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Reagenzien mit Volumenangaben für PCR zur Genotypisierung der *c-MYC*- und *DEREG/c-MYC*-Mäuse

Reagenz	Volumen
10x Reaction Buffer	5 µl
50 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
Taq Polymerase	0,3 µl
100 µM Primer E2 fwd	0,5 µl
100 µM Primer 12 rev	0,5 µl
100 µM Primer B29-18F	0,5 µl
100 µM Primer B29-9R	0,5 µl
H ₂ O	37,6 µl
DirectPCR Lysis Produkt	1,5 µl

Temperatur-Verlauf im Thermocycler:

94°C	Pause	
94°C	4 min	
94°C	45 s	} 35 Zyklen
58°C	30 s	
72°C	1 min 30 s	
72°C	10 min	
4°C	Pause	

Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte aufgetrennt und schließlich die *c-MYC*-positiven Mäuse ermittelt (Abbildung 2).

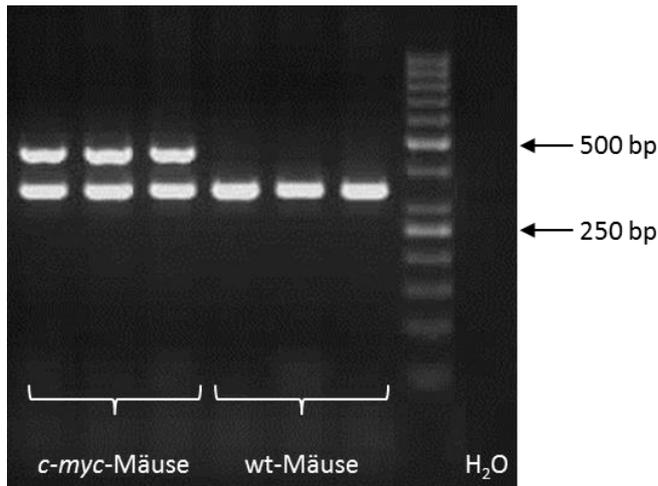


Abbildung 2: Elektrophorese-Gel nach der Durchführung einer PCR zur Typisierung von *c-MYC*-Mäusen. Die ersten drei Spuren wurden aus der DNS von *c-MYC*-positiven Mäusen amplifiziert, die drei darauffolgenden Spuren von *c-MYC*-negativen wt-Mäusen. Die unteren Banden entsprechen dem Maus-spezifischen *Cd79b*-Amplikon (~350 bp), während die oberen Banden die humanen *c-MYC*-Amplikons (~450 bp) darstellen. Rechts befindet sich die Negativkontrolle. Es wurde eine 50 bp-DNS-Leiter verwendet.

Für die Bestimmung DEREK-positiver Mäuse wurden maximal 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Nach Behandlung mit 1x Erythrozyten-Lysepuffer konnte die Expression des DTR-GFP-Proteins in den Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Die Expression des *c-MYC*-Gens in DEREK/*c-MYC*-Tieren wurde mittels PCR analysiert, wie es bereits für die *c-MYC*-Mäuse beschrieben wurde (siehe Abschnitt 2.2.2).

2.2.3 Zelllinien und Zellkulturbedingungen

Die B-Zell-Lymphom-Zelllinie 291 wurde aus kranken *c-MYC*-Mäusen in diesem Labor generiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in Basismedium mit 5 % FKS bei 37°C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten. Die Fc-Rezeptor (FcR)⁺ Mastozytom-Zelllinie P815 wurde freundlicherweise von der AG Elfriede Nößner zur Verfügung gestellt. Die adhärent wachsenden P815-Zellen wurden zunächst mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert, mit 9 ml Basismedium (10 % FKS) vom Flaschenboden gelöst und in frischem Basismedium (10 % FKS) kultiviert.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Für die Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie wurden die zu analysierenden Zellen (1×10^6 pro Ansatz) für 20 min bei 4°C mit Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern (Tabelle 1) in 50 µl FACS-Puffer inkubiert. Um tote Zellen auszuschließen, wurde die „Live/Dead® Fixable Blue“-Lösung, wenn eine Intrazellulär-Färbung durchgeführt wurde, oder Propidiumiodid, wenn die Zellen ausschließlich oberflächlich gefärbt wurden, verwendet.

Vor der Bestimmung intrazellulärer Zytokine (IFN- γ , IL-10, IL-2) mussten die Zellen mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A (jeweils 1:1000 verdünnt) in Basismedium (10 % FKS) stimuliert werden, während ein Teil der Zellen lediglich in Medium kultiviert wurde und als Negativkontrolle diente. Nach vier Stunden wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit dem „IC Fixation Buffer“ fixiert (20 min, RT) und mit 1x „Permeabilization Buffer“ gewaschen und somit permeabilisiert. Mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper in 100 µl 1x „Permeabilization Buffer“ (20 min, 4°C) wurden intrazelluläre Zytokine gefärbt.

Sollten die Transkriptionsfaktoren Foxp3 oder Helios oder das nukleäre Antigen Ki-67 angefärbt werden, so mussten die Zellen mit dem „Foxp3 Staining Buffer Set“ fixiert (30 min – 24 h, 4°C), permeabilisiert und mit dem entsprechenden Antikörper (Tabelle 1) in 1x „Permeabilization Buffer“ inkubiert (30 – 60 min, 4°C) werden.

Die spezifisch angefärbten Zellen wurden am „BD LSR II Flow Cytometer“ durchflusszytometrisch detektiert. Bei der Auswertung der Daten wurde stets dieselbe Gating-Strategie angewendet, um auf die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen einzugrenzen (Abbildung 3). Diese wurden anschließend auf weitere Marker hin analysiert.

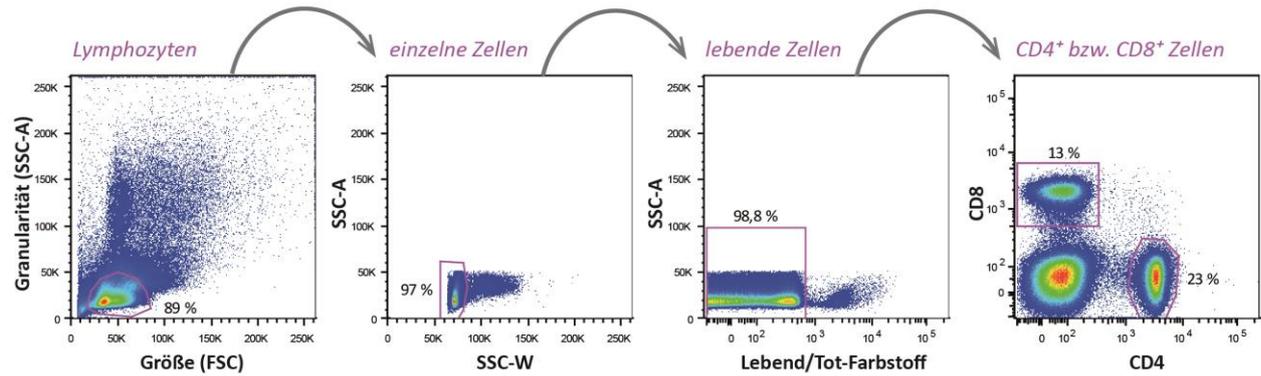
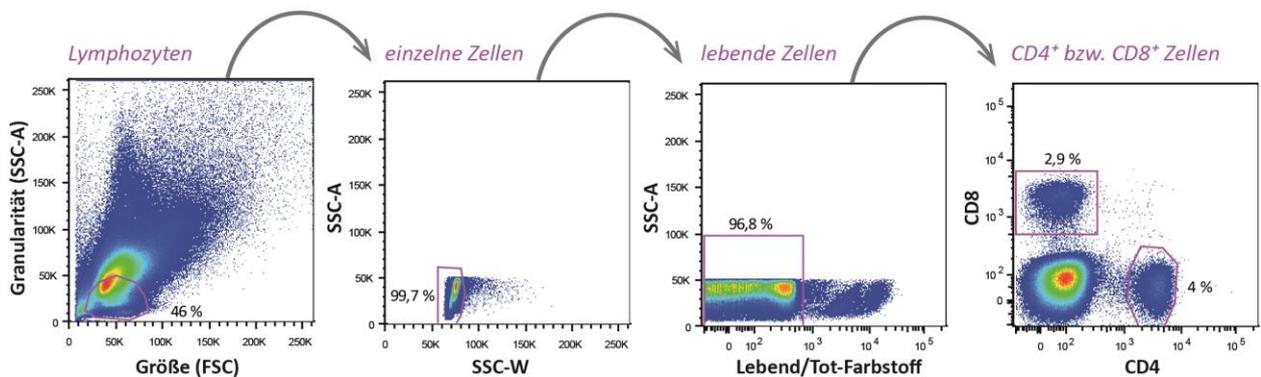
wt-Milz:**c-MYC-Milz:**

Abbildung 3: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen aus *c-MYC*- und *wt*-Mäusen. Exemplarisch dargestellt sind *wt*-Milz (oben) und *c-MYC*-Milz (unten). Die Gates wurden zunächst bei den Proben aus *wt*-Mäusen gesetzt und schließlich auf die Daten der *c-MYC*-Tumoren übertragen.

2.2.5 CD107a-Degranulierungs-Versuch

Dieser Versuch wurde angewendet, um die Fähigkeit zur Degranulation bei den $CD8^+$ ZTL aus *c-MYC*-Mäusen im Vergleich zu ZTL aus *wt*-Tieren zu testen, und erfolgte nach den Protokollen von Betts und Koup (2004) und Petra Prinz (AG Nößner).

Zellen der $Fc\gamma R^+$ Zelllinie P815 wurden mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3- und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD28-Antikörper in Basismedium (10 % FKS) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei binden die Antikörper über deren Fc-Teil an die Fc-Rezeptoren der P815-Zellen. Milz- und LK-Zellen wurden aus kranken *c-MYC*- und gesunden *wt*-Mäusen gewonnen und als Effektoren zusammen mit den beladenen P815-Zellen – den Zielzellen – im Verhältnis 1:1 fünf Stunden bei 37°C kokultiviert. Dazu wurden pro Vertiefung einer 96 Well-Rundbodenplatte jeweils $0,5 \times 10^6$ P815-Zellen und Effektorzellen ausgesät und mit Monensin (1:500 verdünnt) in 200 μl Basismedium (10 % FKS) kultiviert. Ebenso wurden je Stimulationsansatz 2 μl des CD107a-spezifischen, PE-markierten Antikörpers eingesetzt.

Anschließend wurde CD107a auf der Oberfläche zytotoxischer CD8⁺ T-Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Für Negativkontrollen wurden unbeladene P815-Zellen eingesetzt.

2.2.6 In-vitro-Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-AK

96-Loch-Rundbodenplatten wurden mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet. Dazu wurde in jede Vertiefung jeweils 2 µg/ml Antikörper in 50 µl PBS pipettiert. Die Platte wurde daraufhin entweder über Nacht bei 4°C oder für einige Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurden die Vertiefungen einmal mit 200 µl PBS und einmal mit 200 µl Basismedium (10 % FKS) gewaschen. Pro Vertiefung wurden 0,5 x 10⁶ Zellen in 200 µl Basismedium (10 % FKS) ausgesät und mit 50 U/ml IL-2 drei Tage bei 37°C stimuliert.

2.2.7 CFSE-Proliferations-Test

Um die Proliferation der T-Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurden diese mit CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester) markiert. Dazu wurden LK- und Milz-Zellen aus *c-MYC*- und *wt*-Mäusen in einer 2 µM CFSE-Färbelösung (in PBS) für exakt 8 min. im 37°C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend zweimal mit ca. 10 ml PBS gewaschen. Die CFSE-Markierung an Tag 0 wurde mittels Durchflusszytometrie im FITC-Kanal erfasst. Nach drei-tägiger anti-CD3/anti-CD28-Stimulation (siehe Abschnitt 2.2.6) wurden die Zellen geerntet, die toten Zellen mit „Live/Dead® Fixable Blue“-Lösung angefärbt und eine Oberflächen- und intrazelluläre Foxp3-Färbung durchgeführt. Die Halbierung der CFSE-Fluoreszenzintensität entspricht einer Zellteilung. Somit konnte die T-Zell-Proliferation detektiert werden.

2.2.8 MACS-Zell-Separation

Für die Isolierung von naiven CD4⁺ T-Zellen wurde das „CD4⁺ CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II, mouse“ verwendet. CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen wurden aus einer *wt*-Milz mit Hilfe des Kits und der MACS-Säulen nach Protokoll des Herstellers isoliert.

2.2.9 Kokulturen zur Induktion der Foxp3-Expression

Die Entstehung von iTreg aus naiven CD4⁺ T-Zellen im Tumormilieu sollte untersucht werden. Dazu wurden pro Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte 0,2 x 10⁶ CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen, die aus wt-Milzen isoliert wurden, entweder mit 0,2 x 10⁶ 291-Zellen oder mit 0,2 x 10⁶ wt-LK-Zellen vier Tage lang bei 37°C kokultiviert. Für die Positivkontrolle wurden die CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen alleine mit 2 ng/ml rekombinantem TGF-β (rTGF-β) kultiviert. Bei allen Ansätzen dienten 0,2 x 10⁶ Beads pro Vertiefung, die zuvor mit anti-CD3/anti-CD28-AK beladen worden waren (freundlicherweise von der AG Heißmeyer zu Verfügung gestellt), und 100 U/ml rIL-2 (rekombinantes IL-2) in Basismedium (10 % FKS) als Stimulation.

Nach vier Tagen wurden die Zellen aus den Vertiefungen der Platte entnommen und mit fluoreszierenden AK gefärbt. Anschließend wurde die Foxp3-Expression der CFSE-markierten CD4⁺ wt-T-Zellen analysiert.

2.2.10 In-vivo-Versuche

Alle Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern.

Zur Analyse der Proliferation *in vivo* wurde *c-MYC*- und wt-Mäusen 1,5 mg des Basenanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Nach drei Stunden wurden die Tiere geopfert und Milz und Lymphknoten entnommen. Die Zellen wurden nach Protokoll des BrdU Flow Kits mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt und am Durchflusszytometer vermessen.

Um T-Zellen *in vivo* zu depletieren, wurde der MmTC-Antikörper verwendet (Kremmer et al. 1997), der an Thy-1.2 auf T-Zellen bindet und freundlicherweise von der AG Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt wurde. Der MmTC-AK wurde noch gesunden *c-MYC*-Mäusen ab etwa dem 55. Lebensstag zwei Mal wöchentlich i.p. verabreicht, wobei die erste Dosis 1 mg pro Tier betrug und anschließend lediglich 400 µg MmTC-AK injiziert wurden. Die Depletion wurde solange durchgeführt, bis erste Krankheitszeichen sichtbar wurden und die jeweilige Maus abgetötet werden musste.

Mit den Antikörpern anti-PD-1 und anti-CTLA-4 wurden die koinhibierenden Moleküle PD-1 und CTLA-4 *in vivo* blockiert. Dazu wurden jeweils 100 µg der Antikörper zusammen oder getrennt einmal pro Woche *c-MYC*-Mäusen, die noch klinisch unauffällig waren (ab ca. Tag 55), i.p. injiziert. Die Behandlung erfolgte über vier Wochen.

Treg in DREG/*c-MYC*-Mäusen wurden durch die Gabe von DT *in vivo* depletiert. An zwei aufeinander folgenden Tagen wurde den Tieren je 500 ng DT in 100 µl PBS i.p. appliziert. Dies wurde im Zwei-Wochen-Abstand drei Mal durchgeführt. Als Kontrolle wurden auch *c-MYC*-Mäuse mit DT behandelt. Alle Mäuse waren bei der ersten DT-Gabe etwa 55 Tage alt und hatten noch keine sichtbaren Krankheitssymptome. Um die geeignete Menge an DT zu bestimmen, wurden 100 ng, 500 ng bzw. 1 µg DT i.p. injiziert und die Treg-Depletion im Blut, welches aus der Schwanzvene entnommen wurde, kontrolliert.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen der Signifikanzwerte in den einzelnen Experimenten wurden mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism 5“ durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit einem ($p < 0,05$), zwei ($p < 0,01$) bzw. drei Sternchen ($P < 0,001$) gekennzeichnet. Nicht-signifikante Unterschiede wurden entweder als „ns“ markiert oder nicht extra dargestellt. Folgende Testverfahren wurden angewendet:

- Der ungepaarte Student's t-Test wurde verwendet, um zwei unabhängige Gruppen miteinander zu vergleichen. Bei einigen Experimenten mit einer sehr hohen Anzahl an Proben wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests eine Normalverteilung nachgewiesen (siehe Abbildungen 4B, 7, 9B und C, 11, 13, 14, 16), so dass für alle Daten eine Normalverteilung angenommen wurde.
- Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wurde eine Gruppe mit mehreren anderen Gruppen verglichen.
- Der Log-Rank-Test (Mantel-Cox-Test) berechnet die Unterschiede zwischen Kaplan-Meier-Überlebenskurven.

3 ERGEBNISSE

3.1 Fehlende Hilfe der angeborenen Immunität und Konsequenzen für T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass NK-Zellen in Tumoren aus *c-MYC*-transgenen Mäusen zwar einen aktivierten Phänotyp aufwiesen, sie jedoch in ihrer Funktion massiv eingeschränkt waren (Brenner et al. 2010). So produzierten intratumorale NK-Zellen trotz *Ex-vivo*--Stimulation kaum IFN- γ . Zudem waren sie nicht mehr dazu fähig, Zielzellen zu töten, was zur Hauptaufgabe der NK-Zellen im Immunsystem zählt. Die Produktion von IFN- γ ist die Voraussetzung für die Entwicklung einer Th1/ZTL-Antwort und somit für eine effektive Antitumorantwort. NK-Zellen stellen dabei die wichtigste IFN- γ -Quelle dar und sorgen zusammen mit DZ für die Vernetzung von angeborener und erworbener Immunabwehr. Tumor-infiltrierende DZ waren in *c-MYC*-Mäusen phänotypisch ebenfalls aktiviert, produzierten jedoch mehr IL-10, welches die Immunantwort hemmt, als das immunstimulierende Zytokin IL-12 (Naujoks et al., Manuskript eingereicht). Aufgrund der fehlenden NK-Zell- und DZ-Hilfe wurde erwartet, dass T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren nicht zu funktionsfähigen T-Effektorzellen ausreifen können bzw. sich in einem anergen Stadium befinden, und somit keine Th1-Antwort ausführen können.

3.1.1 Funktionsanalysen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Naive T-Zellen erhöhen nach deren Aktivierung über den TZR die Expression bestimmter Moleküle auf der Zelloberfläche, zu denen der frühe Aktivierungsmarker CD69 zählt. Mittels FACS-Analyse wurde die CD69-Expression auf T-Zellen in Tumoren aus *c-MYC*-Mäusen untersucht. Dazu wurden Zellsuspensionen von Milz und LK aus erkrankten *c-MYC*-Mäusen und wt-Tieren hergestellt und mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt. Bei der Auswertung wurde die T-Zell-Population in CD4⁺ T-Helferzellen und in zytotoxische CD8⁺ ZTL aufgeteilt. Beide Zelltypen zeigten in *c-MYC*-Tumoren eine höhere Expression von CD69 als in Organen aus wt-Mäusen (Abbildung 4 A), was bedeutet, dass T-Zellen *in vivo* aktiviert worden waren.

Ebenso wie aktivierte NK-Zellen schütten T-Zellen, wenn sie zu Th1-Zellen differenziert sind, im aktivierten Zustand IFN- γ aus. Daher wurde getestet, ob T-Zellen aus kranken *c-MYC*-Mäusen in der Lage waren, IFN- γ zu produzieren, oder ob diese aufgrund der NK-Zell-Anergie supprimiert waren. Zellen aus Milz und LK wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Durch Zugabe von Brefeldin A

konnten die gebildeten Zytokine nicht ausgeschüttet werden und verblieben in den Zellen, sodass diese mittels intrazellulärer Färbung detektiert werden konnten. Wider Erwarten produzierten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aus *c-MYC*-Tumoren nach Stimulation teilweise sogar mehr IFN- γ als wt-T-Zellen (Abbildung 4 B).

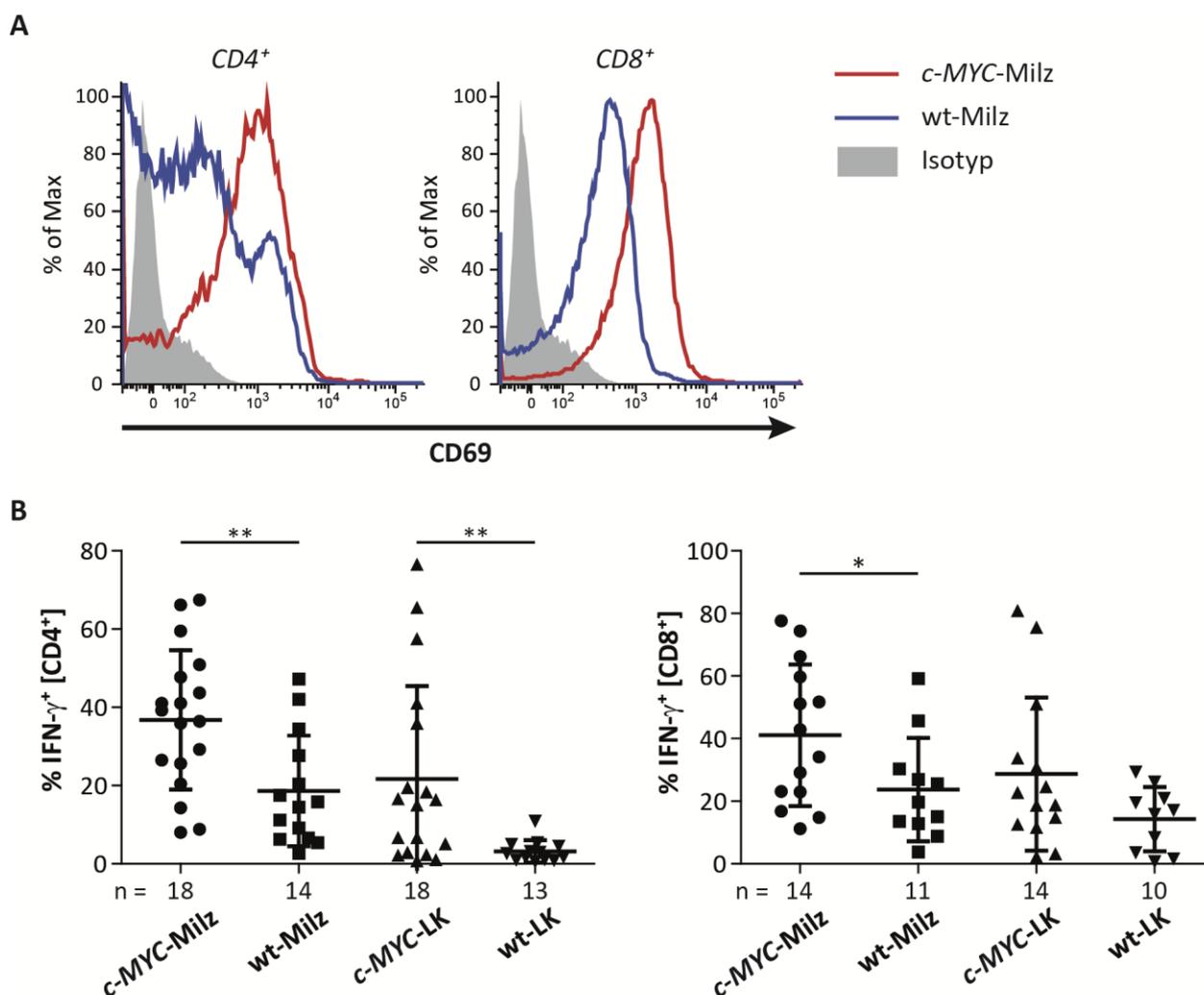


Abbildung 4: Aktivierungs- und Funktionsanalyse bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus *c-MYC*-Tumoren und wt-Organen mittels FACS. Die Gating-Strategie erfolgte wie in Abbildung 3 (Abschnitt 2.2.4) dargestellt. **A**) Repräsentative Ergebnisse der CD69-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Milzen von *c-MYC*- und wt-Tieren aus sechs Versuchen. **B**) IFN- γ -Expression der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Organen von *c-MYC*- und wt-Tieren. Milz- bzw. LK-Zellen wurden *ex vivo* mit PMA und Ionomycin für vier Stunden bei 37°C stimuliert. Anschließend erfolgten eine Oberflächen- und eine Intrazellulär-Färbung. Ein Symbol entspricht einer Maus. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet.

Der Nachweis der IFN- γ -Produktion alleine war jedoch noch kein Beweis dafür, dass intratumorale CD8⁺ ZTL nach Aktivierung all ihre Effektorfunktionen ausführen konnten. Daher wurde ein

Degranulationsversuch durchgeführt. Im Zytoplasma aktivierter, zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen wandern lytische Granula zur Plasmamembran, verschmelzen mit dieser und schütten Perforin und Granzyme in den Extrazellulärraum aus. Tumorzellen, die von ZTL erkannt werden, können so getötet werden. Die Membran der zytotoxischen Granula ist mit Lysosomal-assoziierten Membranglykoproteinen (LAMP) wie CD107a (LAMP-1) ausgekleidet, welche nach der Degranulation auf die Oberfläche der $CD8^+$ T-Effektorzelle gelangen und mittels Durchflusszytometrie detektiert werden können. Dieser Degranulations-Ansatz wurde für die ZTL in *c-MYC*-Tumoren angewandt. Als Zielzelle wurde die FcR^+ Mastozytom-Zelllinie P815 verwendet, welche zuvor mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beladen wurde. Eine Degranulation der $CD8^+$ T-Zellen war somit die Folge einer Antigen-unabhängigen Stimulation über den T-Zell-Rezeptor mit Kostimulation über CD28. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, war die Fähigkeit der ZTL zur Degranulation in kranken *c-MYC*-Mäusen nicht beeinträchtigt. Der Anteil $CD107a^+$ $CD8^+$ T-Zellen war vergleichbar mit den Werten aus wt-Tieren. Anscheinend können intratumorale ZTL ihre zytotoxischen Effektorfunktionen ausführen.

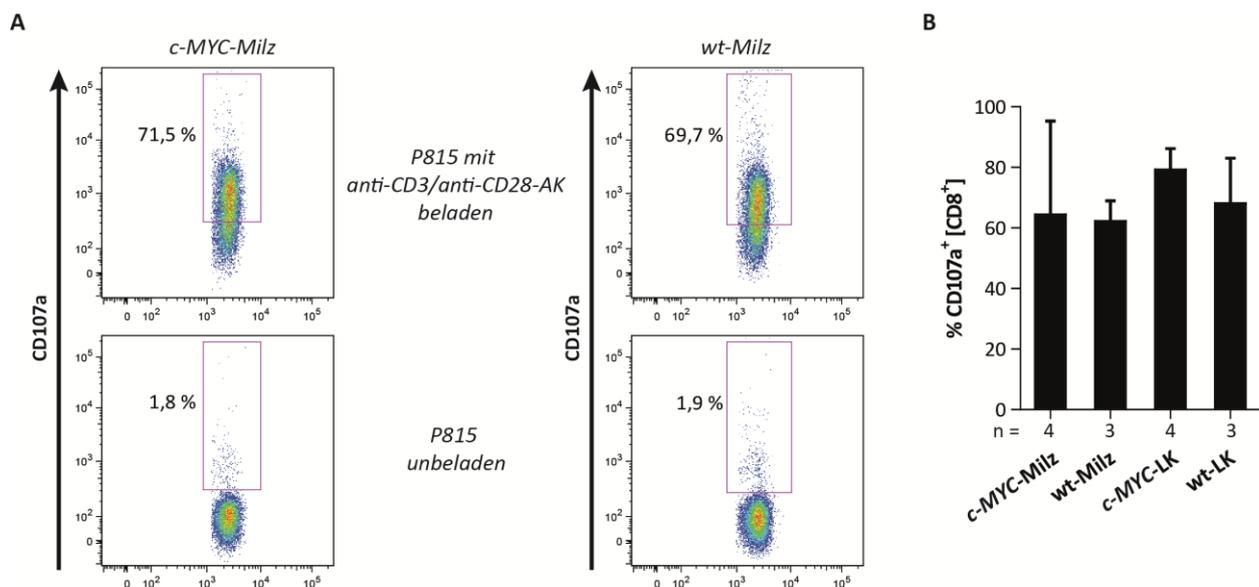


Abbildung 5: CD107a-Degranulationsversuch. Milz- bzw. LK-Zellen aus *c-MYC*- und wt-Mäusen wurden *ex vivo* mit anti-CD3/anti-CD28-AK beladenen P815-Zellen, PE-markiertem anti-CD107a-AK und Monensin für fünf Stunden bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden $CD8^+$ Zellen hinsichtlich ihrer CD107a-Expression durchflusszytometrisch analysiert. **A)** Repräsentative Ergebnisse der CD107a-Expression nach Kokultur der Milzzellen aus *c-MYC*- und wt-Mäusen mit beladenen (oben) und unbeladenen (unten) P815-Zellen. **B)** Zusammenfassung der CD107a-Expression nach Kokultur mit anti-CD3/anti-CD28-AK beladenen P815-Zellen. Die Unterschiede zwischen *c-MYC*- und wt-Tieren waren nicht signifikant (Student's t-Test).

3.1.2 Rolle der T-Zellen bei der Tumorkontrolle *in vivo*

Wie früher gezeigt wurde, wiesen intratumorale NK-Zellen in fortgeschrittenen Krankheitsstadien einen aktivierten Phänotyp auf, waren jedoch funktionell erschöpft. In frühen Stadien waren NK-Zellen hingegen essenziell bei der Kontrolle des Tumorwachstums (Hömborg et al., Manuskript eingereicht; Belting, persönliche Mitteilung; Adam et al. 2005; Brenner et al. 2010). Die hier untersuchten T-Zellen exprimierten ebenfalls Aktivierungsmarker, waren aber in der Lage, IFN- γ zu produzieren und zu degranulieren. Dies führte zu dem Schluss, dass anscheinend funktionale, nicht-anergische T-Effektorzellen in den *c-MYC*-Tumoren vorhanden waren. Um zu überprüfen, ob diese tatsächlich eine intakte Immunantwort und somit wie intratumorale NK-Zellen eine immunüberwachende Funktion im *c-MYC*-Modell ausführen, wurde die gesamte T-Zellpopulation frühzeitig in *c-MYC*-Mäusen depletiert. Noch bevor erste Krankheitssymptome sichtbar waren, also etwa ab Tag 55 nach Geburt, wurden *c-MYC*-Mäuse mit dem T-Zell-depletierenden Antikörper MmTC behandelt. Dieser wurde zweimal pro Woche i.p. appliziert und zwar solange, bis die Mäuse erkrankten und abgetötet wurden.

Zur Kontrolle der Depletion wurde einigen Tieren jeweils einen Tag vor und einen Tag nach zwei MmTC-Injektionen Blut aus der Schwanzvene entnommen (Abbildung 6 A) und der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach drei Wochen wurden die Kontroll-Mäuse getötet und die T-Zellen in Blut, Milz und LK angefärbt (Abbildung 6 A). Wie in Abbildung 6 B zu sehen ist, waren sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen nach den ersten beiden Wochen fast vollständig aus dem Blut der behandelten *c-MYC*-Mäuse verschwunden. Erst nach der sechsten MmTC-Behandlung stieg der Anteil an CD4⁺ T-Zellen im Blut ein wenig an, wobei die CD8⁺ Population weiterhin kaum sichtbar war. In Milz und LK wurden allerdings deutlich mehr CD4⁺ T-Zellen als im Blut detektiert. Der CD8⁺ Anteil blieb aber auch in Milz und LK sehr gering. Dies ist damit zu erklären, dass Antikörper nicht so schnell durch das Gewebe in die Organe vordringen können wie in den Blutkreislauf (Mocikat 1994). Außerdem werden nach einigen Injektionen vom Körper Anti-Antikörper gebildet (Kremmer et al. 1997), sodass die applizierten Antikörper frühzeitig abgefangen werden und so nicht bis in die Organe gelangen.

Verglich man die Überlebenskurve der T-Zell-depletierten *c-MYC*-Mäuse mit der der unbehandelten Tiere, konnte überraschenderweise kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 6 C). Da sich trotz des Fehlens von T-Zellen nicht schneller Lymphome entwickelten, spielten T-Zellen im Gegensatz zu NK-Zellen im *c-MYC*-Modell bei der Tumorkontrolle wohl eher eine untergeordnete Rolle. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass intratumorale T-Zellen aktiviert waren und IFN- γ und

den Inhalt ihrer zytotoxischen Granula ausschütten konnten. Daher mussten im Tumormilieu wohl andere Mechanismen die T-Zellen daran hindern, eine effektive Immunantwort durchzuführen.

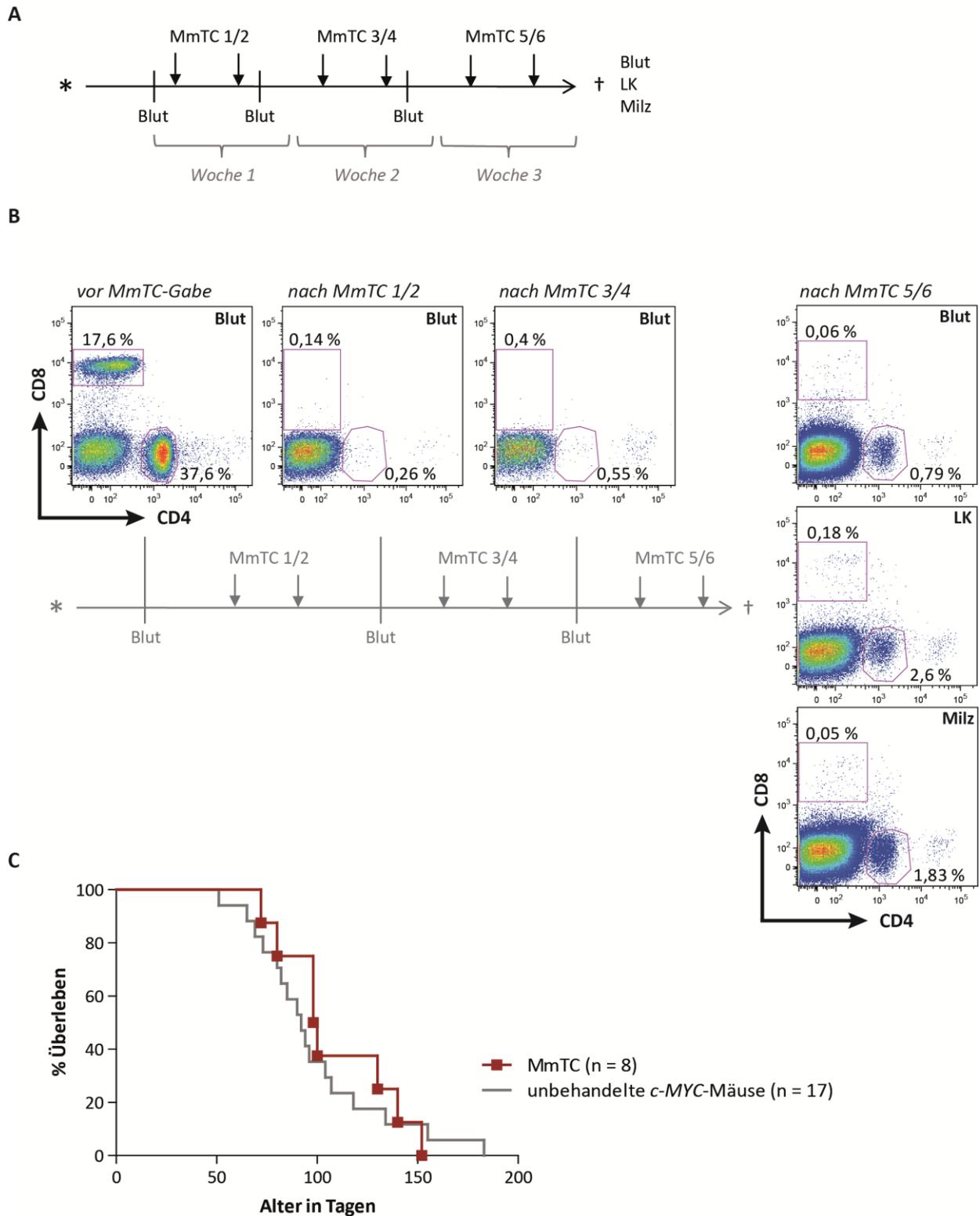


Abbildung 6: T-Zell-Depletionsversuch mit MmTC-Antikörper. Die Injektionen erfolgten zweimal pro Woche i.p. in noch gesunde *c-MYC*-Mäuse (ca. 55 Tage alt). Die erste Dosis betrug 1 mg MmTC-AK, die darauffolgenden lediglich 400 µg MmTC-AK. **A)** Schematische Darstellung der Zeitpunkte der MmTC-Injektionen und der Blutabnahmen. **B)** Kontrolle der T-Zell-Depletion in Blut, Milz und LK. Dargestellt sind repräsentative Punktwolken-Diagramme, die die Anteile von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach einer, zwei und drei Wochen MmTC-Behandlung aufzeigen. Das Experiment wurde mit zwei *c-MYC*-Mäusen durchgeführt. **C)** Überlebenskurven der unbehandelten (grau) und der mit MmTC behandelten (rot) *c-MYC*-Mäusen. Die Signifikanz wurde mittels Log-Rank-Test berechnet (Unterschiede nicht signifikant).

3.2 Charakterisierung der intratumoralen T-Zellen

3.2.1 Regulatorische T-Zellen

Es stellte sich die Frage, wie die nachgewiesene T-Zell-Aktivität mit der fehlenden Tumor-Kontrolle durch T-Zellen in Einklang gebracht werden kann. Eine Möglichkeit stellt die Population der $CD4^+$ Treg dar, die gehäuft in Tumoren zu finden sind. Treg hemmen effektive Antitumor-Immunantworten, indem sie suppressive Zytokine sezernieren oder die Funktion anderer Immunzellen über direkten Zell-Zell-Kontakt inhibieren. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 grenzt dabei Treg von konventionellen $CD4^+$ T-Effektorzellen ($CD4^+$ Teff) ab.

Auch in Tumoren des *c-MYC*-Modells wurden $CD4^+$ Foxp3⁺ Treg detektiert. Vergleicht man kranke *c-MYC*-Mäuse mit wt-Tieren, die das *c-MYC*-Transgen nicht tragen, wird deutlich, dass der Anteil an Treg innerhalb der $CD4^+$ Population vor allem in *c-MYC*-Tumor-Milzen stark erhöht war. Doch auch in den LK nahm der Treg-Anteil signifikant zu (Abbildung 7). Regulatorische T-Zellen bildeten in den *c-MYC*-Tumoren eine große Population. Ob diese tatsächlich eine Rolle bei der Immunsuppression im *c-MYC*-Modell spielten, wurde später untersucht.

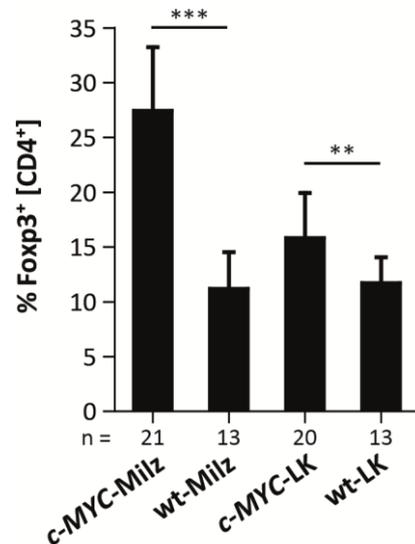


Abbildung 7: Anteil Foxp3-positiver Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zell-Population in Milz und LK aus *c-MYC*- und wt-Mäusen. Die Foxp3-Expression wurde mittels Intrazellulär-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet.

Foxp3⁺ Treg werden in nTreg, die bereits im Thymus entstehen, und iTreg, die sich in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen entwickeln, eingeteilt. Einige Veröffentlichungen zeigen, dass diese beiden Treg-Populationen durch den Transkriptionsfaktor Helios aus der Ikaros-Familie unterschieden werden können. In *c-MYC*-Tumoren konnte ein großer Anteil Helios⁺ Foxp3⁺ Treg detektiert werden, wobei die Prozentzahlen mit Treg aus wt-Mäusen vergleichbar waren. So waren im Mittel 68 % der Foxp3⁺ Treg auch Helios⁺ (Daten nicht gezeigt). Der Großteil der intratumoralen Treg zählte demnach zu den nTreg.

Es wird jedoch auch beschrieben, dass naive CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β und einem TZR-Stimulus zu Foxp3-exprimierenden Treg differenzieren. Um zu überprüfen, ob die Entstehung von iTreg auch im *c-MYC*-Tumormilieu stattfindet, wurden naive CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen aus wt-Milzen isoliert, mit CFSE markiert und für vier Tage mit Zellen der 291-Lymphom-Zelllinie, die aus einer kranken *c-MYC*-Maus generiert worden war, kokultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Partikeln, die mit anti-CD3/anti-CD28-AK beladen waren, sowie mit rIL-2 stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die naiven T-Zellen anstelle von Tumorzellen mit rTGF- β kultiviert, während die Kokultur der CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen mit LK-Zellen aus wt-Mäusen als Negativkontrolle diente. Nach vier Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen und die Foxp3-Expression innerhalb der CFSE⁺ CD4⁺ T-Zell-Population analysiert. Die höchste Expression von Foxp3 zeigte, wie zu erwarten, die Kultur mit rTGF- β . Zwischen der Kokultur von CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen mit 291-Zellen und der Negativkontrolle (CD4⁺ CD62L⁺ Zellen mit wt-LK-Zellen) konnte kein Unterschied in der Foxp3-Expression festgestellt werden (Abbildung 8). Die Entstehung von iTreg im Tumormilieu war demnach nicht außergewöhnlich hoch und offenbar mit der Induktion im normalen, gesunden Gewebe vergleichbar. Dies kann damit erklärt werden, dass im Milieu von *c-MYC*-Tumoren TGF- β nicht nachgewiesen werden konnte. Sowohl bei durchflusszytometrischen Färbungen, als auch bei PCR-Analysen von mRNA und bei ELISA-Messungen von Tumor-Überständen oder Serum-Proben wurden keine reproduzierbar positive Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt; siehe auch Brenner (2009); Naujoks (2012)).

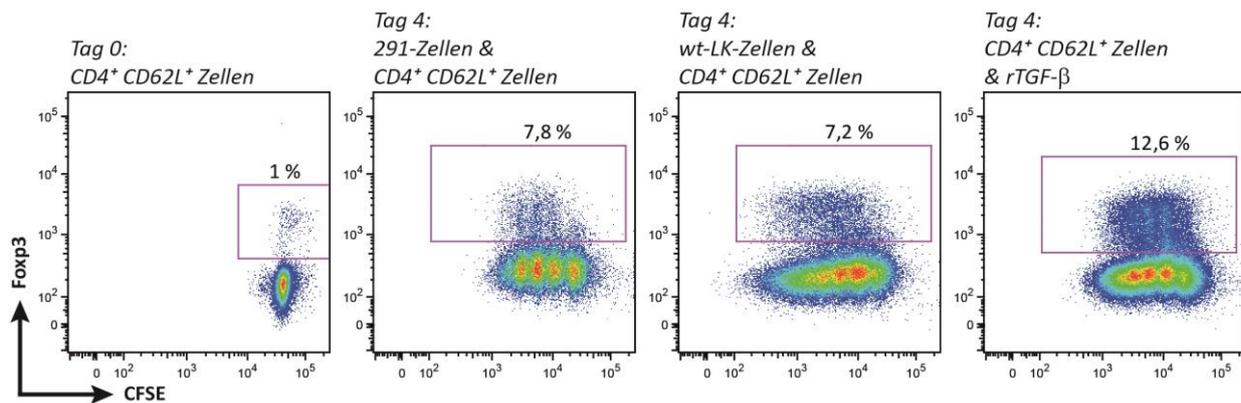


Abbildung 8: Induktion von Foxp3⁺ iTreg aus naiven CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen, die über MACS-Separation aus wt-Milzen gewonnen und mit CFSE markiert wurden. Naive CD4⁺ CD62L⁺ wurden mit Zellen der 291-Zelllinie bzw. mit LK-Zellen aus wt-Mäusen kokultiviert. Als Positivkontrolle diente die Kultur der CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen mit rTGF- β . Alle Kulturen enthielten mit anti-CD3/anti-CD28-AK beladene Partikel sowie rIL-2 und wurden für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt.

3.2.2 Aktivierungszustand von Treg, CD4⁺ Teff und CD8⁺ ZTL

Die Untersuchung von Aktivierungsmarkern sollte Aufschluss über den Aktivierungszustand der T-Zellen im Tumormilieu geben. Dazu wurden die drei Subpopulationen CD4⁺ Foxp3⁺ Treg, CD4⁺ Foxp3⁻ Teff und CD8⁺ ZTL mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 9 A zeigt ein charakteristisches Beispiel für diese Einteilung anhand der Milz einer kranken *c-MYC*-Maus.

Auf der Zelloberfläche wurde der frühe Aktivierungsmarker CD69 und das L-Selektin CD62L, dessen Expression nach Aktivierung herunterreguliert wird, mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt und am FACS analysiert. Die höchste CD69-Expression wiesen Foxp3⁺ Treg und CD4⁺ Teff in der *c-MYC*-Milz auf. Doch auch auf CD8⁺ ZTL war die CD69-Expression im Vergleich zu wt-ZTL hochreguliert. Bereits in Abschnitt 3.1.1 wurde die vermehrte Expression von CD69 auf *c-MYC*-T-Zellen dargestellt. Nun war klar, dass dies innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population zu einem großen Teil den Foxp3⁺ Treg zuzuschreiben war, da deutlich mehr CD69⁺ Treg in den *c-MYC*-Tumoren gefunden wurden als in wt-Tieren. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei CD62L. Dieses wurde ausschließlich auf den drei T-Zell-Subpopulationen, die aus Milzen kranker *c-MYC*-Mäuse stammten, herunterreguliert (Abbildung 9 B und C). Tumor-infiltrierende T-Zellen wiesen demnach einen aktivierten Phänotyp auf.

Es stellte sich nun die Frage, ob diese Aktivierung spezifisch nach Erkennung eines bestimmten Tumorantigens über den TZR stattfand. Dazu wurde die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD137 (auch 4-1BB), welches nach TZR-spezifischer Aktivierung von T-Zellen auf deren Oberfläche

auftaucht, durchflusszytometrisch ermittelt. Erstaunlich war hierbei, dass die Treg-Population in *c-MYC*-Milzen mit Abstand am meisten CD137 exprimiert (Abbildung 9 D). Diese Treg exprimierten zudem mehr als fünfmal so viel CD137 wie regulatorische T-Zellen in wt-Mäusen. Auch in den *c-MYC*-LK wurden mehr CD137⁺ Treg als in wt-Tieren detektiert. Der Anteil der CD137⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Effektorzellpopulation aus kranken *c-MYC*-Mäusen lag dagegen stets unter 1 %. CD4⁺ Teff und CD8⁺ ZTL zeigten aber trotzdem eine doppelt so hohe CD137-Expression wie T-Effektorzellen aus wt-Mäusen. Es scheint, als ob ein kleiner Teil der T-Effektorzellen, vor allem aber Foxp3⁺ Treg, Antigen-spezifisch aktiviert wurde.

In Abbildung 9 E ist zu sehen, dass knapp 18 % der Foxp3⁺ Treg CD69 und gleichzeitig auch CD137 exprimierten. Nur diese Treg haben anscheinend ein spezifisches Tumorantigen über deren TZR erkannt und wurden so aktiviert.

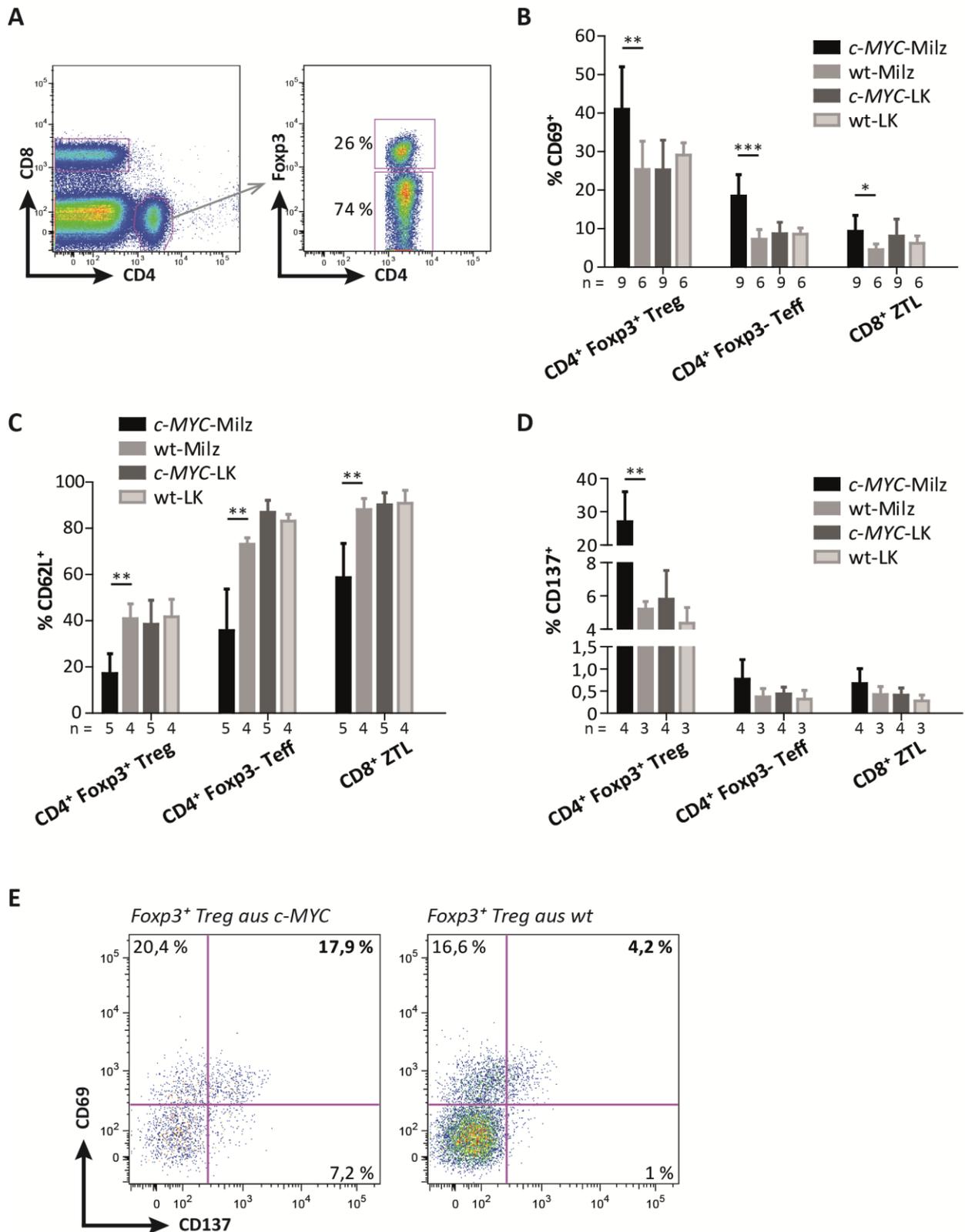


Abbildung 9: Aktivierungszustand der T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren im Vergleich zu wt-T-Zellen. **A)** Allgemeine Gating-Strategie zur Unterscheidung von CD4⁺ Foxp3⁺ Treg, CD4⁺ Foxp3⁻ Teff und CD8⁺ ZTL. Anteil positiver Zellen innerhalb der verschiedenen T-Zell-Populationen: **B)** CD69-Expression, **C)** CD62L-Expression und **D)** CD137-Expression. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet. **E)** Koexpression von CD69 und CD137 auf CD4⁺ Foxp3⁺ Treg aus *c-MYC*- und wt-Milzen. Ein Ergebnis von zwei Versuchen.

3.2.3 T-Zell-Proliferation in *c-MYC*-Tumoren

Um die Proliferation der T-Zellen zu analysieren, wurde das nukleäre Antigen Ki-67 angefärbt. Ki-67 wird lediglich während den aktiven Phasen des Zellzyklus im Nukleus exprimiert und dient daher als Proliferations-Marker. In ruhenden Zellen (G0-Phase) ist Ki-67 nicht zu finden (Scholzen und Gerdes 2000). Abbildung 10 A zeigt, dass alle drei T-Zellpopulation in *c-MYC*-Mäusen eine höhere Ki-67-Expression aufwiesen als in wt-Tieren. Dabei proliferierten Foxp3^+ Treg aus *c-MYC*-Milzen am stärksten. Doch auch bei CD4^+ und CD8^+ T-Effektorzellen wurde im Vergleich zu wt-Tieren deutlich mehr Proliferation detektiert. In *c-MYC*-Tumoren wurde zudem eine große Population an Ki-67^+ CD137^+ Treg entdeckt. Das bedeutete, dass diese doppelt-positiven Treg nach TZR-Stimulation proliferierten. Der Anteil Ki-67^+ CD137^+ Treg war in wt-Tieren dagegen sehr gering (Abbildung 10 B).

Eine weitere Möglichkeit, Proliferation zu messen, ist der BrdU-Inkorporations-Test. Dazu wurde kranken *c-MYC*- und gesunden wt-Mäusen das Basenanalogon BrdU i.p. injiziert. Nach drei Stunden wurde der BrdU-Einbau und somit die Proliferationsrate durchflusszytometrisch analysiert. Mit Hilfe dieser Methode konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die intratumoralen T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen aus wt-Tieren vermehrt teilten. In Abbildung 10 C ist ein repräsentatives Beispiel dargestellt.

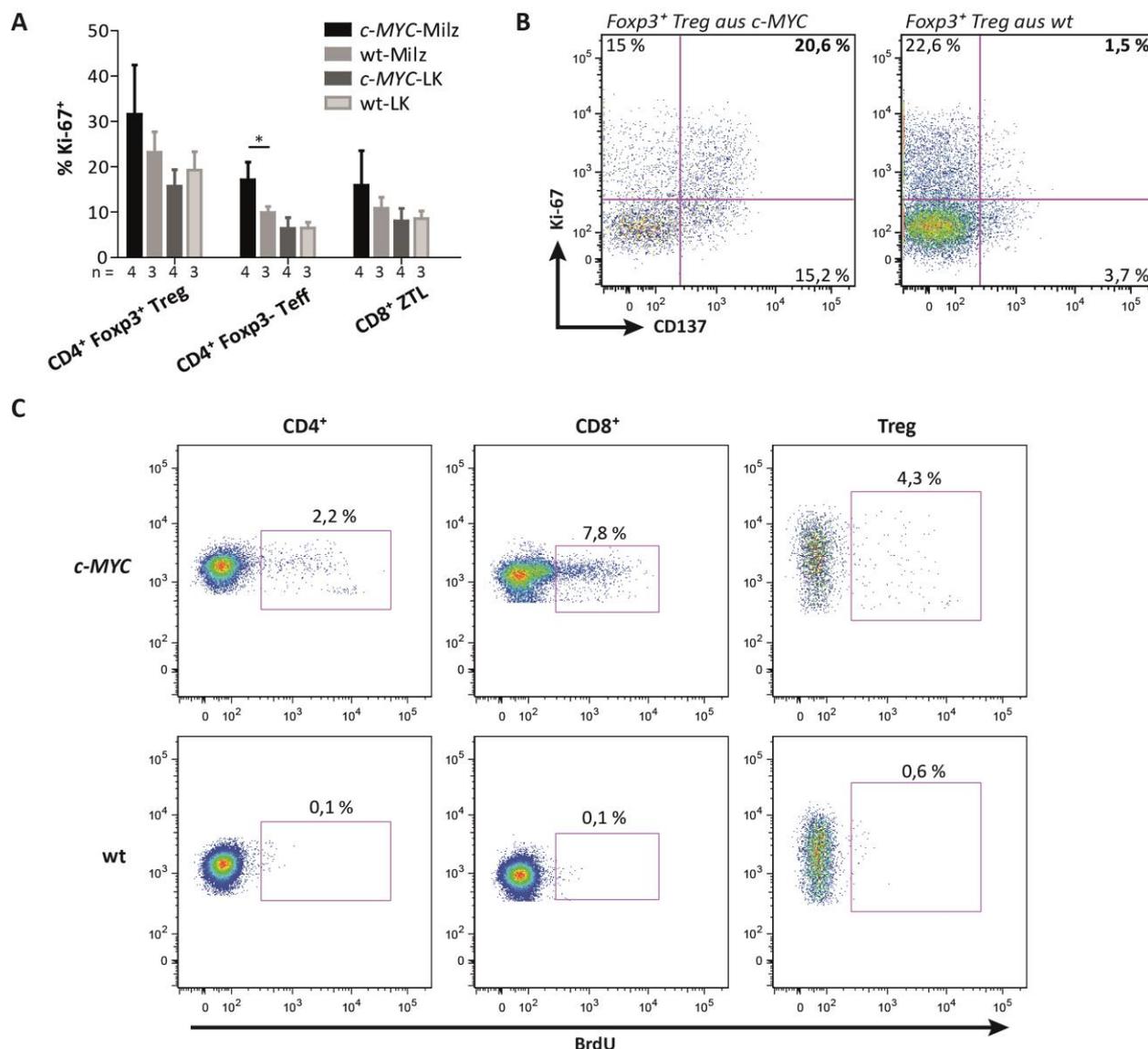


Abbildung 10: *In-vivo*-Proliferation der T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren im Vergleich zu wt-T-Zellen. **A)** Anteil Ki-67-positiver Zellen innerhalb der CD4⁺ Foxp3⁺ Treg, CD4⁺ Foxp3⁻ Teff und CD8⁺ ZTL. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet. **B)** Koexpression von Ki-67 und CD137 auf CD4⁺ Foxp3⁺ Treg aus *c-MYC*- und wt-Milzen. **C)** BrdU-Inkorporation. 1,5 mg BrdU wurde in *c-MYC*- und wt-Mäuse i.p. injiziert. Nach drei Stunden wurden die Tiere getötet und der Anteil des eingebauten BrdU mittels intrazellulärer FACS-Analyse in CD4⁺ Foxp3⁺ Treg, CD4⁺ Foxp3⁻ Teff und CD8⁺ ZTL detektiert. Dargestellt sind Zellen aus *c-MYC*- und wt-LK. Repräsentatives Ergebnis von fünf Versuchen.

Wie in Abschnitt 3.2.1 bereits beschrieben wurde, gab es verschiedene Theorien, die den hohen Anteil an Foxp3⁺ Treg in *c-MYC*-Tumoren erklärten. Da nun gezeigt wurde, dass Foxp3⁺ Treg *in vivo* proliferierten (Abbildung 10), der Großteil der intratumoralen Treg zu den Helios⁺ nTreg zählte und die Foxp3-Expression in naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* nicht induziert werden konnte (Abbildung 8), konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass bereits vorhandene, ausdifferenzierte nTreg *in situ* aktiviert wurden und anschließend stark proliferierten.

3.2.4 Immuninhibierende Mechanismen

3.2.4.1 *Expression von IL-10*

Die bisher aufgezeigten Ergebnisse sprechen für das Vorhandensein funktionstüchtiger, proliferierender T-Zellen, die zudem über den TZR aktiviert wurden, im Tumormilieu von *c-MYC*-Mäusen. Da die Depletion von T-Zellen *in vivo* jedoch keinen Effekt auf die Tumorentstehung zeigte, wurde nach immunregulierenden Mechanismen gesucht. Dabei wurden über den TZR stimulierte Foxp3⁺ Treg in der CD4⁺ T-Zell-Population detektiert. Eine weitere Möglichkeit, die Entwicklung einer tumorprotektiven Th1-Antwort zu hemmen, ist die Ausschüttung des immunregulierenden Zytokins IL-10. Im Vergleich zu wt-Mäusen produzierten CD4⁺ T-Zellen in *c-MYC*-Tieren deutlich mehr IL-10. Interessant war zudem, dass neben CD4⁺ T-Zellen auch ein Teil der CD8⁺ ZTL mehr IL-10 in *c-MYC*-Tumoren exprimierten als in wt-Organen (Abbildung 11).

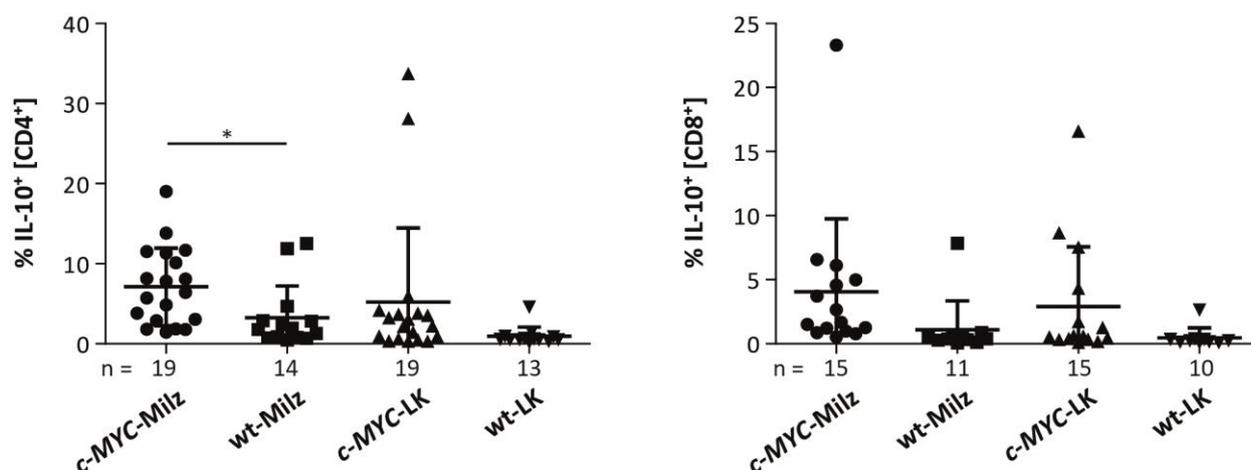


Abbildung 11: IL-10-Expression der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Organen von *c-MYC*- und wt-Tieren. Milz- bzw. LK-Zellen wurden *ex vivo* mit PMA und Ionomycin für vier Stunden bei 37°C stimuliert. Anschließend erfolgten eine Oberflächen- und eine intrazelluläre Färbung. Ein Symbol entspricht einer Maus. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet.

Bei den Messungen von IFN- γ und IL-10 fiel zudem auf, dass innerhalb der CD4⁺ und der CD8⁺ T-Zellen neben den Zellen, die entweder IFN- γ oder IL-10 exprimierten, auch jeweils eine Population vorhanden war, die IFN- γ und IL-10 koproduzierte (Abbildung 12). Dies traf vor allem auf *c-MYC*-Mäuse zu. IL-10 wird im Allgemeinen von T-Effektorzellen sezerniert, um nach erfolgreicher Bekämpfung einer Infektion eine übermäßige, für den Körper gefährlich werdende Immunantwort zu verhindern. Dann wird die Produktion von IFN- γ auf IL-10 umgestellt.

3.2.4.2 Suppressiver Mechanismus der Treg

TGF- β („Transforming Growth Factor beta“) zählt zu den Zytokinen, die wie IL-10 einen suppressierenden Effekt auf das Immunsystem ausüben. Es ist beschrieben, dass TGF- β im peripheren Gewebe die Differenzierung von iTreg aus naiven CD4⁺ T-Zellen induziert. Diese iTreg produzieren TGF- β und IL-10, um so eine effektive T-Zell-Antwort zu hemmen. In *c-MYC*-Tumoren konnte jedoch keine TGF- β -Produktion reproduzierbar nachgewiesen werden (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.1). Allerdings konnten IL-10 exprimierende Foxp3⁺ Treg detektiert werden (Abbildung 12). CD4⁺ T-Zellen, die kein Foxp3, aber IL-10 exprimierten, zählten möglicherweise zu den suppressiven Tr1-Zellen. Zudem wurde geprüft, ob innerhalb der IFN- γ /IL-10-doppelt-positiven CD4⁺ T-Zellen (siehe Abschnitt 3.2.4.1) ebenfalls regulatorische T-Zellen zu finden waren. Der Anteil an Foxp3⁺ IFN- γ ⁺ IL-10⁺ T-Zellen war jedoch sehr gering, was bedeutet, dass der Großteil der IFN- γ ⁺ IL-10⁺ Zellen zu den T-Effektorzellen zählten, die ihre Zytokin-Produktion umgestellt hatten. Allerdings war auffällig, dass in stimulierten CD4⁺ T-Zellen deutlich weniger Foxp3 detektiert werden konnte als in den unstimulierten Kontrollen (nicht gezeigt). Durch die PMA/Ionomycin-Stimulation ging die Foxp3-Expression anscheinend verloren, weshalb in diesem Ansatz nicht alle Foxp3⁺ Treg erfasst und analysiert werden konnten.

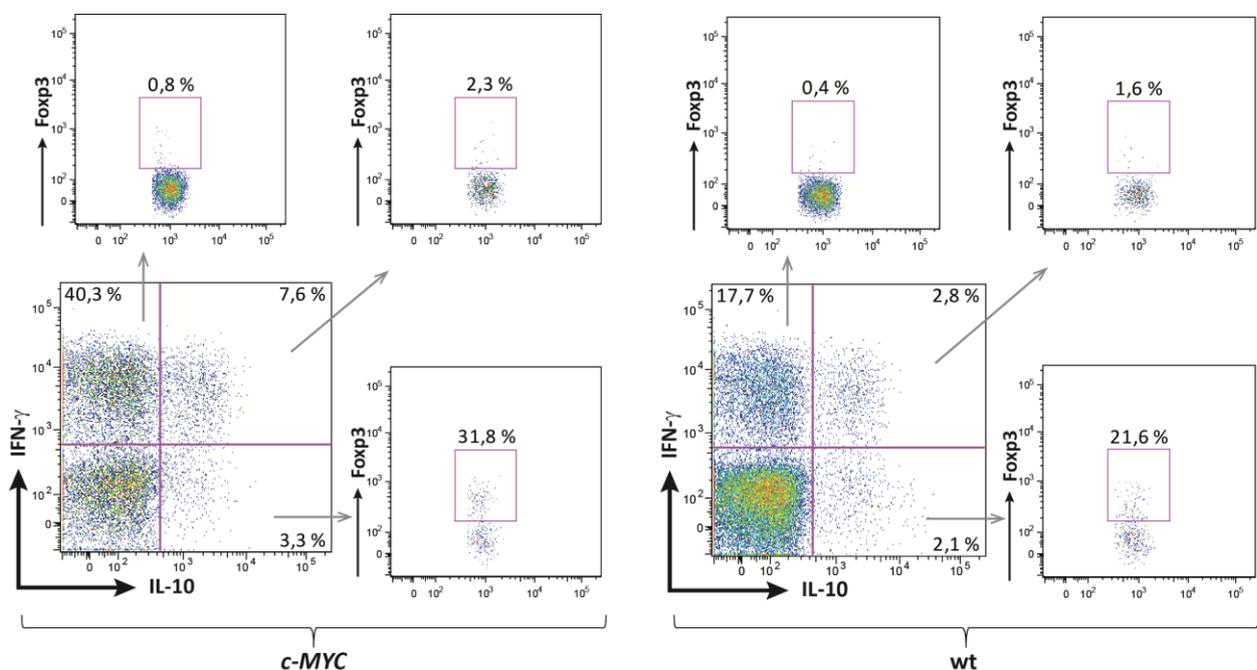


Abbildung 12: IFN- γ produzierende und IFN- γ /IL-10 koproduzierende CD4⁺ T-Effektorzellen, IL-10 produzierende Foxp3⁺ CD4⁺ Treg und IL-10 produzierende Foxp3⁻ CD4⁺ Tr1-Zellen. Dargestellt sind CD4⁺ T-Zellen aus *c-MYC*- und wt-Milz. Zellen wurden *ex vivo* mit PMA und Ionomycin für vier Stunden bei 37°C stimuliert. Anschließend erfolgten eine Oberflächen- und eine intrazelluläre Färbung. Repräsentatives Ergebnis von fünf Versuchen.

3.2.4.3 Koinhibitorische Moleküle auf T-Zellen

Die Funktion der T-Zellen kann auch durch das Anheften spezifischer Liganden an immunregulierende Rezeptoren auf T-Zellen gehemmt werden. Das Molekül CTLA-4 wird von aktivierten T-Zellen auf deren Oberfläche exprimiert und bindet wie CD28 an CD80 und CD86, welche auf DZ zu finden sind, leitet im Gegensatz zu CD28 jedoch ein negatives, inhibierendes Signal an die T-Effektorzelle weiter. CTLA-4 wurde im *c-MYC*-Modell fast ausschließlich auf der Oberfläche von Foxp3⁺ Treg exprimiert (Abbildung 13). Der Anteil der CTLA-4⁺ Treg war im Vergleich zu wt-Mäusen in *c-MYC*-Tieren deutlich erhöht. Sowohl auf Foxp3⁻ CD4⁺ Teff als auch auf CD8⁺ ZTL konnte so gut wie kein CTLA-4 gemessen werden.

Ein weiterer Rezeptor, der die Funktion von T-Effektorzellen negativ reguliert, ist LAG-3. Dieser bindet wie CD4 an MHC-Klasse-II auf APZ. LAG-3 wurde wiederum am stärksten auf Treg in *c-MYC*-Mäusen detektiert. Doch auch CD4⁺ Teff und CD8⁺ ZTL regulierten die LAG-3-Expression im Vergleich zu wt-T-Zellen hoch (Abbildung 13).

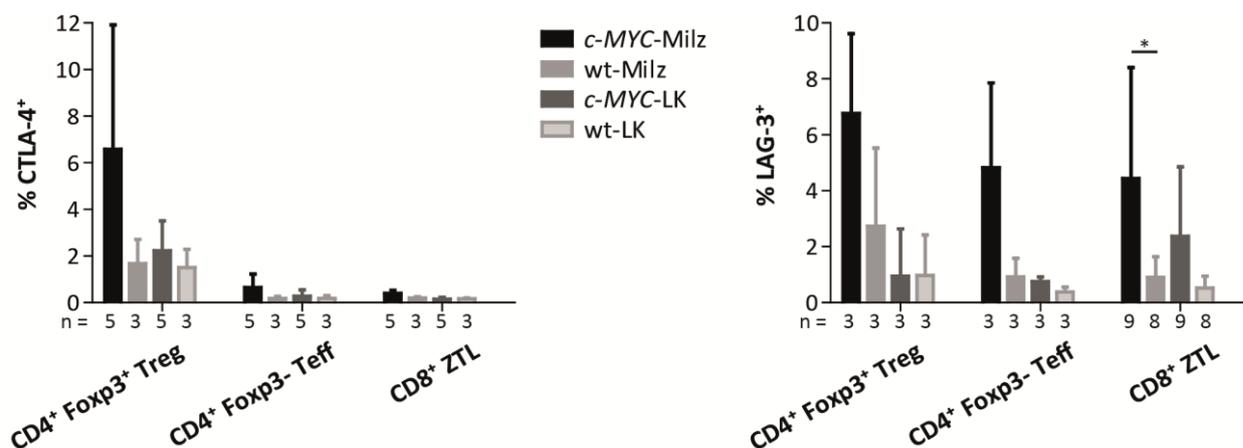


Abbildung 13: Expression der koinhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 und LAG-3 auf intratumoralen T-Zellen im Vergleich zu wt-T-Zellen. Die Expression von CTLA-4 und LAG-3 wurde mittels Oberflächen-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet.

3.2.4.4 PD-1- und PD-L1-Expression

Auch PD-1 ist ein Rezeptor, der T-Zell-Antworten negativ reguliert und auf T-Zellen nach einer TZR-vermittelten Aktivierung exprimiert wird. Geraten T-Zellen durch ständige Antigen-Stimulation in einen erschöpften Zustand, korreliert die Höhe der PD-1-Expression mit dem Grad der Erschöpfung.

T-Zellen mit einer mittleren Expression von PD-1 (= PD-1^{mittel}) können beispielsweise durch PD-1-Blockade wieder reaktiviert werden, während bei T-Zellen mit manifestierter Erschöpfung und hoher PD-1-Expression (= PD-1^{hoch}) eine Reaktivierung durch Blockierung des PD-1/PD-L1-Signalwegs nicht mehr möglich ist. Auch in den Tumoren der *c-MYC*-Mäuse konnten die CD4⁺ T-Zellen (sowohl die Foxp3⁺ Treg als auch die CD4⁺ Foxp3⁻ Teff) in PD-1^{hoch}, PD-1^{mittel} und PD-1^{negativ} eingeteilt werden (Abbildung 14 A und C). Dabei wurde der größte Anteil an PD-1^{hoch} Zellen innerhalb der CD4⁺ Foxp3⁺ Treg gemessen (Abbildung 14 B). Zudem war der Anteil an PD-1^{hoch} Treg in *c-MYC*-Milzen durchschnittlich etwa dreimal so hoch wie in wt-Milzen. In den LK konnten ebenfalls tendenziell mehr PD-1^{hoch} Treg in *c-MYC*- als in wt-Mäusen detektiert werden. CD4⁺ Teff exprimierten sowohl in *c-MYC*- als auch in wt-Tieren im Durchschnitt weitaus weniger PD-1^{hoch} als Treg. Doch auch hier war der PD-1^{hoch}-Anteil in *c-MYC*-Milzen und -LK leicht erhöht (Abbildung 14 D).

Innerhalb der Treg-Population wurden mehr PD-1^{mittel} als PD-1^{hoch} Zellen detektiert, wobei der PD-1^{mittel}-Anteil wiederum in *c-MYC*-Tumoren höher war als in wt-Tieren. Dasselbe Bild zeigte sich bei den Foxp3⁻ CD4⁺ Teff. Insgesamt fiel die Expression von PD-1^{mittel} auf den CD4⁺ Teff geringer aus als bei Treg.

Bei CD8⁺ ZTL konnten keine eindeutigen Populationen mit hoher bzw. mittlerer PD-1-Expression eingeteilt werden, weshalb nur die PD-1^{positiven} (= PD-1⁺) CD8⁺ T-Zellen betrachtet wurden (Abbildung 14 E und F). Auch hier wurde sowohl in Milz als auch in LK aus *c-MYC*-Tieren ein höherer Anteil an PD-1⁺ CD8⁺ Zellen als in wt-Mäusen detektiert.

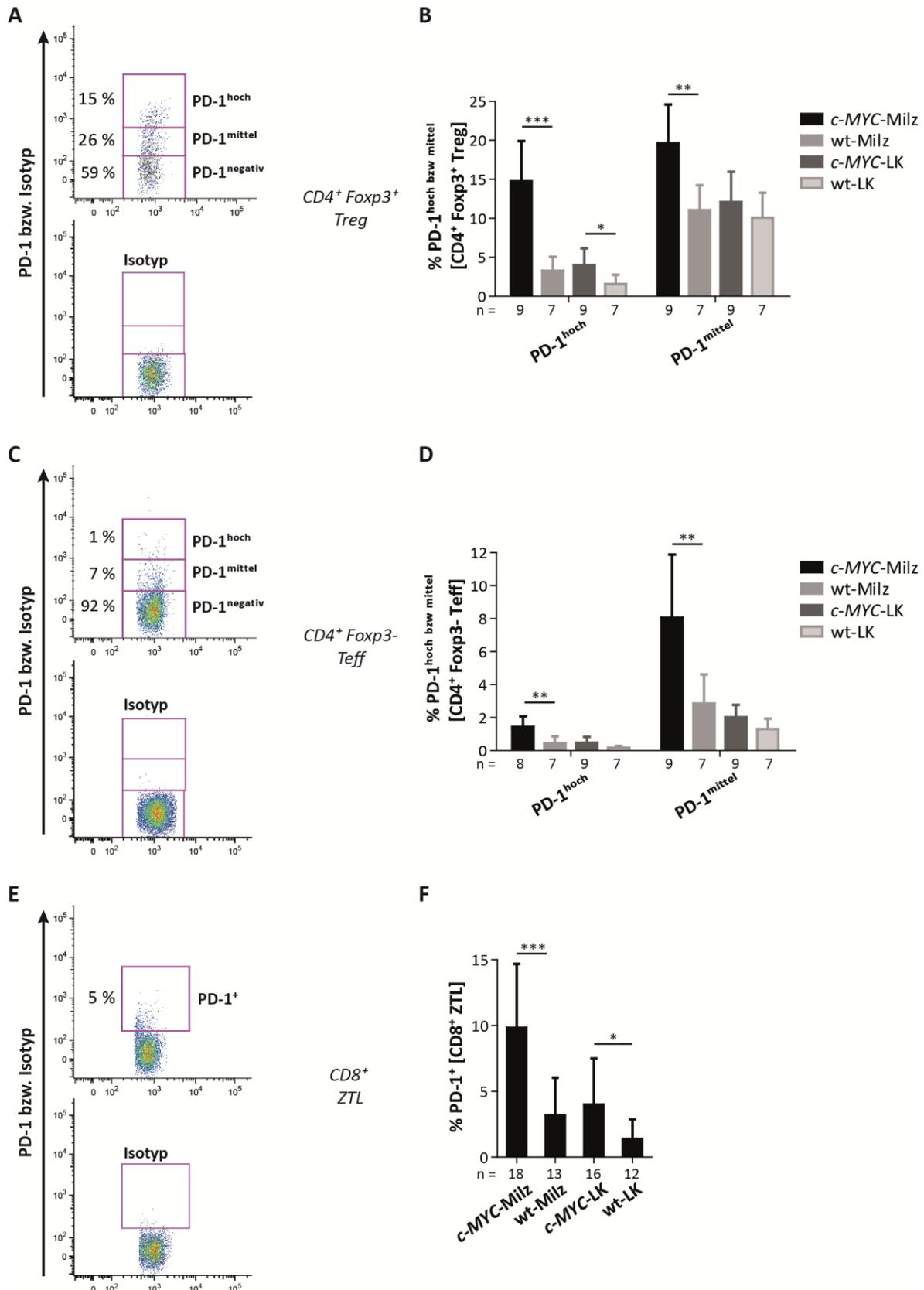


Abbildung 14: Expression von PD-1 auf CD4⁺ Foxp3⁺ Treg, CD4⁺ Foxp3⁻ Teff und CD8⁺ ZTL aus *c-MYC*- und wt-Mäusen. **A, C**) Einteilung der Foxp3⁺ CD4⁺ Treg und der Foxp3⁻ CD4⁺ Teff in PD-1^{hoch}, PD-1^{mittel} und PD-1^{negativ} Populationen mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle. **E**) Eingrenzung der PD-1⁺ CD8⁺ ZTL mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle. **B, D, F**) Zusammenfassung aller Daten als Balkendiagramme. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet.

Da der koinhibitorische Rezeptor PD-1 auf T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren vorhanden war, stellte sich die Frage, ob der entsprechende Ligand ebenfalls zu finden war. Der Ligand PD-L1 (auch B7-H1) wurde in *c-MYC*-Mäusen im Vergleich zu wt-Tieren deutlich mehr auf der Oberfläche von CD4⁺ Teff und vor allem auf DZ (CD11c⁺) exprimiert (Abbildung 15). Auf Foxp3⁺ Treg, ZTL und B-Zellen (B220⁺) konnte PD-L1 zwar detektiert, jedoch kein bzw. kaum ein Unterschied zu wt-Tieren festgestellt werden.

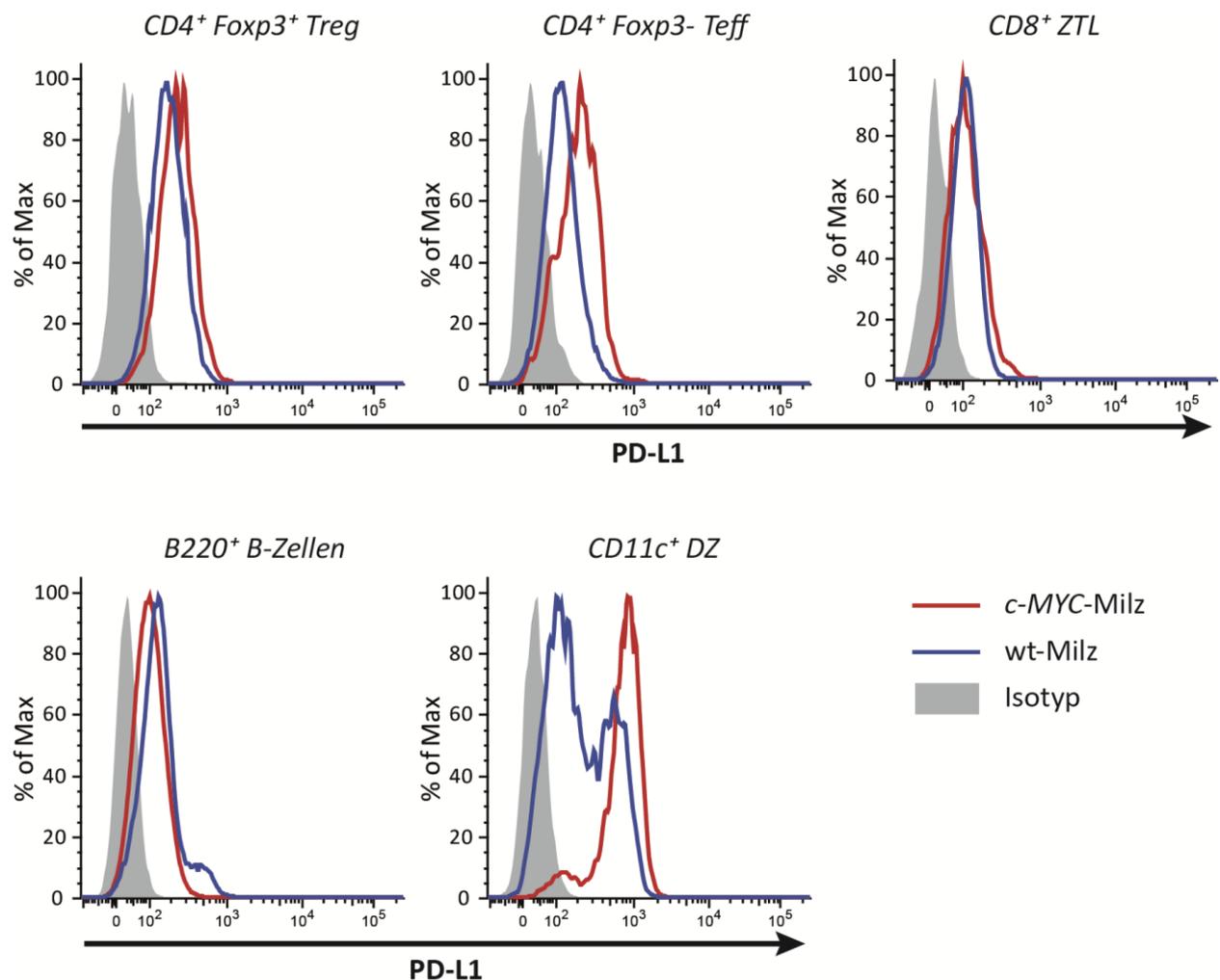


Abbildung 15: PD-L1-Expression auf Foxp3⁺ Treg, CD4⁺ Teff, CD8⁺ ZTL, B220⁺ B-Zellen und CD11c⁺ DZ. Die Expression von PD-L1 wurde mittels Oberflächen-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative Histogramme aus drei bis fünf Versuchen.

In Abschnitt 3.1.1 wurde bereits gezeigt, dass intratumorale T-Zellen IFN- γ exprimieren. Da PD-1 jedoch als Erschöpfungsmarker gilt und erschöpfte T-Zellen u.a. die IFN- γ - und IL-2-Produktion reduzieren, wurde nun die Expression verschiedener Zytokine innerhalb der verschiedenen PD-1-Populationen von CD4⁺ T-Zellen analysiert. Die immunstimulierenden Zytokine IFN- γ und IL-2 wurden

innerhalb der CD4⁺ Population am meisten von PD-1^{mittel} T-Zellen produziert – sowohl in *c-MYC*- als auch in wt-Tieren (Abbildung 16). Der einzige große Unterschied zwischen *c-MYC*- und wt-Mäusen wurde bei den PD-1^{negativ} T-Zellen beobachtet. PD-1^{negativ} Zellen aus *c-MYC*-Milzen sezernierten deutlich mehr IFN- γ als jene aus wt-Tieren. Das bedeutet, dass die gesteigerte IFN- γ -Expression innerhalb der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation aus *c-MYC*-Mäusen (siehe Abschnitt 3.1.1) dieser PD-1^{negativ} Gruppe zuzuordnen war. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den IL-2-Werten. Im Gegensatz zu IFN- γ und IL-2 wurde das immuninhibitorische Zytokin IL-10 vor allem in der PD-1^{hoch} CD4⁺ Population kranker *c-MYC*- und gesunder wt-Mäuse nachgewiesen. PD-1^{negativ} T-Zellen exprimierten dagegen so gut wie kein IL-10, während in der PD-1^{mittel} Population mittlere IL-10-Werte detektiert wurden.

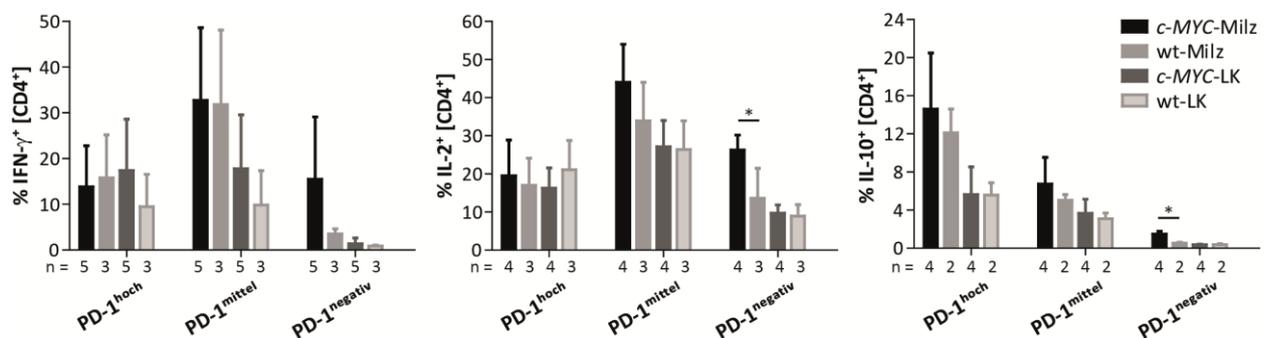


Abbildung 16: IFN- γ -, IL-2- und IL-10-Produktion innerhalb der PD-1^{hoch}, PD-1^{mittel} und PD-1^{negativ} Population der CD4⁺ T-Zellen. Milz- und LK-Zellen aus *c-MYC*- und wt-Mäusen wurden *ex vivo* mit PMA und Ionomycin für vier Stunden bei 37°C stimuliert. Anschließend erfolgten eine Oberflächen- und eine intrazelluläre Färbung. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes berechnet.

Wie oben gezeigt, exprimierten vor allem Treg PD-1 (siehe Abbildung 14). Bei den oben durchgeführten Färbungen (Zytokine mit PD-1, siehe Abbildung 16) wurde Foxp3 jedoch nicht angefärbt. Es wurde lediglich zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden. Zudem waren in *c-MYC*- und wt-Organen IL-10-produzierende Foxp3⁺ Treg vorhanden (siehe Abbildung 12). Innerhalb der oben beschriebenen IL-10⁺ PD-1^{hoch/mittel} CD4⁺ T-Zellen befanden sich demnach auch Foxp3⁺ Treg.

Es wird beschrieben, dass erschöpfte T-Zellen verschiedene koinhibitorische Moleküle gleichzeitig auf ihrer Oberfläche exprimieren und so von aktivierten T-Zellen, die PD-1 ebenfalls hochregulieren, unterschieden werden können. So wurden in *c-MYC*-Milzen innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation PD-1⁺ Zellen detektiert, die auch LAG-3 exprimierten (Abbildung 17 A). In wt-Tieren dagegen waren diese ZTL nicht zu finden. PD-1⁺ LAG-3⁺ ZTL entsprachen demnach T-Zellen im erschöpften Zustand.

Auf Foxp3⁺ Treg wurde eine Koexpression von PD-1 und CD137 sowohl in *c-MYC*-Mäusen als auch zu einem geringeren Anteil in wt-Tieren detektiert (Abbildung 17 B). Da PD-1 auf Treg zu einer Verstärkung der suppressiven Aktivität führt und CD137 nach TZR-vermittelter Stimulation hochreguliert wird, exprimierten Treg anscheinend nach spezifischer Aktivierung über den TZR PD-1, um ihre Funktion noch zu verstärken.

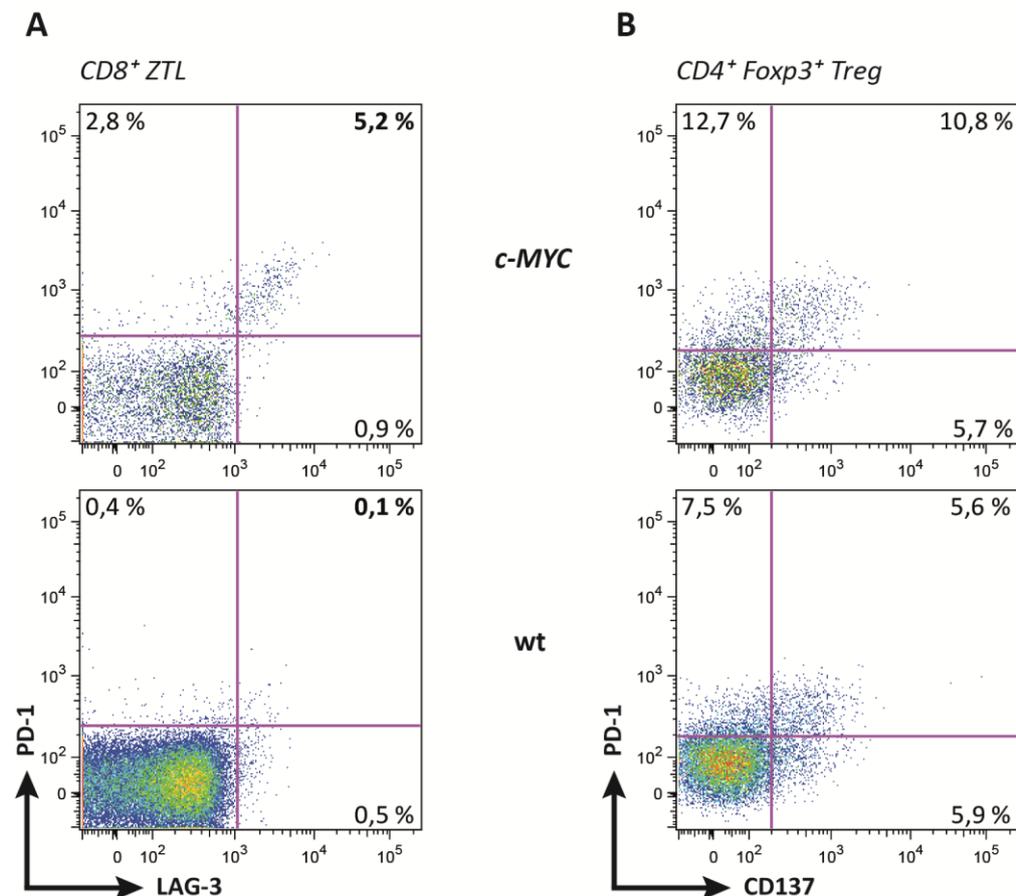


Abbildung 17: Koexpression von **A)** PD-1 und LAG-3 auf CD8⁺ ZTL und **B)** PD-1 und CD137 auf Foxp3⁺ Treg. Dargestellt sind T-Zellen aus *c-MYC*- und wt-Milzen. Repräsentative Ergebnisse von bis zu acht Versuchen.

3.3 Stimulierbarkeit intratumoraler T-Zellen

3.3.1 Verminderte Stimulierbarkeit der T-Effektorzellen

In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass T-Zellen in erkrankten *c-MYC*-Tieren proliferierten und IFN- γ und IL-2 produzierten. Gleichzeitig exprimierten intratumorale T-Zellen aber auch die Rezeptoren PD-1, CTLA-4 und LAG-3, welche als Erschöpfungsmarker gelten. Alle Zytokin-Messungen wurden nach

Stimulation *ex vivo* mit PMA und Ionomycin durchgeführt, was jedoch die natürliche T-Zell-Aktivierung, wie sie *in vivo* abläuft, umgeht. T-Zellen werden über die Bindung eines spezifischen Antigens an den TZR aktiviert. Es stellte sich nun die Frage, ob sich T-Zellen aus *c-MYC*-Tumoren auch dann noch stimulieren lassen, wenn statt PMA und Ionomycin anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper verwendet werden. Diese *In-vitro*-Stimulation entspricht eher der Situation *in vivo*. Als Maß der Stimulierbarkeit wurde die Proliferation der T-Zellen gemessen.

Milz- und LK-Zellen aus *c-MYC*- und *wt*-Mäusen wurden mit CFSE gefärbt und *in vitro* mit anti-CD3/anti-CD28-AK sowie rIL-2 kultiviert. Nach drei Tagen wurde am Durchflusszytometer anhand des CFSE-Verlusts die Proliferation der drei T-Zell-Subpopulationen Foxp3⁺ Treg, CD4⁺ Teff und CD8⁺ ZTL analysiert. Alle drei T-Zell-Population aus *c-MYC*-Milzen zeigten dabei eine deutlich verminderte Proliferation im Vergleich zu T-Zellen aus *wt*-Milzen (Abbildung 18 A), während bei den LK kein Unterschied zwischen *c-MYC*- und *wt*-Mäusen festgestellt wurde (Abbildung 18 B). Da Erschöpfung mit verminderter Proliferation einhergeht, befand sich ein Teil der T-Zellen aus Tumor-Milzen offenbar bereits in einem erschöpften oder anergen Zustand.

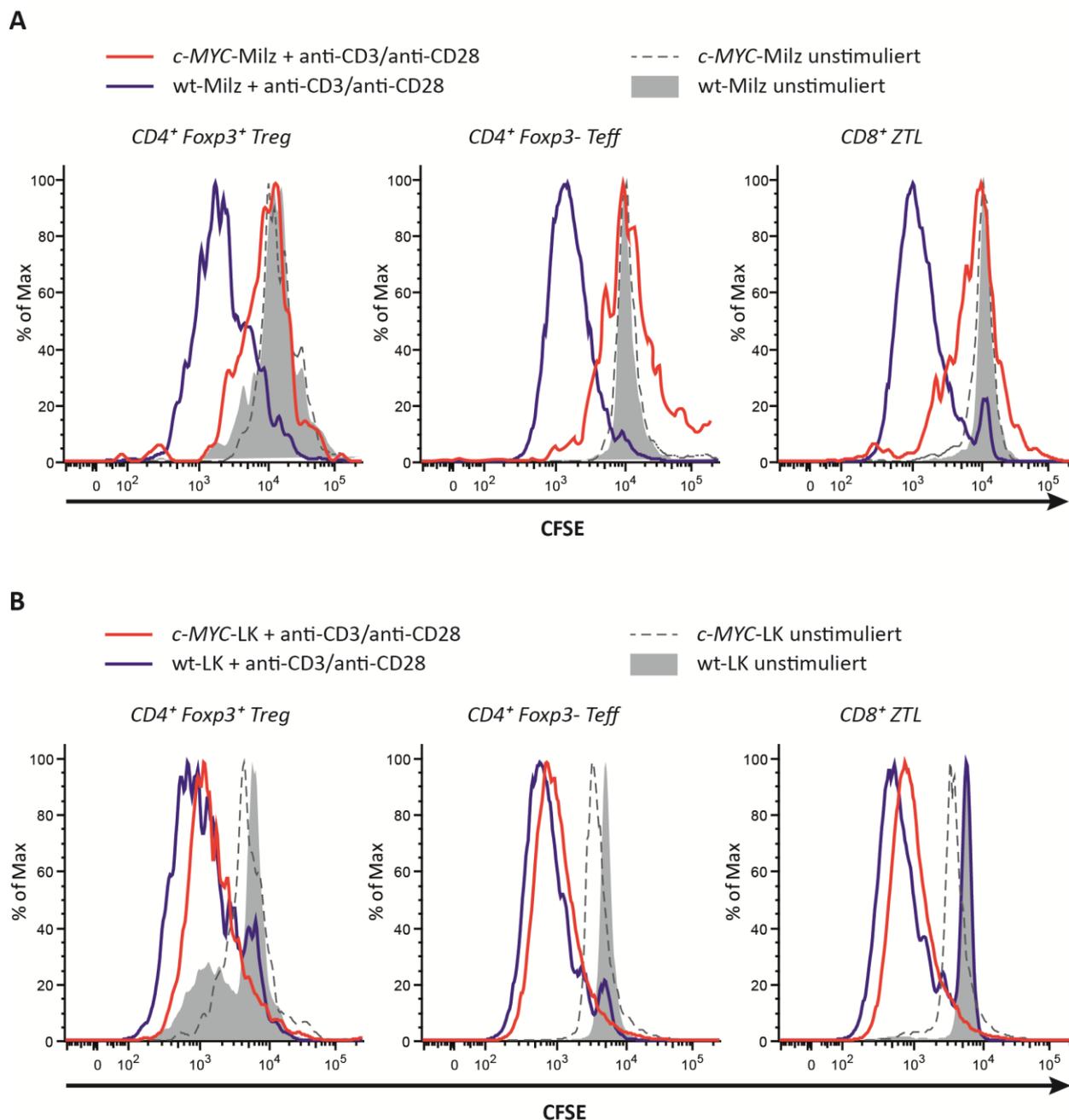


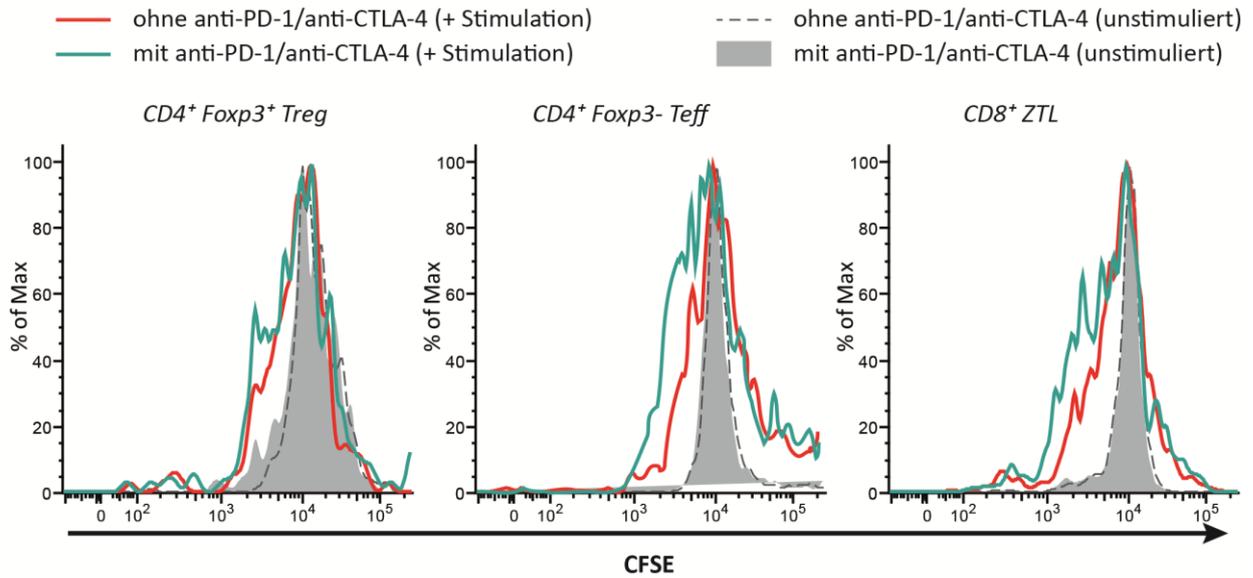
Abbildung 18: T-Zellen aus *c-MYC*-Milzen lassen sich *in vitro* deutlich schlechter stimulieren als wt-T-Zellen. Zellen aus Milz (**A**) und LK (**B**) wurden mit CFSE markiert und drei Tage mit immobilisierten anti-CD3/anti-CD28-AK sowie rIL-2 stimuliert. Die Kontrollen wurden ohne anti-CD3/anti-CD28-Stimulation kultiviert. Anschließend wurde die CFSE-Verdünnung mittels FACS-Analyse und somit die Proliferation der T-Zellen detektiert. Repräsentative Histogramme aus drei Versuchen.

3.3.2 Blockierung koinhibitorischer Signalwege

In der Literatur ist beschrieben, dass die Blockierung von koinhibitorischen Signalwegen erschöpfte oder anerge T-Zellen reaktivieren kann, was zu einer Verminderung des Tumorwachstums und/oder einer effektiven Bekämpfung des Tumors führen kann. Dabei werden bessere Ergebnisse erzielt,

wenn zeitgleich zwei oder mehr Mechanismen blockiert werden. Da T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren eine hohe Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 aufwiesen (siehe Abschnitt 3.2.4), wurden der *In-vitro*-Kultur mit anti-CD3/anti-CD28-Stimulation blockierende Antikörper, die gegen PD-1 und CTLA-4 gerichtet waren, zugegeben. In der Tat konnte bei CD4⁺ Teff und CD8⁺ ZTL aus *c-MYC*-Milzen durch die Zugabe von anti-PD-1- und anti-CTLA-4-Antikörpern eine vermehrte Proliferation *in vitro* detektiert werden im Vergleich zu Kulturen ohne Antikörper. T-Effektorzellen, die sich in einem erschöpften Zustand befanden und *in vitro* kaum noch stimulierbar waren (Abbildung 18), konnten durch PD-1/CTLA-4-Blockade reaktiviert werden (Abbildung 19 A). T-Zellen aus wt-Mäusen und aus den LK kranker *c-MYC*-Tiere, deren Stimulierbarkeit nicht eingeschränkt war, zeigten wie zu erwarten mit anti-PD-1- und anti-CTLA-4-AK-Zugabe keine Veränderungen (Abbildung 19 B). Doch auch die Proliferation der Treg konnte so nicht beeinflusst werden.

A *c-MYC-Milz:*



B *c-MYC-LK:*

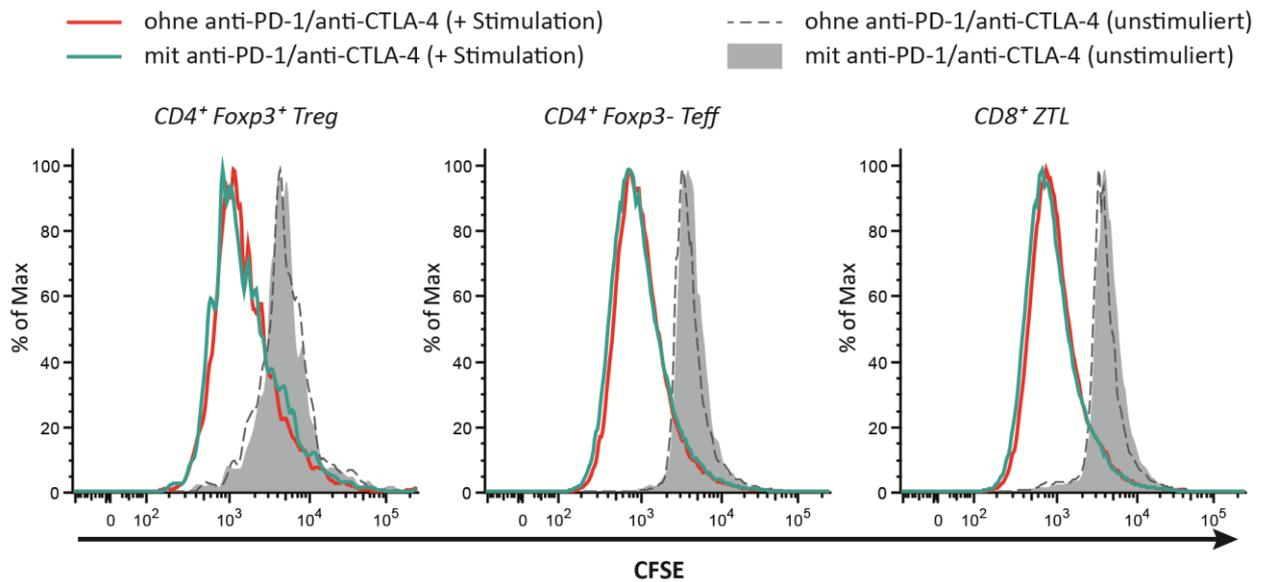


Abbildung 19: Durch Zugabe blockierender Antikörper, die gegen PD-1 und CTLA-4 gerichtet sind, kann die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen *in vitro* erhöht werden. Milz- (A) und LK-Zellen (B) aus *c-MYC*-Mäusen wurden mit CFSE markiert und drei Tage mit immobilisierten anti-CD3/anti-CD28-AK sowie rIL-2 stimuliert. Die Kontrollen wurden ohne anti-CD3/anti-CD28-Stimulation kultiviert. Anschließend wurde die CFSE-Verdünnung mittels FACS-Analyse und somit die Proliferation der T-Zellen detektiert. Repräsentative Histogramme aus zwei Versuchen.

3.4 Therapieansätze *in vivo*

3.4.1 Blockierung von PD-1 und CTLA-4

3.4.1.1 *Verbessertes Überleben durch anti-PD-1/anti-CTLA-4-Therapie*

In den *In-vitro*-Stimulationsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der T-Zellen aus *c-MYC*-Milzen durch Blockierung von PD-1 und CTLA-4 verbessert werden konnte (Abbildung 19). Nun wurde dieses System *in vivo* angewandt. Noch gesunde *c-MYC*-Mäuse (etwa ab Tag 55 nach Geburt) wurden mit denselben blockierenden Antikörpern behandelt, wobei anti-PD-1 und anti-CTLA-4 in Kombination oder jeweils als Monotherapie gegeben wurde. Jeweils 100 µg monoklonaler Antikörper (mAK) wurde einmal wöchentlich über vier Wochen i.p. appliziert. Verglichen mit unbehandelten *c-MYC*-Mäusen zeigten die mit anti-PD-1- und anti-CTLA-4-Antikörpern behandelten Tiere ein signifikant verbessertes Überleben (Abbildung 20). Im Mittel erreichten die behandelten *c-MYC*-Mäuse ein Alter von 212 Tagen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen mit einem Alter von durchschnittlich 99 Tagen.

Monotherapien mit anti-PD-1 oder CTLA-4 führten zu keiner Überlebensverlängerung. Diese Tiere erkrankten etwa zeitgleich mit den unbehandelten Kontrollen.

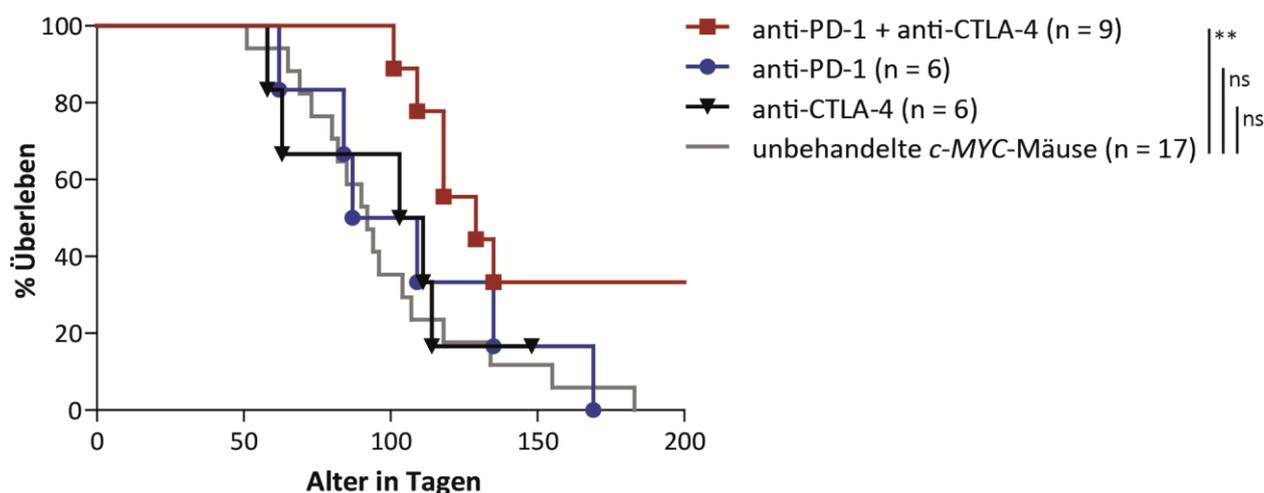


Abbildung 20: Verbessertes Überleben der *c-MYC*-Mäuse nach Behandlung mit blockierenden anti-PD-1- und anti-CTLA-4-AK. Noch gesunde *c-MYC*-Mäuse erhielten ab ca. Tag 55 nach Geburt jeweils 100 µg anti-PD-1- bzw. anti-CTLA-4-AK i.p., entweder zusammen als Kombinationstherapie (rote Linie) oder jeweils als Monotherapie (blaue Linie = anti-PD-1 alleine, schwarze Linie = anti-CTLA-4 alleine). Als Kontrolle dienten unbehandelte *c-MYC*-Mäuse (graue Linie). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Log-Rank-Testes bestimmt.

3.4.1.2 Treg nach anti-PD-1/anti-CTLA-4-Therapie

Um zu prüfen, welche Auswirkungen eine anti-PD-1/anti-CTLA-4-Kombinationstherapie auf T-Zellen in *c-MYC*-Mäusen hatte, wurden zwei erkrankten, anti-PD-1/anti-CTLA-4-behandelten Mäusen Milz und LK entnommen und analysiert. So wurde in den Tumoren dieser Tiere ein weitaus geringerer Anteil an CD4⁺ Foxp3⁺ Treg festgestellt als in unbehandelten, kranken *c-MYC*-Mäusen und als in wt-Mäusen (Abbildung 21). Die Blockierung von PD-1 und CTLA-4 beeinflusste anscheinend vor allem Foxp3⁺ Treg.

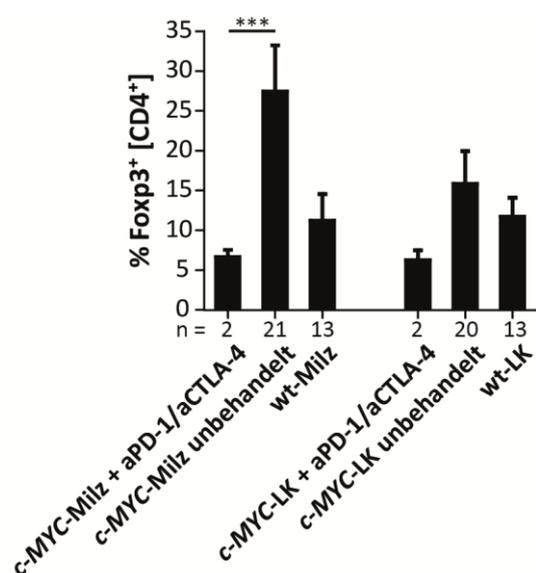


Abbildung 21: Verringerter Anteil CD4⁺ Foxp3⁺ Treg in mit anti-PD-1/anti-CTLA-4-AK behandelten, tumortragenden *c-MYC*-Mäusen im Vergleich zu kranken *c-MYC*- und gesunden wt-Tieren. Die Signifikanz wurde mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt.

3.4.2 Treg-Depletion in DEREK/*c-MYC*-Mäusen

Es wurde gezeigt, dass sich in Tumoren des *c-MYC*-Modells ein hoher Anteil aktivierter, regulatorischer Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen befand (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2). Treg supprimieren effektive Immunantworten, weshalb erwartet wurde, dass nach Depletion der Treg aktivierte Immunzellen weniger stark gehemmt werden und so die Tumorentstehung hinausgezögert wird. In früheren Arbeiten konnte bereits beobachtet werden, dass *c-MYC*-Mäuse ein deutlich verlängertes Überleben zeigten, wenn sie frühzeitig mit einem blockierenden anti-CD25-Antikörper therapiert wurden (Brenner 2009). Da jedoch nicht nur Foxp3⁺ Treg CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) auf ihrer Oberfläche exprimieren, sondern auch aktivierte T-Effektorzellen, könnten dadurch auch diese

Zellen depletiert werden. Es wurde ein Modell benötigt, mit welchem ausschließlich Foxp3⁺ Treg eliminiert werden konnten. Daher wurde die *c-MYC*-transgene Mauslinie mit DREG-Mäusen gekreuzt und im Folgenden als DREG/*c-MYC*-Mäuse bezeichnet. DREG-Mäuse tragen das Gen für den DTR, an dem zugleich GFP gekoppelt ist. Dieses Fusionsprotein befindet sich unter der Kontrolle des *foxp3*-Genlocus. Somit können GFP⁺ Foxp3⁺ Treg einerseits über den FITC-Kanal am FACS detektiert werden, andererseits mittels Injektion von DT *in vivo* depletiert werden.

Die Treg-Depletion in DREG/*c-MYC*-Mäusen wurde ab ca. Tag 55 begonnen, bevor erste Krankheitszeichen auftauchten. Bei den ersten Versuchen wurde jeweils 1 µg DT i.p. injiziert. Wie es im Protokoll von Lahl und Sparwasser (2011) beschrieben wird, erhielten die Mäuse im einwöchigen Abstand an zwei aufeinander folgenden Tagen drei Wochen lang DT, also insgesamt sechs Injektionen. Allerdings wurden bei dem Großteil der so behandelten Mäuse spätestens nach der 5./6. DT-Gabe starke toxische Nebenwirkungen festgestellt, welche zu massivem Gewichtsverlust führten, so dass die Tiere abgetötet werden mussten. Daraufhin wurde getestet, ob eine geringere Menge DT ausreichte, um Treg zu depletieren. Mit 500 ng DT wurden ebenso viele GFP⁺ Treg abgetötet wie mit 1 µg, weshalb für die weiteren Experimente diese DT-Menge verwendet wurde. Um die Nebenwirkung des DT so gering wie möglich zu halten, wurde zudem der Abstand zwischen zwei Applikationsrunden von einer auf zwei Wochen erhöht.

In Lahl und Sparwasser (2011) wurde veröffentlicht, dass sich depletierte GFP⁺ Treg nach 14 Tagen vollständig erholten und eine ebenso starke Population darstellten wie vor der DT-Gabe. Dabei entwickelte sich zudem eine Treg-Population, die zwar Foxp3⁺ war, aber kein GFP trug, und somit nicht depletiert werden konnte, da der transgene DT-Rezeptor nicht exprimiert wurde. Um nachzuweisen, dass Treg in DREG/*c-MYC*-Mäusen tatsächlich dezimiert wurden, wurde jeweils einen Tag vor und nach jeder DT-Runde Blut aus der Schanzvene entnommen (siehe Injektionsschema in Abbildung 22 A). Mittels Durchflusszytometrie wurde in den Blutproben sodann intrazelluläres Foxp3 und das GFP⁺ DTR-Transgen analysiert. Dabei wurde die Treg-Population in Foxp3⁺/GFP⁺ und Foxp3⁺/GFP⁻ aufgeteilt. Abbildung 22 B und C zeigt, dass nach den ersten beiden DT-Applikationen (= Tag 57) so gut wie keine Treg mehr im Blut vorhanden waren – weder GFP⁺ noch GFP⁻. Nach zwei Wochen (= Tag 68) war der Anteil Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen jedoch wieder genauso hoch wie an Tag 54, wobei nun zudem eine relativ große Foxp3⁺/GFP⁻ Population (durchschnittlich 3%) auftauchte. Durch DT-Gabe drei und vier konnten die GFP⁺ Treg erneut fast komplett depletiert werden (= Tag 71). Doch auch Foxp3⁺ Zellen ohne DTR wurden stark dezimiert. Überraschend war jedoch, dass die fünfte und sechste DT-Injektion auf beide Treg-Populationen keinerlei Auswirkungen mehr hatte. Vor wie nach DT-Applikation betrug der Anteil Foxp3⁺/GFP⁺ und auch

Foxp3⁺/GFP⁻ Treg jeweils etwa 4 %. GFP⁺ Treg konnten möglicherweise aufgrund der Bildung von anti-DT-Antikörpern nicht mehr depletiert werden.

Die Überlebenskurve der Treg-depletierten DEREK/*c-MYC*-Mäuse ist in Abbildung 22 D dargestellt. Als Kontrollen dienten dabei folgende Gruppen: unbehandelte *c-MYC*-Mäuse, unbehandelte DEREK/*c-MYC*-Mäuse, deren Treg nicht depletiert wurden, und *c-MYC*-Tiere, denen DT appliziert wurde. Bei letzterer Gruppe hatten die DT-Injektionen jedoch keine Auswirkungen auf die Treg-Population, da diese Mäuse kein DEREK-Transgen und somit keine DT-Rezeptoren trugen. Im Vergleich zu unbehandelten *c-MYC*-Mäusen mit einem durchschnittlichen Alter von 99 Tagen zeigten Treg-depletierte DEREK/*c-MYC*-Tiere, welche im Schnitt an Tag 137 erkrankten, ein geringfügig, jedoch signifikant verbessertes Überleben.

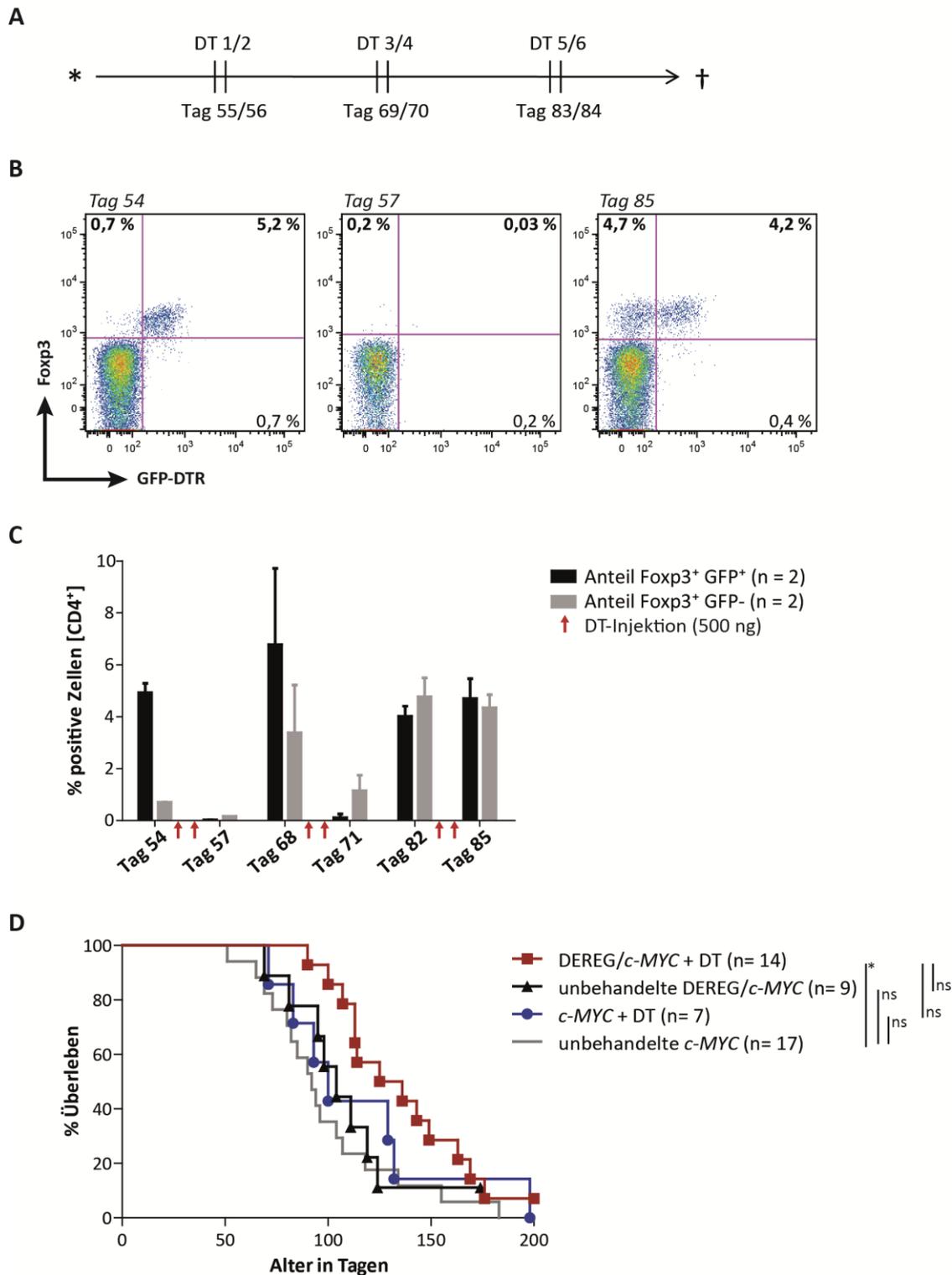


Abbildung 22: Treg-Depletion *in vivo* in Dereg/*c-MYC*-Mäusen. Mäuse erhielten jeweils 500 ng DT i.p. an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zwei-Wochen-Abstand. Insgesamt gab es drei Injektionsrunden. **A)** Injektionsschema. Die Treg-Depletion wurde im Blut jeweils einen Tag vor und nach jeder DT-Runden kontrolliert. **B)** Erfolgreiche Treg-Depletion nach der ersten DT-Runde und das Entstehen einer Fopx3⁺ GFP⁻ Population. **C)** Die Anteile der Fopx3⁺ GFP⁺ und der Fopx3⁺ GFP⁻ Populationen im Verlauf der DT-Behandlung. Die roten Pfeile kennzeichnen die DT-Injektionen. **D)** Leicht verbessertes Überleben der DT-behandelten Dereg/*c-MYC*-Mäuse (rot) im Vergleich zu unbehandelten Dereg/*c-MYC*-Tieren (schwarz) und DT-behandelten (blau) und unbehandelten (grau) *c-MYC*-Mäusen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Log-Rank-Testes bestimmt.

4 DISKUSSION

4.1 Intratumorale T-Zellen übernehmen keine Immun-überwachende Funktion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem *c-MYC*-Lymphom-Mausmodell gearbeitet, da spontan entstehende Tumoren die klinische Situation im Menschen besser widerspiegeln als transplantierte Tumoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen aus kranken *c-MYC*-Mäusen zwar einen aktivierten Phänotyp aufweisen, sie in ihren Effektorfunktionen, nämlich $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion und Zytotoxizität, jedoch stark eingeschränkt sind (Brenner et al. 2010; Przewoznik et al. 2012). $\text{IFN-}\gamma$ ist jedoch für die Stimulation von DZ notwendig. TIDZ sind ebenfalls phänotypisch aktiviert, aber die Expression des immunstimulierenden Zytokins IL-12 ist verringert. Stattdessen produzieren TIDZ mehr immuninhibierendes IL-10. Zudem konnten DZ aus *c-MYC*-Tumoren T-Zellen weniger gut stimulieren als wt-DZ (Naujoks et al., Manuskript eingereicht).

Um eine effektive Antitumor-Antwort von Immunzellen, die zum adaptiven Immunsystem zählen, zu aktivieren, wird die Unterstützung der angeborenen Immunität benötigt. Aktivierte NK-Zellen sind die Hauptproduzenten von $\text{IFN-}\gamma$, was zur Aktivierung von DZ führt. Diese wiederum produzieren IL-12, um T-Zellen zu stimulieren. Da NK-Zellen und DZ in *c-MYC*-Mäusen aber eingeschränkte Effektorfunktionen und eine modulierte Zytokin-Produktion aufwiesen, wurde erwartet, dass intratumorale T-Zellen nicht ausreichend aktiviert werden.

Überraschenderweise wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch festgestellt, dass intratumorale CD4^+ und CD8^+ T-Zellen teilweise sogar mehr $\text{IFN-}\gamma$ als wt-T-Zellen produzieren (Abbildung 4). Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der PMA/Ionomycin-Stimulation erzielt. Zuvor wurden die Zellsuspensionen der Milzen bzw. LK mit Erythrozyten-Lysepuffer behandelt und mit PBS gewaschen. Dadurch gingen die löslichen Bestandteile, die sich im Tumor-Mikromilieu befanden, verloren. Die Stimulation mit PMA und Ionomycin entspricht zudem nicht der T-Zell-Stimulation, wie sie *in vivo* stattfindet. Daher wurden zwei zusätzliche Experimente zur Messung der $\text{IFN-}\gamma$ -Sekretion durchgeführt. T-Zellen wurden einerseits mit PMA/Ionomycin im Tumorüberstand statt in Basismedium (10 % FKS) (2.2.4), andererseits drei Tage mit anti-CD3/anti-CD28-AK (2.2.6) stimuliert. Auch diese beiden Versuche zeigten letztendlich eine höhere $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion der T-Zellen aus *c-MYC*-Tumoren als T-Zellen aus wt-Tieren (Daten nicht gezeigt).

Neben der erhöhten Expression von $\text{IFN-}\gamma$ wiesen die Tumor-infiltrierenden T-Zellen einen aktivierten Phänotyp auf (Abbildung 4 und Abbildung 9), produzierten teilweise auch mehr IL-2 (Abbildung 16), konnten den Inhalt ihrer zytotoxischen Granula freisetzen (Abbildung 5) und

proliferierten *in vivo* (Abbildung 10). Dies sprach alles für das Vorhandensein aktivierter, ausdifferenzierter und funktionaler T-Effektorzellen in kranken *c-MYC*-Mäusen. Auch eine Studie anhand eines Melanom-Transplantations-Modells belegte, dass naive T-Zellen in das Tumorgewebe einwanderten (Thompson et al. 2010). Wenn das spezifische Antigen im Tumor vorhanden war, wurden Tumor-infiltrierende T-Zellen zudem aktiviert, proliferierten *in situ* und übten ihre Effektorfunktionen aus. So produzierten diese aktivierten $CD8^+$ ZTL $IFN-\gamma$ und degranulierten. Wie im *c-MYC*-Modell besaßen Tumor-infiltrierende T-Zellen zwar das Potenzial für eine effektive Antitumor-Aktivität, das Tumorstadium konnten sie jedoch nicht kontrollieren. Möglicherweise war dabei die Absolutzahl funktioneller T-Effektorzellen im Tumorgewebe zu gering oder intratumorale T-Zellen waren erschöpft oder wurden aktiv inhibiert (Thompson et al. 2010). Eine ähnliche Erklärung könnte auch für die T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren zutreffen. Im Gegensatz dazu zeigten im humanen Nierenzellkarzinom Tumor-infiltrierende $CD8^+$ ZTL eine deutlich verringerte Fähigkeit zur Degranulation im Vergleich zu ZTL aus Normalgewebe oder peripherem Blut, aber ebenfalls einen aktivierten Phänotyp (Prinz 2010; Prinz et al. 2012).

Das Tumorstadium können infiltrierende T-Zellen jedoch nicht in Schach halten. Eine frühzeitige Depletion der T-Zellen hatte keinerlei Auswirkung auf den Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs. Die Mäuse entwickelten trotz Verlusts der T-Zellen nicht schneller Tumoren (Abbildung 6). Für die Depletion wurde der pan-T-Zell-Antikörper MmTC verwendet, da er syngene generiert wurde und somit keine anti-Antikörper hervorrufen sollte (Kremmer et al. 1997). Im Gegensatz zu intratumoralen T-Zellen übernahmen NK-Zellen eine Immun-überwachende Funktion. Im frühen Stadium ohne sichtbare Krankheitszeichen waren NK-Zellen in *c-MYC*-Mäusen essenziell für die Kontrolle des Tumorstadiums (Hömberg et al., Manuskript eingereicht; Belting, persönliche Mitteilung; Adam et al. 2005; Brenner et al. 2010).

4.2 Charakterisierung der intratumoralen regulatorischen T-Zellen

Die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen ist eine Immunevasions-Strategie des Tumors. In vielen humanen Tumoren ist der Anteil an Treg im Tumormilieu und im peripheren Blut auf bis zu 20 – 30 % der gesamten $CD4^+$ T-Zell-Population erhöht (Oleinika et al. 2012; Banerjee et al. 2013; Savage et al. 2013). Dabei korreliert eine hohe Frequenz an Treg mit einer schlechten Prognose, beispielsweise bei Gebärmutterhalskrebs, Brustkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Ovarial-, Nierenzell-, Leberzell-, Pankreas- und Magenkarzinom (Oleinika et al. 2012; Banerjee et al. 2013; Savage et al. 2013). Im Gegensatz dazu wird bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, follikulärem

Lymphom, diffus großzelligem B-Zell-Lymphom, Hodgkin-Lymphom oder Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom ein längeres Überleben beobachtet, wenn eine erhöhte Zahl an Treg vorhanden ist. Diese Korrelation wird damit erklärt, dass Treg den Entzündungsprozess, der Tumorzellproliferation, Angiogenese und Metastasen-Bildung fördert, in diesen Tumoren inhibieren (Badoual et al. 2012; Oleinika et al. 2012; Banerjee et al. 2013; Savage et al. 2013).

Auch in *c-MYC*-Tumoren wurde innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population ein sehr hoher Anteil Foxp3⁺ Treg detektiert (Abbildung 7), was dazu führt, dass auftretende Antitumor-Immunreaktionen inhibiert werden und somit die Immuntoleranz im Tumormilieu gefördert wird. Neben T-Effektorzellen werden auch NK-Zellen durch Treg in ihrer Funktion supprimiert (Nishikawa und Sakaguchi 2010; Kerdiles et al. 2013). Wenn *c-MYC*-Mäuse mit dem T-Zell-depletierenden Antikörper MmTC behandelt werden, werden nicht nur T-Effektorzellen eliminiert, sondern auch Treg. Dies könnte einen positiven Effekt auf die NK-Zell-Population ausüben. Der Nachteil, der durch die Depletion der T-Effektorzellen entsteht, wäre durch eine aktivere NK-Zell-Antwort wieder aufgehoben, so dass die Tumorentstehung nicht früher stattfindet.

Die Gruppe der Treg wird in nTreg, die natürlicherweise bereits im Thymus entstehen und differenzieren und den Transkriptionsfaktor Helios exprimieren, und in iTreg, die sich in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen entwickeln, was durch verschiedene Faktoren induziert wird, eingeteilt. Helios wird in iTreg nicht detektiert (Thornton et al. 2010; Oleinika et al. 2012). Als Gründe für die starke Infiltration von Treg in das Tumormilieu werden in der Literatur verschiedene Mechanismen beschrieben. Die erste Möglichkeit ist die aktive Einwanderung bereits vorhandener nTreg, die *in situ* expandieren. Die Neuentstehung von iTreg aus naiven CD4⁺ T-Zellen stellt eine zweite Variante dar (Byrne et al. 2011; Oleinika et al. 2012; Lindau et al. 2013; Savage et al. 2013).

Im *c-MYC*-Modell konnte gezeigt werden, dass Treg in *c-MYC*-Tumoren tendenziell etwas mehr proliferieren als in wt-Mäusen (Abbildung 10) und dass hauptsächlich Helios⁺ nTreg detektiert wurden. In der Literatur wird die Sekretion des Liganden CCL22 durch Tumoren beschrieben, was die aktive Infiltration von Treg, bei denen im Vergleich zu Teff eine höhere Expression des „Homing-Rezeptors“ CCR4 festgestellt wird, in das Tumormilieu begünstigt (Zou 2005; Sakaguchi, S. et al. 2008; Byrne et al. 2011; Oleinika et al. 2012; Lindau et al. 2013; Savage et al. 2013). Allerdings konnte im *c-MYC*-Modell weder der Rezeptor CCR4 auf Treg (Daten nicht gezeigt), noch der Ligand CCL22 in Tumorüberständen detektiert werden (Przewoznik et al. 2012). Zudem war eine Induktion von iTreg aus naiven CD4⁺ T-Zellen in *In-vitro*-Kokulturen nicht möglich. Naive CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen aus wt-Mäusen konnten mit Zellen der 291-Tumorzelllinie nicht dazu induziert werden, Foxp3 zu exprimieren (Abbildung 8). Zusammenfassend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der hohe

Anteil an Foxp3⁺ Treg in den *c-MYC*-Tumoren überwiegend auf die nTreg-Population, die *in situ* proliferierte, zurückzuführen war. Auch in anderen Tumoren, unter anderem im Nierenzellkarzinom, scheint die *De-novo*-Induktion von Treg keinen signifikanten Beitrag zur Treg-Population zu leisten und die Population der nTreg die wichtigere der beiden zu sein (Oleinika et al. 2012).

Es wird diskutiert, ob nTreg und iTreg dieselben oder verschiedene Antigene erkennen. Savage et al. (2013) beschreiben, dass nTreg Selbst-Antigene erkennen, die ihnen während der Reifung im Thymus präsentiert wurden, und sie somit die Immuntoleranz gegen körpereigenes Gewebe aufrechterhalten. Die Induktion von neuen Treg in der Peripherie erfolgt dagegen nach Erkennung körperfremder Antigene, die nicht im Thymus präsentiert werden können. Dies ist wichtig für die Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien oder Nahrungsmitteln. Rekrutierte nTreg müssten also Selbst-Antigene im Tumormilieu erkennen, um aktiviert zu werden. Im *c-MYC*-Modell konnte eine stark erhöhte Expression des Rezeptors CD137 auf *c-MYC*-Treg im Vergleich zu wt-Treg detektiert werden (Abbildung 9). Dies spricht für eine Antigen-spezifische Aktivierung über den TZR. *C-MYC*-Tumoren infiltrierende Treg haben demnach TAA erkannt, was also für nTreg sprechen würde.

Neben Foxp3⁺ nTreg-ähnlichen iTreg gibt es aber auch Foxp3⁻ iTreg. Dazu zählen TGF- β produzierende Th3-Zellen und IL-10 produzierende Tr1-Zellen (Han et al. 2009; Häringer et al. 2009; Cope et al. 2011). Ein reproduzierbarer Nachweis von TGF- β in *c-MYC*-Tumoren war nicht möglich, so dass wahrscheinlich keine Th3-Zellen in *c-MYC*-Mäusen vorkommen. Eindeutig war dagegen die erhöhte IL-10-Sekretion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 11). Bei der CD4⁺ T-Zell-Population wurde zum Teil eine Koexpression mit IFN- γ festgestellt, so dass drei verschiedene Sub-Populationen unterschieden werden konnten: IL-10⁺/IFN- γ ⁻, IL-10⁺/IFN- γ ⁺ und IL-10⁻/IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 12).

- IL-10⁻/IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen repräsentieren vermutlich aktive T-Effektorzellen des Th1-Typs.
- Innerhalb der IL-10⁺/IFN- γ ⁻ Population war ein großer Teil Foxp3⁺ Treg zu finden, welche IL-10 ausschütten, was unabhängig von Zell-Zell-Kontakt zur Unterdrückung von Immunantworten führt (Sakaguchi, S. et al. 2008; Häringer et al. 2009; Nishikawa und Sakaguchi 2010). Die anderen IL-10-Produzenten in dieser Gruppe exprimierten kein Foxp3, weshalb diese den Tr1-Zellen zugeteilt wurden. Tr1-Zellen wurden ursprünglich in *In-vitro*-Systemen generiert und kontrollieren Autoimmunerkrankungen durch IL-10-abhängige Immunsuppression (Häringer et al. 2009; Saraiva und O' Garra 2010).

- Bei den IL-10⁺/IFN- γ ⁺ T-Zellen wurde kaum Foxp3-Expression detektiert. Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob diese Zellen trotz IFN- γ -Produktion ebenfalls zu den regulatorischen, induzierten Tr1-Zellen zählen, oder sie sich von IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen ableiten (Häringer et al. 2009; Saraiva und O' Garra 2010; Cope et al. 2011). IL-10 galt ursprünglich als klassisches Th2-Zytokin, doch es wurde gezeigt, dass auch Th1-Zellen neben IFN- γ auch IL-10 produzieren (Saraiva und O' Garra 2010; Cope et al. 2011). Dies ist der Fall, wenn Th1-Zellen chronisch stimuliert werden, und stellt eine zellintrinsische Selbstregulation dar, um T-Zell-Antworten zu stoppen und das Gewebe vor übermäßiger Immunreaktion zu schützen (O' Garra und Vieira 2007; Trinchieri 2007; Cope et al. 2011).

Auch intratumorale CD8⁺ ZTL wiesen eine Koexpression von IFN- γ und IL-10 auf (Daten nicht gezeigt). Die Zytokinumstellung konnte vor allem bei chronischen Virusinfektionen beobachtet werden (Trinchieri 2007), scheint aber auch im *c-MYC*-Modell eine Rolle bei der Entstehung peripherer Toleranz und der Unterdrückung einer effektiven Antitumor-Immunreaktion zu spielen, da der Anteil IL-10/IFN- γ koproduzierender CD4⁺ T-Zellen in *c-MYC*-Tumoren im Vergleich zu wt-Organen deutlich erhöht ist.

4.3 T-Zell-Erschöpfung durch chronische Stimulation

DZ weisen in einigen soliden Tumoren einen unreifen Phänotyp auf, was sich in einer geringeren Expression von MHC-Klasse-II und der kostimulatorischen B7-Moleküle CD80/CD86 widerspiegelt. Dies führt zu einer verminderten T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Anergie (Sakaguchi, S. et al. 2008; Crespo et al. 2013; Greaves und Gribben 2013). Treg werden im Vergleich zu naiven T-Zellen jedoch auch bei geringen Antigen-Konzentrationen, bei niedriger CD80/CD86- und MHC-II-Expression und fehlender CD40/CD40L-Kostimulation aktiviert und können ihre suppressive Effektorfunktion ausüben (Sakaguchi, S. et al. 2008; Vogel et al. 2013). Dies verschafft ihnen einen deutlichen Vorteil gegenüber naiven Foxp3⁻ T-Zellen.

Im Gegensatz dazu zeigen Tumor-infiltrierende DZ im *c-MYC*-Modell überraschenderweise einen reifen Phänotyp mit erhöhter Expression von CD80/CD86 und MHC-II (Naujoks et al., Manuskript eingereicht). Dies wurde auch bei anderen hämatologischen Tumorerkrankungen, wie etwa beim klassischen Hodgkin-Lymphom (Greaves und Gribben 2013), sowie beim Nierenzellkarzinom (Figel et al. 2011) beobachtet.

Da in *c-MYC*-Mäusen reife, MHC-II-exprimierende TIDZ detektiert wurden und die T-Zellen Aktivierungszeichen zeigen, ist es denkbar, dass durch prolongierte Stimulation die T-Zellen in einen Erschöpfungszustand geraten.

PD-1 wird von T-Zellen nach Antigen-spezifischer Aktivierung über den TZR exprimiert. Die Interaktion mit dem Liganden PD-L1 wandelt in T-Zellen das positive Signal der TZR-Stimulation in ein inhibierendes Signal um, so dass T-Zellen in ihrer Aktivität gehemmt werden oder in Apoptose übergehen (Flies und Chen 2007; Pardoll 2012). Eine effektive Antitumor-Immunantwort wird so unterdrückt. Eine hohe PD-1-Expression gilt als Zeichen der Erschöpfung, was erstmals bei chronischen Virusinfektionen bei Virus-spezifischen PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen festgestellt wurde. Mit fortschreitender Viruslast und somit zunehmender Antigen-Stimulation erhöhen sich der T-Zell-Erschöpfungsgrad und die PD-1-Expression, was zu einem Verlust der Zytokinproduktion und schließlich der Effektorfunktionen führt (Wherry 2011; Badoual et al. 2012; Kaiser et al. 2012). Doch auch bei vielen Tumorerkrankungen konnte gezeigt werden, dass intratumorale T-Zellen vermehrt PD-1 exprimierten und einen erschöpften Zustand aufwiesen, beispielsweise beim Melanom, Prostatakarzinom, Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom, Nierenzellkarzinom und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Ahmadzadeh et al. 2009; Pardoll 2012; Peng et al. 2012; Lyford-Pike et al. 2013).

Im *c-MYC*-Modell existierten verschiedene Populationen mit hoher bzw. mittlerer PD-1-Expression (Abbildung 14). Während die PD-1^{mittel} Population dabei deutlich mehr IFN- γ und IL-2 produzierte als PD-1^{hoch} CD4⁺ T-Zellen, war im Gegensatz dazu die IL-10-Produktion in der PD-1^{hoch} im Vergleich zur PD-1^{mittel} Population erhöht (Abbildung 16). PD-1^{negativ} Zellen sezernierten in *c-MYC*-Milzen deutlich mehr IFN- γ und IL-2 als jene in wt-Mäusen und etwa gleich viel wie PD-1^{hoch} exprimierende T-Zellen. Wt-T-Zellen, bei denen kein PD-1 detektiert wurde, zeigten dagegen insgesamt eine geringere Zytokin-Produktion als PD-1^{hoch} T-Zellen. Zusammenfassend kann behauptet werden, dass CD4⁺ T-Zellen mit einer hohen PD-1-Expression, niedriger IFN- γ - und IL-2-Sekretion und hoher IL-10-Ausschüttung die Gruppe der erschöpften T-Zellen darstellten. Die PD-1^{mittel} T-Zell-Population produzierte dagegen am meisten IFN- γ und IL-2 und intermediäre Mengen an IL-10 und könnte zu den aktiven T-Effektorzellen zählen.

In Patienten mit metastasierendem Melanom zeigten Tumor-infiltrierende T-Zellen ebenfalls eine verringerte IFN- γ - und IL-2-Produktion in der PD-1⁺ Population im Vergleich zu PD-1⁻ T-Zellen (Ahmadzadeh et al. 2009). Eine zweigeteilte PD-1-Expression wurde auch in mit LCMV (lymphozytischem Choriomeningitis-Virus) infizierten Mäusen detektiert, allerdings auf CD8⁺ T-Zellen und nicht wie in *c-MYC*-Tumoren auf CD4⁺ T-Zellen (Blackburn et al. 2010). Virus-spezifische PD-1^{hoch}

CD8⁺ T-Zellen in diesen Mäusen waren funktionell erschöpft. Die Funktion der PD-1^{mittel} CD8⁺ T-Zellen in diesem Modell konnte durch Blockierung des PD-1/PD-L1-Signalwegs *in vivo* reaktiviert werden, die der PD-1^{hoch} Population jedoch nicht (Blackburn et al. 2010; Wherry 2011). Beim humanen Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom konnte in Tumor-infiltrierenden PD-1⁺ T-Zellen dagegen keine Erschöpfung festgestellt werden, wenn nur PD-1 und nicht zusätzlich TIM-3 exprimiert wurde (Badoual et al. 2012). Auch andere Gruppen zeigten die Koexpression von PD-1 und TIM-3 (Sakuishi et al. 2010) oder LAG-3 (Grosso et al. 2009; Woo et al. 2012) auf intratumoralen T-Zellen. Erst die Kombination von mehreren koinhibitorischen Rezeptoren charakterisiert anscheinend den Erschöpfungszustand von T-Zellen im Tumormilieu (Crespo et al. 2013). CD8⁺ T-Zellen im *c-MYC*-Modell exprimierten ebenfalls gleichzeitig PD-1 und LAG-3 (Abbildung 17), doch auch auf CD4⁺ Teff konnten LAG-3 detektiert werden (Abbildung 13).

Dies alles lässt eine zumindest partielle Erschöpfung der intratumoralen T-Effektorzellen vermuten. Bestätigt wurde dies durch die *In-vitro*-Proliferationsversuche (Abbildung 18). Hier wurde beobachtet, dass CD8⁺ ZTL, CD4⁺ Teff und Foxp3⁺ Treg aus *c-MYC*-Milzen nach anti-CD3/anti-CD28-Stimulation deutlich weniger Zellteilung zeigten als T-Zellen aus wt-Mäusen. Intratumorale T-Zellen reagierten nicht mehr auf TZR-Stimulation und waren offenbar erschöpft.

Ein negatives inhibierendes Signal erhalten PD-1-exprimierende T-Zellen jedoch nur nach der Interaktion mit dem entsprechenden Liganden. Der Ligand PD-L1 ist auf Tumorzellen selbst oder auf Tumor-assoziierten APZ zu finden (Kaiser et al. 2012; Kearl et al. 2013). Auch viele Tumorzelllinien exprimieren PD-L1. Die Hochregulation von PD-L1 wird durch IFN- γ induziert, welches von aktivierten Th1- und NK-Zellen stammt. Dies stellt einen negativen Rückkopplungsprozess nach Aktivierung von Immunzellen und eine Immunevasionsstrategie des Tumors dar (Zou 2005; Seliger et al. 2008; Pardoll 2012; Crespo et al. 2013; Greaves und Gribben 2013). Im *c-MYC*-Modell konnte zwar keine erhöhte PD-L1-Expression auf den malignen B-Zellen im Vergleich zu B-Zellen aus wt-Mäusen detektiert werden, doch TIDZ zeigten eine deutlich verstärkte Expression von PD-L1 (Abbildung 15). Es wird beschrieben, dass in B-Zell-Tumoren im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen kaum PD-L1 exprimiert wird (Kearl et al. 2013). Die Interaktion von PD-1 auf T-Zellen mit PD-L1 auf DZ hat aber nicht nur negative Auswirkungen auf die T-Zelle, sondern auch auf die dendritische Zelle. Denn der ausgelöste Signalweg führt zur Inhibierung der IL-12-Produktion durch DZ, welches jedoch für die Entwicklung einer Th1-Antwort notwendig ist (Zou 2005). Eine verminderte Sekretion von IL-12 wurde auch für TIDZ im *c-MYC*-Modell gezeigt (Naujoks et al., Manuskript eingereicht).

4.4 PD-1/CTLA-4-Blockade reaktiviert erschöpfte T-Zellen

Viele präklinische Studien haben gezeigt, dass das Blockieren koinhibitorischer Signalwege mit monoklonalen Antikörpern zu verringertem Tumorwachstum und verlängertem Überleben führt. Die Blockierung des PD-1/PD-L1-Wegs zeigt dabei meist nur dann eine Wirkung, wenn noch weitere Mechanismen beeinflusst werden. Wenn beispielsweise das Melanom mit einem anti-PD-1-Antikörper und zusätzlichem T-Zell-Transfer behandelt wird, kommt es zu erhöhter IFN- γ -Produktion und verlangsamtem Tumorwachstum (Peng et al. 2012). Das gleiche Bild zeigte sich nach PD-1-Blockade mit gleichzeitiger Vakzine-Behandlung beim Kopf-und-Hals-Plattenepithelkarzinom (Badoual et al. 2012). Auch die Behandlung mit einem anti-PD-L1-Antikörper und Lymphozytendepletion führte zur Vernichtung eines etablierten multiplen Myeloms (Kearl et al. 2013). Dai et al. (2013) verwendeten sogar vier Antikörper gleichzeitig (anti-PD-1, -CTLA-4, -CD137 und -CD19), um erfolgreich Ovarialkarzinom und Melanom zu therapieren.

Wie oben bereits beschrieben wurde, sind PD-1^{hoch} T-Zellen im Gegensatz zur PD-1^{mittel} Population durch PD-1/PD-L1-Blockade alleine nicht mehr reaktivierbar. Um diese Subpopulation beeinflussen zu können, müssen weitere Rezeptoren blockiert werden (Blackburn et al. 2010; Wherry 2011). Im *c-MYC*-Modell war eben diese PD-1^{hoch} Population vorhanden, ebenso wie CTLA-4⁺ T-Zellen. Um Tumor-infiltrierende, erschöpfte T-Zellen zu reaktivieren und so eine verbesserte Anti-Tumor Immunantwort zu provozieren, wurden blockierende Antikörper gegen PD-1 und gegen CTLA-4 zunächst *in vitro* verwendet. In der Tat konnte durch Zugabe der anti-PD-1- und anti-CTLA-4-AK ein verbessertes Proliferationsverhalten der intratumoralen T-Zellen nach anti-CD3/anti-CD28-Stimulation beobachtet werden (Abbildung 19). Auch in der Arbeit von Mkrtichyan et al. (2011) wurde eine verminderte Proliferation von angereicherten CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen nach anti-CD3/anti-CD28-Stimulation und Kokultivierung mit Tumorzellen gezeigt, welche durch Zugabe eines anti-PD-1-Antikörpers verbessert werden konnte.

Aufgrund der Beobachtungen im *In-vitro*-Modell wurden junge *c-MYC*-Mäuse, die noch keine Krankheitszeichen zeigten, mit anti-PD-1- und anti-CTLA-4-AK behandelt. Als Vergleichswert diente bei diesem *In-vivo*-Versuch das Überleben unbehandelter *c-MYC*-Mäuse. Auf Kontrolltiere, denen Antigen-unspezifische Antikörper injiziert werden, musste aufgrund des Tierschutzgesetzes und der zusätzlichen Anzahl an Mäusen, die dazu benötigt würde, verzichtet werden. Da es sich um Hamster-IgG-AK handelte, ist es unwahrscheinlich, dass der Fc-Teil des AK an Maus-spezifische Fc-Rezeptoren bindet. Ein *In-vitro*-Ansatz zur Detektion der Bindungsaffinität eines Hamster-AK an FcR⁺ Mauszellen bestätigte dies (Deppisch, persönliche Mitteilung).

Die Behandlung mit den beiden AK in Kombination verschaffte den Tieren einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den unbehandelten *c-MYC*-Mäusen (Abbildung 20). Bei der Monotherapie mit anti-PD-1- oder anti-CTLA-4-AK alleine konnte jedoch kein verlängertes Überleben im Vergleich zu unbehandelten Tieren festgestellt werden. Auch bei Mäusen mit einem transplantierten Tumor zeigte die PD-1-Blockade alleine keine Verbesserung des Überlebens (Mkrtichyan et al. 2011). Erst bei zusätzlicher Applikation von Cyclophosphamid, welches in diesem Modell Treg depletierte, überlebten die Tiere signifikant länger als die Kontrollen. Ein ähnliches Bild ergab die Behandlung eines transplantierten Melanoms mit einer Vakzine und anti-PD-1- und/oder anti-CTLA-4-AK, wobei nur die Kombination der beiden Antikörper zusammen mit der Vakzinierung zu einem verlängerten Überleben führte (Curran et al. 2010). In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass sich der Anteil an Foxp3⁺ CD4⁺ Treg nach PD-1/CTLA-4-Blockade und Vakzinierung deutlich verringerte, während der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen anstieg. Dies wurde auch bei den *c-MYC*-Mäusen beobachtet. In den mit anti-PD-1/anti-CTLA-4-AK behandelten *c-MYC*-Tieren, die trotz Behandlung letztendlich erkrankten, war der Anteil an Foxp3⁺ Treg innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population signifikant niedriger als in erkrankten, unbehandelten Mäusen und sogar geringer als in wt-Mäusen (Abbildung 21). Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob dieses verschobene CD4⁺ Teff/Treg-Verhältnis durch gesteigerte Proliferation der CD4⁺ Teff oder durch Absterben der Treg nach anti-PD-1/anti-CTLA-4-Behandlung hervorgerufen wurde.

Die hohe Expression von PD-1, LAG-3, CTLA-4 und anderen Rezeptoren verstärkt die Treg-Aktivität. Möglicherweise reduziert die Blockierung koinhibitorischer Rezeptoren prinzipiell mehr die immunsuppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen, als dass die Funktion der T-Effektorzellen durch die Blockade direkt verbessert wird (Oleinika et al. 2012; Pardoll 2012). Dies könnte auch auf die anti-PD-1/anti-CTLA-4-Therapie in *c-MYC*-Mäusen zutreffen, da intratumorale Treg im Vergleich zu den T-Effektorzellen eine sehr hohe Expression von PD-1, LAG-3 und CTLA-4 aufwiesen (Abbildung 13 und Abbildung 14) und der Treg-Anteil nach dieser Behandlung deutlich sank.

4.5 Treg-Depletion

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Behandlung von Tumoren stellt die Depletion der Treg dar. Blockierende Antikörper, die gegen CD25 gerichtet sind, können dies ermöglichen. Allerdings wird CD25 auch von T-Effektorzellen nach deren Aktivierung exprimiert, so dass anti-CD25-Antikörper auch diese Zellen depletieren. Das DREG-Mausmodell bietet dafür einen eleganten Lösungsweg an, da durch die Injektion von DT ausschließlich Foxp3⁺ Treg eliminiert werden. Anhand von

transplantierten Tumoren konnte bereits ein Überlebensvorteil bzw. verringertes Tumorwachstum in Treg-depletierten DEREГ-Mäusen gezeigt werden (Klages et al. 2010; Teng et al. 2010; Mattarollo et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der DEREГ-Mechanismus erstmals in einem endogenen Spontan-tumormodell angewendet. DEREГ-Mäuse wurden mit *c-MYC*-Tieren gekreuzt. Die Nachkommen wurden mit DT behandelt (Injektionsschema siehe Abbildung 22 A). Nach der ersten Depletionsrunde mittels Diphtherietoxin waren im Blut der Mäuse keine Foxp3^+ Treg mehr zu finden (Abbildung 22 B). Doch knapp zwei Wochen später (= Tag 68) traten $\text{Foxp3}^+/\text{GFP}^-$ Zellen auf, die jedoch wie die $\text{Foxp3}^+/\text{GFP}^+$ Treg nach der zweiten DT-Gabe deutlich dezimiert werden konnten. Die dritte DT-Runde bewirkte jedoch erstaunlicherweise keinerlei T-Zell-Depletion, weder der $\text{Foxp3}^+/\text{GFP}^+$ Treg, die theoretisch den transgenen DT-Rezeptor weiterhin exprimieren sollten, noch der $\text{Foxp3}^+/\text{GFP}^-$ Population. Das injizierte DT könnte über neutralisierende Antikörper, die der Körper gegen das DT gebildet hat, abgefangen worden sein und so seine Wirkung gegen $\text{Foxp3}^+/\text{GFP}^+$ Treg verloren haben. Lahl und Sparwasser (2011) zeigten jedoch, dass die entstandenen $\text{Foxp3}^+/\text{GFP}^-$ Zellen in ihrer suppressiven Aktivität beeinträchtigt waren. Dies begründet auch, dass trotz der auftauchenden $\text{Foxp3}^+/\text{GFP}^-$ Population Treg-depletierte DEREГ/*c-MYC*-Mäusen einen leichten Überlebensvorteil gegenüber unbehandelten *c-MYC*-Tieren aufwiesen (Abbildung 22 C).

Auch in anderen Tumormodellen führte die Treg-Depletion alleine zu leichten Verbesserungen des Überlebens. Bei transplantierten Melanomen bewirkte die Treg-Depletion in DEREГ-Mäusen ein etwas verlangsamtes Tumorwachstum und einen leichten Überlebensvorteil, während durch zusätzliche Vakzinierung beides deutlich verstärkt wurde (Klages et al. 2010; Mattarollo et al. 2012). In einem anderen Melanom-Modell und einem Karzinogen-induzierten Tumor-Modell reichte dagegen die Depletion der Treg in DEREГ-Mäusen aus, um das Überleben zu verbessern und das Tumorwachstum hinauszuzögern (Li et al. 2010; Teng et al. 2010). Möglicherweise genügt die alleinige Beseitigung der Treg im aggressiven *c-MYC*-Modell und die damit verbundene Antitumor-Immunantwort nicht, die Tumorentstehung langfristig in Schach zu halten.

4.6 Tumor-Immuntherapien in der Klinik

Die Manipulation koinhibierender Signalwege oder Tumor-infiltrierender Treg stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Immuntherapien dar. In der klinischen Anwendung befindet sich bereits ein Antikörper, der CTLA-4 auf T-Zellen blockiert und somit Antitumor-Immunantworten verbessert. 2010 wurde dieser blockierende CTLA-4-Antikörper als Ipilimumab von der FDA (US Food and Drug Administration) für die Behandlung von

fortgeschrittenen Melanomen zugelassen (Pardoll 2012; Greaves und Gribben 2013). Aussichtsreiche Ergebnisse erzielten auch erste klinische Studien mit blockierenden Antikörpern gegen PD-1 oder dessen Liganden PD-L1 und PD-L2 bei Melanom, Lungenkrebs und Kolon- und Nierenzell-Karzinomen (Berger et al. 2008; Pardoll 2012; Topalian et al. 2012). Auch eine Kombinationstherapie mit Nivolumab (anti-PD-1-AK) und Ipilimumab wurde getestet und erzielte bessere Ergebnisse als die jeweiligen Monotherapien (Wolchok et al. 2013).

Um Treg zu beeinflussen, werden verschiedene Strategien untersucht. CD25-blockierende Antikörper, beispielsweise Basiliximab und Daclizumab, das Fusionsprotein Denileukindiftitox und Cyclophosphamid führen zu Treg-Depletion, während die Blockierung von TGF- β die *De-novo*-Differenzierung von iTreg unterdrückt (Byrne et al. 2011).

4.7 Zukünftige Fragestellungen

Es bedarf noch weiterer Forschung, um das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunität und von stimulierenden und inhibierenden Mechanismen im Tumormilieu besser verstehen und daraus Ansatzpunkte für neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können. Vor allem Tumor-infiltrierende Treg spielen eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung einer effektiven Antitumor-Immunantwort. Folgende Fragestellungen in Bezug auf das Netzwerk der Immunzellen im *c-MYC*-Modell müssten noch beantwortet werden:

- Wandern Treg aktiv in das Tumorgewebe ein, um dort nach Erkennung ihres spezifischen Antigens zu proliferieren?

GFP⁺ Treg könnten dazu aus naiven DEREK-Mäusen isoliert und in erkrankte *c-MYC*-Mäuse transferiert werden. Über durchflusszytometrischen Färbungen und GFP-Detektion könnten nach etwa drei Tagen die transferierten Treg von den intrinsischen Treg unterschieden und lokalisiert werden und auf Proliferationsmarker oder auch Aktivierungsmarker untersucht werden.

- Besteht in Bezug auf Stimulierbarkeit ein Unterschied zwischen PD-1^{hoch}, PD-1^{mittel} und PD-1^{negativ} T-Zellen?

Diese Populationen müssten zuvor mittels FACS sortiert und mit anti-CD3/anti-CD28-AK *in vitro* stimuliert werden. Schließlich müsste die Proliferation ermittelt werden.

- Zeigen Tumor-infiltrierende PD-1^{hoch}, PD-1^{mittel} und PD-1^{negativ} Treg jeweils eine unterschiedliche T-Zell-supprimierende Aktivität?

Dazu müssten die sortierten Treg-Populationen jeweils mit naiven Foxp3⁻ T-Zellen kokultiviert werden und die Suppression der T-Zell-Proliferation gemessen werden.

- Zeigen die TZR-Repertoires von Treg und T-Effektorzellen verschiedene Antigen-Spezifitäten?

Die TZR-Repertoires von angereicherten intratumoralen Treg, CD4⁺ Teff und CD8⁺ ZTL müssten über mRNS-Isolierung und PCR ermittelt und miteinander verglichen werden. Dies könnte einen Hinweis auf eventuelle Treg-Induktion aus naiven CD4⁺ Foxp3⁻ T-Zellen liefern.

- Werden Treg durch die PD-1/CTLA-4-Blockade in ihrer immunsuppressiven Aktivität gehemmt oder sterben sie durch diese Behandlung tatsächlich ab?
- Erhöht sich die Aktivität der CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Effektorzellen, der NK-Zellen oder der DZ nach anti-PD-1/anti-CTLA-4-Behandlung und Treg-Depletion?
- Welche Zellpopulation ist für den Überlebensvorteil ausschlaggebend?

Dies könnte durch Depletion der einzelnen Populationen mittels Antikörpern zusammen mit der PD-1/CTLA-4-Blockade bzw. der DT-Gabe in DEREK/c-MYC-Mäusen festgestellt werden.

- Kann die Tumorentstehung noch weiter hinausgezögert werden, wenn die PD-1-Blockade gemeinsam mit der Treg-Depletion durchgeführt wird?
- Zeigt sich ein Überlebensvorteil durch Abfangen des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 mittels Antikörper *in vivo*?

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BrdU	Bromdesoxyuridin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4
DEREG	Depletion of Regulatory T-Cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Foxp3	Forkhead box protein 3
FSC	Forward-Scatter
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
iTreg	induzierte Treg
LAG-3	Lymphocyte Activation Gene 3
LAMP	Lysosomal-assoziiertes Membran-Glykoprotein
LK	Lymphknoten
MACS	Magnetic Cell Separation
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)

mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nTreg	natürliche Treg
ns	nicht-signifikant
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	Programmed Cell Death 1
PD-L1/PD-L2	Programmed Cell Death Ligand 1/2
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	Pattern Recognition Receptor
rIL-2	rekombinantes IL-2
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
rTGF- β	rekombinantes TGF- β
SSC	Sideward-Scatter
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Teff	T-Effektorzelle
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Th	T-Helferzelle
TIDZ	Tumor-infiltrierende DZ
TIM-3	T-Cell Membrane Protein 3
Tr1-Zelle	T Regulatory Type 1 Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
wt	Wildtyp
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumüller, H., Lüking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D. H., Röcken, M. und Mocikat, R. (2005). "DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction." *Blood* 106(1): 338-344.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E. und Rosenberg, S. A. (2009). "Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired." *Blood* 114(8): 1537-1544.
- Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Van Ryswick, C., Ravel, P., Benhamouda, N., Levionnois, E., Nizard, M., Si-Mohamed, A., Besnier, N., Gey, A., Rotem-Yehudar, R., Pere, H., Tran, T., Guerin, C. L., Chauvat, A., Dransart, E., Alanio, C., Albert, S., Barry, B., Sandoval, F., Quintin-Colonna, F., Bruneval, P., Fridman, W. H., Lemoine, F. M., Oudard, S., Johannes, L., Olive, D., Brasnu, D. und Tartour, E. (2012). "PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV associated head and neck cancer." *Cancer Research* 73(1): 128-138.
- Banerjee, A., Vasanthakumar, A. und Grigoriadis, G. (2013). "Modulating T regulatory cells in cancer: how close are we?" *Immunology and Cell Biology* 91(5): 10.
- Banham, A. H. (2006). "Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells." *Trends in Immunology* 27(12): 541-544.
- Berger, R., Rotem-Yehudar, R., Slama, G., Landes, S., Kneller, A., Leiba, M., Koren-Michowitz, M., Shimoni, A. und Nagler, A. (2008). "Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of CT-011, a Humanized Antibody Interacting with PD-1, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies." *Clinical Cancer Research* 14(10): 3044-3051.
- Betts, M. R. und Koup, R. A. (2004). "Detection of T-cell degranulation: CD107a and b." *Methods in Cell Biology* 75: 497-512.
- Blackburn, S. D., Crawford, A., Shin, H., Polley, A., Freeman, G. J. und Wherry, E. J. (2010). "Tissue-Specific Differences in PD-1 and PD-L1 Expression during Chronic Viral Infection: Implications for CD8 T-Cell Exhaustion." *Journal of Virology* 84(4): 2078-2089.
- Brenner, C. D. (2009). "Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell" Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brenner, C. D., King, S., Przewoznik, M., Wolters, I., Adam, C., Bornkamm, G. W., Busch, D. H., Röcken, M. und Mocikat, R. (2010). "Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells." *European Journal of Immunology* 40(2): 494-504.

- Burnet, M. (1957). "Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications." *British Medical Journal* 1(5023): 841-847.
- Byrne, W. L., Mills, K. H., Lederer, J. A. und O'sullivan, G. C. (2011). "Targeting regulatory T cells in cancer." *Cancer Research* 71(22): 6915-6920.
- Cope, A., Le Friec, G., Cardone, J. und Kemper, C. (2011). "The Th1 life cycle: molecular control of IFN- γ to IL-10 switching." *Trends in Immunology* 32(6): 278-286.
- Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z. und Zou, W. (2013). "T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment." *Current Opinion in Immunology* 25(2): 214-221.
- Curran, M. A., Montalvo, W., Yagita, H. und Allison, J. P. (2010). "PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(9): 4275-4280.
- Dai, M., Wei, H., Yip, Y. Y., Feng, Q., He, K., Popov, V., Hellström, I. und Hellström, K. E. (2013). "Long-lasting Complete Regression of Established Mouse Tumors by Counteracting Th2 Inflammation." *Journal of Immunotherapy* 36(4): 248-257.
- Driessens, G., Kline, J. und Gajewski, T. F. (2009). "Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity." *Immunological Reviews* 229(1): 126-144.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nature Immunology* 3(11): 991-998.
- Egeter, O., Mocikat, R., Ghoreschi, K., Dieckmann, A. und Röcken, M. (2000). "Eradication of Disseminated Lymphomas with CpG-DNA Activated T Helper Type 1 Cells from Nontransgenic Mice." *Cancer Research* 60(6): 1515-1520.
- Ehrlich, P. (1909). "Über den jetzigen stand der Karzinomforschung." *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 5: 273-290.
- Figel, A.-M., Brech, D., Prinz, P. U., Lettenmeyer, U. K., Eckl, J., Turqueti-Neves, A., Mysliwicz, J., Anz, D., Rieth, N., Münchmeier, N., Buchner, A., Porubsky, S., Siegert, S. I., Segerer, S., Nelson, P. J. und Nößner, E. (2011). "Human Renal Cell Carcinoma Induces a Dendritic Cell Subset That Uses T-Cell Crosstalk for Tumor-Permissive Milieu Alterations." *The American Journal of Pathology* 179(1): 436-451.
- Flies, D. B. und Chen, L. (2007). "The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity." *Journal of Immunotherapy* 30(3): 251-260.

- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2003). "*Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.*" *Nature Immunology* 4(4): 330-336.
- Gabryšová, L., Christensen, J. R., Wu, X., Kissenpfennig, A., Malissen, B. und O' Garra, A. (2011). "*Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF- β -dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells.*" *European Journal of Immunology* 41(5): 1242-1248.
- Gershon, R. K., Cohen, P., Hencin, R. und Liebhaber, S. A. (1972). "*Suppressor T Cells.*" *The Journal of Immunology* 108(3): 586-590.
- Greaves, P. und Gribben, J. G. (2013). "*The role of B7 family molecules in hematologic malignancy.*" *Blood* 121(5): 734-744.
- Grosso, J. F., Goldberg, M. V., Getnet, D., Bruno, T. C., Yen, H.-R., Pyle, K. J., Hipkiss, E., Vignali, D. a. A., Pardoll, D. M. und Drake, C. G. (2009). "*Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T Cells.*" *The Journal of Immunology* 182(11): 6659-6669.
- Gustafsson, K., Ingelsten, M., Bergqvist, L., Nystrom, J., Andersson, B. und Karlsson-Parra, A. (2008). "*Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine.*" *Cancer Research* 68(14): 5965-5971.
- Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Chen, Z. und Cao, X. (2009). "*CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF- β 1.*" *Journal of Immunology* 182(1): 111-120.
- Häringer, B., Lozza, L., Steckel, B. und Geginat, J. (2009). "*Identification and characterization of IL-10/IFN- γ -producing effector-like T cells with regulatory function in human blood.*" *The Journal of Experimental Medicine* 206(5): 1009-1017.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Müller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A. und Bloomfield, C. D. (1999). "*World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997.*" *Journal of Clinical Oncology* 17(12): 3835-3849.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. und Rudensky, A. Y. (2012). "*Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function.*" *Annual Review of Immunology* 30(1): 531-564.
- Kaiser, A. D., Schuster, K., Gadiot, J., Borkner, L., Daebritz, H., Schmitt, C., Andreesen, R. und Blank, C. (2012). "*Reduced tumor-antigen density leads to PD-1/PD-L1-mediated impairment of partially exhausted CD8+ T cells.*" *European Journal of Immunology* 42(3): 662-671.

- Kearl, T. J., Jing, W., Gershan, J. A. und Johnson, B. D. (2013). "*Programmed Death Receptor-1/Programmed Death Receptor Ligand-1 Blockade after Transient Lymphodepletion To Treat Myeloma.*" *The Journal of Immunology* 190(11): 5620-5628.
- Kerdiles, Y., Ugolini, S. und Vivier, E. (2013). "*T cell regulation of natural killer cells.*" *The Journal of Experimental Medicine* 210(6): 1065-1068.
- Klages, K., Mayer, C. T., Lahl, K., Loddenkemper, C., Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Smyth, M. J., Hamann, A., Huehn, J. und Sparwasser, T. (2010). "*Selective Depletion of Foxp3+ Regulatory T Cells Improves Effective Therapeutic Vaccination against Established Melanoma.*" *Cancer Research* 70(20): 7788-7799.
- Kovalchuk, A. L., Qi, C.-F., Torrey, T. A., Tadesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hörtnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G. W., Janz, S. und Morse, H. C. (2000). "*Burkitt Lymphoma in the Mouse.*" *The Journal of Experimental Medicine* 192(8): 1183-1190.
- Kremmer, E., Mysliwietz, J. und Thierfelder, S. (1997). "*Induction and suppression of anti-antibodies to syngeneic T cell-binding antibodies in mice.*" *Clinical & Experimental Immunology* 109(1): 180-184.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J. und Sparwasser, T. (2007). "*Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease.*" *The Journal of Experimental Medicine* 204(1): 57-63.
- Lahl, K. und Sparwasser, T. (2011). "*In Vivo Depletion of FoxP3+ Tregs Using the DEREK Mouse Model*". *Regulatory T Cells*. G. Kassiotis and A. Liston, Humana Press. 707: 157-172.
- Li, X., Kostareli, E., Suffner, J., Garbi, N. und Hämmerling, G. J. (2010). "*Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors.*" *European Journal of Immunology* 40(12): 3325-3335.
- Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. und Adema, G. J. (2013). "*The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells.*" *Immunology* 138(2): 105-115.
- Lyford-Pike, S., Peng, S., Young, G. D., Taube, J. M., Westra, W. H., Akpeng, B., Bruno, T. C., Richmon, J. D., Wang, H., Bishop, J. A., Chen, L., Drake, C. G., Topalian, S. L., Pardoll, D. M. und Pai, S. I. (2013). "*Evidence for a Role of the PD-1:PD-L1 Pathway in Immune Resistance of HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.*" *Cancer Research* 73(6): 1733-1741.
- Mattarollo, S. R., Steegh, K., Li, M., Duret, H., Foong Ngiow, S. und Smyth, M. J. (2012). "*Transient Foxp3+ regulatory T-cell depletion enhances therapeutic anticancer vaccination targeting the immune-stimulatory properties of NKT cells.*" *Immunology and Cell Biology* 91(1): 105-114.

- Medzhitov, R. und Janeway, C. (2000). "*Innate Immunity*." New England Journal of Medicine 343(5): 338-344.
- Mkrtichyan, M., Najjar, Y. G., Raulfs, E. C., Abdalla, M. Y., Samara, R., Rotem-Yehudar, R., Cook, L. und Khleif, S. N. (2011). "*Anti-PD-1 synergizes with cyclophosphamide to induce potent anti-tumor vaccine effects through novel mechanisms*." European Journal of Immunology 41(10): 2977-2986.
- Mocikat, R. (1994). "*Hoch-effiziente Expression chimärisierter anti-T-Zell-Antikörper für die präklinische Evaluierung der immunsuppressiven Effektorfunktionen humaner Isotypen in vivo*." Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., Koszinowski, U. und Röcken, M. (2003). "*Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses*." Immunity 19(4): 561-569.
- Murphy, K., Travers, P. und Walport, M. (2009). "*Janeway Immunologie*". 7. Auflage. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag
- Naujoks, M. (2012). "*Untersuchungen zur Funktion von dendritischen Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell*" Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Nishikawa, H. und Sakaguchi, S. (2010). "*Regulatory T cells in tumor immunity*." International Journal of Cancer 127(4): 759-767.
- O' Garra, A. und Vieira, P. (2007). "*T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10*." Nature Reviews Immunology 7(6): 425-428.
- Oleinika, K., Nibbs, R. J., Graham, G. J. und Fraser, A. R. (2012). "*Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression*." Clinical & Experimental Immunology 171(1): 36-45.
- Pardoll, D. M. (2012). "*The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*." Nature Reviews Cancer 12(4): 252-264.
- Parkin, J. und Cohen, B. (2001). "*An overview of the immune system*." The Lancet 357(9270): 1777-1789.
- Peng, W., Liu, C., Xu, C., Lou, Y., Chen, J., Yang, Y., Yagita, H., Overwijk, W. W., Lizee, G., Radvanyi, L. und Hwu, P. (2012). "*PD-1 blockade enhances T cell migration to tumors by elevating IFN- γ inducible chemokines*." Cancer Research 72(20): 5209-5218.

- Prinz, P. U. (2010). *"Tumorbedingte Störungen der funktionellen Kapazität tumorinfiltrierender natürlicher Killer- und T-Zellen: Nachweis der Funktionsdefizite und Evaluation von Gegenmaßnahmen"* Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Prinz, P. U., Mendler, A. N., Masouris, I., Durner, L., Oberneder, R. und Nößner, E. (2012). *"High DGK- α and Disabled MAPK Pathways Cause Dysfunction of Human Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells That Is Reversible by Pharmacologic Intervention."* The Journal of Immunology 188(12): 5990-6000.
- Przewoznik, M., Hömberg, N., Naujoks, M., Pötzl, J., Münchmeier, N., Brenner, C. D., Anz, D., Bourquin, C., Nelson, P. J., Röcken, M. und Mocikat, R. (2012). *"Recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma: implications for therapeutic cell transfer."* Journal of Immunotherapy 35(3): 217-222.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. und Toda, M. (1995). *"Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases."* The Journal of Immunology 155(3): 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. und Ono, M. (2008). *"Regulatory T Cells and Immune Tolerance."* Cell 133(5): 775-787.
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K. und Anderson, A. C. (2010). *"Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity."* The Journal of Experimental Medicine 207(10): 2187-2194.
- Saraiva, M. und O' Garra, A. (2010). *"The regulation of IL-10 production by immune cells."* Nature Reviews Immunology 10(3): 170-181.
- Savage, P. A., Malchow, S. und Leventhal, D. S. (2013). *"Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology."* Trends in Immunology 34(1): 33-40.
- Scholzen, T. und Gerdes, J. (2000). *"The Ki-67 protein: from the known and the unknown."* Journal of Cellular Physiology 182(3): 311-322.
- Schreiber, R. D., Old, L. J. und Smyth, M. J. (2011). *"Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion."* Science 331(6024): 1565-1570.
- Seliger, B., Marincola, F. M., Ferrone, S. und Abken, H. (2008). *"The complex role of B7 molecules in tumor immunology."* Trends in molecular medicine 14(12): 550-559.

- Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Von Scheidt, B., Mclaughlin, N., Sparwasser, T. und Smyth, M. J. (2010). "Conditional Regulatory T-Cell Depletion Releases Adaptive Immunity Preventing Carcinogenesis and Suppressing Established Tumor Growth." *Cancer Research* 70(20): 7800-7809.
- Thomas, L. (1959). "Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states: a symposium held at the New York Academy of Medicine". P.B. Hoeber. 529-532
- Thompson, E. D., Enriquez, H. L., Fu, Y.-X. und Engelhard, V. H. (2010). "Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors." *The Journal of Experimental Medicine* 207(8): 1791-1804.
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y. und Shevach, E. M. (2010). "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells." *Journal of Immunology* 184(7): 3433-3441.
- Topalian, S. L., Drake, C. G. und Pardoll, D. M. (2012). "Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity." *Current Opinion in Immunology* 24(2): 207-212.
- Trinchieri, G. (2007). "Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control." *The Journal of Experimental Medicine* 204(2): 239-243.
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. und Smyth, M. J. (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." *Annual Review of Immunology* 29: 235-271.
- Vogel, I., Verbinnen, B., Maes, W., Boon, L., Van Gool, S. W. und Ceuppens, J. L. (2013). "Foxp3+ regulatory T cells are activated in spite of B7-CD28 and CD40-CD40L blockade." *European Journal of Immunology* 43(4): 1013-1023.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." *Nature Immunology* 12(6): 492-499.
- Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., Segal, N. H., Ariyan, C. E., Gordon, R. A., Reed, K., Burke, M. M., Caldwell, A., Kronenberg, S. A., Agunwamba, B. U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H. D., Feely, W., Horak, C. E., Hong, Q., Korman, A. J., Wigginton, J. M., Gupta, A. und Sznol, M. (2013). "Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 369(2): 122-133.
- Woo, S.-R., Turnis, M. E., Goldberg, M. V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., Gravano, D. M., Vogel, P., Liu, C. L., Tansombatvisit, S., Grosso, J. F., Netto, G., Smeltzer, M. P., Chaux, A., Utz, P. J., Workman, C. J., Pardoll, D. M., Korman, A. J., Drake, C. G. und Vignali, D. a. A. (2012). "Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape." *Cancer Research* 72(4): 917-927.

Ziegler, A., Heidenreich, R., Braumüller, H., Wolburg, H., Weidemann, S., Mocikat, R. und Röcken, M. (2009). "*EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion.*" *Blood* 113(15): 3494-3502.

Zou, W. (2005). "*Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance.*" *Nature Reviews Cancer* 5(4): 263-274.

7 ANHANG

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Ralph Mocikat. Er hatte stets ein offenes Ohr für Probleme oder Fragen und hat sich unendlich viel Zeit genommen, diese gemeinsam zu lösen.

Vielen Dank an Prof. Elisabeth Weiß für die Betreuung dieser Arbeit und die Vertretung an der biologischen Fakultät der LMU.

Prof. Martin Röcken danke ich für seine wertvollen Ratschläge und seinen Vorschlag, mit DEREK-Mäusen zu arbeiten.

Ich danke Prof. Tim Sparwasser für die Bereitstellung der DEREK-Mäuse.

Vielen Dank Prof. Dolores Schendel, dass ich meine Doktorarbeit am IMI anfertigen durfte.

Herzlichen Dank an das gesamte Tierstall-Team für die gute und professionelle Zusammenarbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt der AG Mocikat. Danke Nina, Nina, Nadine, Albert, Lorenz, Lena, Jakob für die tolle Arbeitsatmosphäre und die vielen hilfreichen Gespräche.

Vielen Dank an das gesamte IMI für das nette, entspannte Arbeitsklima. Ich hatte hier eine sehr schöne Zeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....
(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach
und in den Nebenfächern
bei der Fakultät für der
(Hochschule/Universität)
unterzogen habe.
- dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den

.....
(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen