

# **DISSERTATION**

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

## **MECHANISMEN DER TUMORTHERAPIE MIT IMMUNKONTROLLPUNKT-INHIBITOREN: ROLLE VON T-ZELL-AKTIVIERUNG UND ZELLULÄRE SENESZENZ**

Fatima Ahmetlić

aus

Doboj

2018

Aus der Eigenständigen Forschungseinheit Translationale Molekulare Immunologie  
Helmholtz-Zentrum München  
Leitung: Prof. Dr. Ralph Mocikat

**MECHANISMEN DER TUMORTHERAPIE  
MIT IMMUNKONTROLLPUNKT-INHIBITOREN:  
ROLLE VON T-ZELL-AKTIVIERUNG UND ZELLULÄRER SENESZENZ**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von:  
Fatima Ahmetlić  
aus  
Doboj

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Jon Nelson  
Prof. Dr. Stefan Endres  
Prof. Dr. Georg Enders

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2018

# Eidesstattliche Versicherung

Ahmetlić, Fatima

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*MECHANISMEN DER TUMORTHERAPIE MIT IMMUNKONTROLLPUNKT-INHIBITOREN:  
ROLLE VON T-ZELL-AKTIVIERUNG UND ZELLULÄRER SENESZENZ*

selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.02.2018

---

Ort, Datum

Fatima Ahmetlić

---

Doktorandin

Für meine Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 DIE GRUNDLAGEN DES IMMUNSYSTEMS.....</b>	<b>4</b>
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	4
1.1.2 Das adaptive Immunsystem .....	5
1.1.2.1 T-Effektorzellen .....	6
1.1.2.2 Regulatorische T-Zellen.....	8
1.1.2.3 Immunregulatorische Mechanismen .....	9
<b>1.2 TUMORENTSTEHUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 MECHANISMEN DER TUMORKONTROLLE .....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Seneszenz .....	12
1.3.2 Apoptose.....	14
<b>1.4 TUMORIMMUNOLOGIE.....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Tumor-Immunität.....	16
1.4.2 Strategien der Immunevasion .....	17
1.4.3 Tumor-Immuntherapien.....	17
1.4.4 Immun-Kontrollpunkt-Inhibierung.....	18
<b>1.5 DAS BURKITT-LYMPHOM .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 MATERIAL.....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Geräte .....	23
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.1.3 Medien und Puffer.....	26
2.1.4 Kits .....	26
2.1.5 Mäuse .....	27
2.1.6 Antikörper.....	28

2.1.6.1	<i>Therapeutische Antikörper</i> .....	28
2.1.6.2	<i>Depletionsantikörper</i> .....	28
2.1.6.3	<i>Detektionsantikörper</i> .....	28
2.1.6.4	<i>Panning-Antikörper</i> .....	29
2.1.6.5	<i>Antikörper für In-vitro-Versuche</i> .....	30
2.1.6.6	<i>Murine rekombinante Zytokine</i> .....	30
2.1.6.7	<i>Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz</i> .....	30
2.1.7	Primer .....	31
2.1.8	Software.....	31
<b>2.2</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>32</b>
2.2.1	Genotypisierung der Mäuse .....	32
2.2.2	Zellkultur und Zelllinien .....	34
2.2.3	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus lymphoiden Organen .....	35
2.2.4	Durchflusszytometrie (FACS) .....	35
2.2.5	Apoptosedetektion .....	36
2.2.6	Seneszenzdetektion.....	37
2.2.6.1	<i>Mikroskopische Detektion mit einem Seneszenz <math>\beta</math>-Galaktosidase Kit</i> .....	37
2.2.6.2	<i>Immunhistochemische Detektion mit <math>p16^{Ink4a}</math></i> .....	38
2.2.6.3	<i>Durchflusszytometrische Detektion mit <math>C_{12}FDG</math></i> .....	38
2.2.7	<i>In-vitro</i> -Seneszenzinduktion .....	39
2.2.8	<i>In-vitro</i> -Stimulation mit $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Antikörpern .....	39
2.2.9	Proliferations-Test mit <i>Cell Proliferation Dye</i> .....	40
2.2.10	B-Zell-Panning.....	40
2.2.11	Zellseparation .....	41
2.2.11.1	<i>EasySep<sup>®</sup> Magnetseparation</i> .....	41
2.2.11.2	<i>FACS Aria<sup>™</sup> III</i> .....	41
2.2.12	<i>In-vitro</i> -Kokulturen .....	42
2.2.12.1	<i>Suppressions-Assay</i> .....	42
2.2.12.2	<i>Tumor-Spezifitäts-Assay</i> .....	42
2.2.13	<i>In-vitro</i> -MHC-Induktion .....	43
2.2.14	<i>In-vivo</i> -Versuche .....	44
2.2.14.1	<i>Therapieversuche in <math>\lambda</math>-MYC- und <math>p21^{KO}/\lambda</math>-MYC-Mäusen</i> .....	44
2.2.14.2	<i>Depletionsversuche in <math>\lambda</math>-MYC-Mäusen</i> .....	44
2.2.15	Histologische Methoden.....	47
2.2.16	Statistische Auswertungen .....	47

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>EINSATZ VON IMMUN-KONTROLLPUNKT-INHIBITOREN IM MURINEN <math>\lambda</math>-MYC-LYMPHOMMODELL.....</b>	<b>48</b>
3.1.1	Vermehrte Expression der inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 auf intratumoralen T-Zellen .....	48
3.1.2	Überlebensvorteil und verbesserte Morphologie der Lymphorgane nach <i>In-vivo</i> -Blockade von PD-1 und CTLA-4 .....	50
3.1.3	Funktionsanalyse der T-Zellen nach <i>In-vivo</i> -PD-1/CTLA-4-Blockade.....	52
3.1.3.1	Aktivierung der $CD4^+Foxp3^+$ Treg, $CD4^+Foxp3^-$ Teff und $CD8^+$ CTL.....	52
3.1.3.2	Gesteigerte Produktion der immunstimulierenden Zytokine IFN- $\gamma$ und TNF.....	54
3.1.3.3	Verbesserte <i>In-vitro</i> -Proliferation und erhöhte Absolutzahl von T-Zellen.....	56
<b>3.2</b>	<b>MECHANISMEN DER TUMORSUPPRESSION DURCH DIE <i>IN-VIVO</i>-THERAPIE MIT <math>\alpha</math>PD-1/<math>\alpha</math>CTLA-4-ANTIKÖRPERN .....</b>	<b>58</b>
3.2.1	Untersuchung der Seneszenz nach PD1/CTLA-4-Inhibierung <i>in vivo</i> .....	59
3.2.1.1	Mikroskopische und durchflusszytometrische Detektion der Onkogen-induzierten Seneszenz mittels SA- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	59
3.2.1.2	Seneszenzinduktion in B-Zellen durch die <i>In-vivo</i> - $\alpha$ PD1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie .....	62
3.2.1.3	<i>In-vivo</i> -Nachweis der Tumorsuppression durch die $\alpha$ PD1/ $\alpha$ CTLA-4-induzierte Seneszenz mithilfe von $p21^{KO}$ / $\lambda$ -MYC-Mäusen.....	63
3.2.2	Apoptoseinduktion in B-Zellen nach $\alpha$ PD1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung <i>in vivo</i> .....	64
3.2.3	<i>In-vitro</i> -Seneszenzinduktion in 291-Lymphomzellen mit IFN- $\gamma$ und TNF .....	65
<b>3.3</b>	<b>ABHÄNGIGKEIT DER <math>\alpha</math>PD-1/<math>\alpha</math>CTLA-4-INDUZIERTEN TUMORKONTROLLE VON ZYTOKINEN.....</b>	<b>66</b>
3.3.1	Effekte der IFN- $\gamma$ -Neutralisierung <i>in vivo</i> mittels XMG1.2 auf die Therapie mit $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern.....	66
3.3.1.1	Sinkende Tumorkontrolle durch IFN- $\gamma$ -Depletion .....	66
3.3.1.2	Verminderte B-Zell-Seneszenz durch XMG1.2.....	67
3.3.1.3	Abnehmende Apoptose in B-Zellen nach IFN- $\gamma$ -Neutralisierung .....	68
3.3.1.4	Reduzierte T-Zellzahl nach XMG1.2-Gabe.....	68
3.3.2	Verringerte Tumorsuppression und B-Zell-Seneszenz durch TNF-Depletion .....	69
3.3.3	Keine Beeinträchtigung der Tumorkontrolle durch T-Zell-Depletion mittels MmTC .....	70
3.3.4	Einfluss der NK-Zellen auf die Tumorkontrolle durch <i>In-vivo</i> -PD-1/CTLA-4-Blockade .....	72
<b>3.4</b>	<b>DIE ROLLE DER REGULATORISCHEN T-ZELLEN IM <math>\lambda</math>-MYC-MODELL .....</b>	<b>74</b>
3.4.1	Suppressive Kapazität der $CD4^+Foxp3^+$ Treg im <i>In-vitro</i> -Versuch .....	74



3.4.2	IL-10 und CTLA-4 im immunsupprimierenden Tumormilieu.....	77
3.4.3	Bedeutung von Helios <sup>+</sup> nTreg und Helios <sup>-</sup> iTreg .....	78
3.4.4	Untersuchung lymphomassoziierter Antigene in <i>In-vitro</i> -Kokulturen .....	80
3.4.4.1	<i>Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach In-vitro-Stimulierung.....</i>	80
3.4.4.2	<i>Effekte einer In-vitro-MHC-II-Blockade auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.....</i>	82
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>DIE SYNERGISTISCHE ANWENDUNG VON IMMUN-KONTROLLPUNKT-INHIBITOREN IM <math>\lambda</math>-MYC-LYMPHOMMODELL .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2</b>	<b>T-ZELL-REAKTIVIERUNG NACH <i>IN-VIVO</i>-PD-1/CTLA-4-BLOCKADE .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>VERBESSERTE TUMORKONTROLLE DURCH <math>\alpha</math>PD-1/<math>\alpha</math>CTLA-4-INDUZIERTE SENESZENZ IN LYMPHOMZELLEN .....</b>	<b>86</b>
4.3.1	Einsatz pro-seneszenter Therapien zur Verbesserung der Tumorkontrolle .....	87
4.3.2	Seneszenzinduktion als therapeutische Strategie - ein doppelschneidiges Schwert .....	89
4.3.3	Seneszenz und Apoptose: konkurrierende Verteidigungsmechanismen der Tumorgenese.....	90
<b>4.4</b>	<b>ABHÄNGIGKEIT DER <math>\alpha</math>PD-1/<math>\alpha</math>CTLA-4-INDUZIERTEN SENESZENZ UND TUMORKONTROLLE VON IFN-<math>\gamma</math> UND TNF .....</b>	<b>91</b>
<b>4.5</b>	<b>REGULATORISCHE T-ZELLEN IM <math>\lambda</math>-MYC-MODELL .....</b>	<b>93</b>
4.5.1	Die Bedeutung der Treg für die Immunsuppression im $\lambda$ -MYC-Modell .....	93
4.5.2	Die Rolle der nTreg und iTreg für die Immunsuppression .....	95
<b>4.6</b>	<b>ERKENNUNG LYMPHOMASSOZIIERTER ANTIGENE DURCH TREG .....</b>	<b>96</b>
<b>4.7</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>98</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>121</b>
<b>6.1</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>121</b>
6.1.1	Fachpublikation .....	121
6.1.2	Poster und Vorträge .....	121
<b>6.2</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>122</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Neben allgemein gebräuchlichen Abkürzungen und SI-Einheiten wurden des Weiteren folgende Abkürzungen verwendet:

Ag	Antigen
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
CPD	<i>Cell Proliferation Dye</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CTL	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i> ; zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4</i>
DEREG	<i>Depletion of Regulatory T-Cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i> ; antigenbindender Teil des Antikörpers
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i> ; Teil der konstanten Kette des Antikörpers
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>Forward-Scatter</i> ; Vorwärts-Streuung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal

---

iTreg	induzierte Treg
LK	Lymphknoten
mAK	monoklonaler Antikörper
MDM-2	<i>Mouse Double Minute 2 Homologue</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nTreg	natürliche Treg
ns	nicht-signifikant
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i>
PD-L1/PD-L2	<i>Programmed Cell Death Ligand 1/2</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
rIL-2	rekombinantes IL-2
RPMI 1640	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Seneszenz-assoziiert
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Standardfehler
SSC	<i>Sideward-Scatter</i> ; Seitwärtsstreuung
TAA	tumorassoziiertes Antigen
Teff	T-Effektorzelle
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIS	Therapie-induzierte Seneszenz
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Antikörper-gesteuerte Modifikation von gegenregulatorischen Rezeptoren wie CTLA-4 und PD-1, sogenannten Immun-Kontrollpunkten, wird als neue Säule der Tumorthherapie bereits seit einigen Jahren erfolgreich in der Klinik eingesetzt. Gegen CTLA-4 und PD-1 gerichtete Antikörper sollen durch Inhibierung der immunologischen T-Zell-Bremse die Funktion tumorantigen-spezifischer T-Effektorzellen und damit die Ausbildung einer effektiven Antitumor-Immunität stimulieren. Ein herausragendes Merkmal der Kontrollpunkt-Inhibitoren ist die Induktion langanhaltender Immunantworten, die das Wachstum bereits bestehender Tumoren und Metastasen kontrollieren und so zu Langzeit-Überlebensraten führen, die vor wenigen Jahren noch undenkbar waren. Die kombinatorische Hemmung von CTLA-4 und PD-1 ist den jeweiligen Monotherapien überlegen und bereits für die klinische Anwendung zugelassen. Trotz eines stetig wachsenden Indikations-Spektrums gegen solide und hämatologische Tumorarten wurde die genaue Wirkweise dieser neuen Immuntherapeutika bisher nicht geklärt. Um Mechanismen zu untersuchen, die für das verbesserte Überleben nach der therapeutischen Blockade von PD-1 und CTLA-4 verantwortlich sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit das endogene  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell der Maus verwendet. Dieses Spontan-Tumormodell, welches dem klinischen Bild des humanen Burkitt-Lymphoms entspricht, ermöglichte neben der Untersuchung von Immunantworten während der Tumorentwicklung auch die therapeutische Intervention mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern.

Neben NK-Zellen und DZ waren auch T-Zellen im  $\lambda$ -MYC-Tumor trotz eines aktivierten Phänotyps in ihrer Funktion eingeschränkt. Bedingt durch die chronische Tumorantigen-Stimulation zeigte ein Teil der tumorinfiltrierenden T-Effektorzellen eine zunehmende funktionelle Erschöpfung. Die Suppression der T-Zellen im Tumor wurde durch den gesteigerten Anteil immunsupprimierender CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und die Hochregulierung inhibitorischer Rezeptoren verstärkt, so dass tumorreaktive T-Zellen die Lymphomentwicklung in  $\lambda$ -MYC-Tieren nicht verhindern konnten. Die auf intratumoralen T-Lymphozyten hochregulierten Moleküle PD-1 und CTLA-4 stellten geeignete Strukturen für den zielgerichteten Einsatz von  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern dar, welche inhibitorische Signale aufheben und eine effektive Antitumor-Immunantwort induzieren sollten. Tatsächlich konnte die *In-vivo*-Doppelblockade von PD-1 und CTLA-4 die Tumorprogression in  $\lambda$ -MYC-Mäusen signifikant verzögern und die Tumorentwicklung bei einigen Tieren gänzlich unterdrücken. Dies wurde auf die wiederhergestellte Effektorfunktion der intratumoralen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie zurückgeführt, welche sich in einer verstärkten Aktivierung, IFN- $\gamma$ - und TNF-Sekretion sowie *In-vitro*-Proliferation äußerte.

Einige der  $\lambda$ -MYC-Tiere wurden durch die PD-1-/CTLA-4-Blockade geheilt; dafür bot die Tumordestruktion durch aktivierte T-Zellen eine Erklärung. Doch bei den meisten Mäusen wurde kein Langzeitüberleben beobachtet, sondern eine starke Verzögerung des Tumorwachstums. Hier wurde durch den unveränderten Anteil der CD19<sup>+</sup> Lymphomzellen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung gezeigt, dass diese nicht durch reaktivierte T-Effektorzellen zerstört worden waren. Da sowohl die Seneszenz, die durch einen irreversiblen Proliferations-Stopp gekennzeichnet ist, als auch die Apoptose primäre zelluläre Verteidigungsmechanismen zur Unterdrückung der Tumorgenese sind, wurden sie als potenzielle Ursachen für das verzögerte Tumorwachstum nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung untersucht. Während nach der *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade eine geringe Apoptoseinduktion in Tumorzellen beobachtet wurde, hatte der Anteil seneszenten CD19<sup>+</sup> Lymphomzellen signifikant zugenommen. Mithilfe transgener Mäuse konnte der direkte Zusammenhang zwischen Seneszenzinduktion und verbesserter Tumorkontrolle nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie *in vivo* belegt werden. Durch die genetische Ausschaltung des Seneszenz-Gens *p21* in  $\lambda$ -MYC-Mäusen konnte die Antikörper-Therapie das Überleben der Tiere nicht mehr signifikant verlängern. Im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell kamen demnach die zelluläre Seneszenz und in geringerem Maße die Apoptose als Mechanismen für die Tumor-Wachstumsarretierung nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie in Frage.

In Lymphomzellen, welche aus  $\lambda$ -MYC-Tumoren generiert worden waren, konnte *in vitro* durch Zugabe der immunstimulierenden Zytokine rIFN- $\gamma$  und rTNF Seneszenz induziert werden. Da T-Zellen nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade vermehrt IFN- $\gamma$  und TNF sezernierten, wurde der direkte Einfluss dieser Zytokine auf die verbesserte Tumorkontrolle nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe analysiert. Die *In-vivo*-Neutralisierung sowohl von IFN- $\gamma$  als auch von TNF führte zu einer Aufhebung des Therapieerfolges nach Kontrollpunkt-Hemmung sowie zu einer Reduktion der Therapie-induzierten Seneszenz in Tumorzellen. Damit konnte die Notwendigkeit von IFN- $\gamma$  und TNF für den therapeutischen Erfolg der Antikörper-Therapie gezeigt werden.

Die gesteigerte Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade wurde auf reaktivierte NK- und T-Zellen zurückgeführt. Um deren Rolle als IFN- $\gamma$ - und TNF-Produzenten für den Therapieerfolg zu untersuchen, wurden diese Zellpopulationen während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung *in vivo* depletiert. Durch den Einsatz NK-Zell-depletierender Antikörper wurde das Überleben der  $\lambda$ -MYC-Mäuse reduziert und somit die zytokinabhängige Tumorsuppression durch Kontrollpunkt-Inhibitoren belegt. Der Verlust der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in  $\lambda$ -MYC-Mäusen ließ überraschenderweise keinen signifikanten Überlebensunterschied zu Tieren, die nur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörper erhalten hatten, erkennen. Dennoch stach hervor, dass es nach der T-Zell-

Depletion keine Langzeitüberleber gab. Daraus wurde geschlossen, dass NK-Zellen nach Kontrollpunkt-Blockade für die Bereitstellung von IFN- $\gamma$ , welches essenziell für die Tumorkontrolle und Seneszenzinduktion in Lymphomzellen ist, genügen. Für die komplette Zerstörung der Tumorzellen und damit ein Langzeitüberleben waren hingegen T-Zellen notwendig.

Zu den Strategien der Immunevasion im Tumor gehört auch der erhöhte Anteil von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg, deren suppressive Kapazität *in vitro* nachgewiesen wurde. Im Vergleich zu wt-Mäusen wurde in  $\lambda$ -MYC-Tieren eine erhöhte Expression der inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 auf intratumoralen T-Zellen, insbesondere auf Foxp3<sup>+</sup> Treg, sowie die verstärkte Sekretion des immuninhibierenden Zytokins IL-10 beobachtet. Da CTLA-4<sup>+</sup> Treg zudem mehr IL-10 produzierten als CTLA-4-negative Treg, könnten intratumorale Treg mit einer besonders hohen CTLA-4-Expression die Antitumor-Antwort der T-Effektorzellen durch ihre gesteigerte IL-10-Sekretion noch stärker beeinträchtigen.

Die meisten intratumoralen Treg wurden als Helios-exprimierende natürliche nTreg identifiziert, die konstitutiv Foxp3<sup>+</sup> exprimieren und Selbst-Antigene erkennen. In geringerem Maße wurden im  $\lambda$ -MYC-Tumor Helios<sup>-</sup> iTreg gefunden, welche peripher aus CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff induziert werden und Fremd-Antigene erkennen. Trotz der allgemeinen Annahme, dass hauptsächlich iTreg IL-10 ausschütten, wurde die IL-10-Produktion im  $\lambda$ -MYC-Modell gleichermaßen auf nTreg wie auf iTreg zurückgeführt. Die auf nTreg signifikant erhöhte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Oberflächenproteins CD137, welches nach TZR-spezifischer Aktivierung hochreguliert wird, lässt auf eine dominante Rolle der Helios<sup>+</sup> nTreg für die Inhibierung der Immunantwort im  $\lambda$ -MYC-Tumor schließen. Demnach schienen Treg nach Erkennung tumorassoziierter Antigene verstärkt zu proliferieren, was in einer *In-vitro*-Kokultur bestätigt werden konnte.

Diese im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell gewonnenen Resultate zeigen einen neuen Wirkmechanismus der Immun-Kontrollpunkt-Inhibitoren. Diese Kenntnisse sind relevant, um den klinischen Einsatz dieser modernen zielgerichteten Antikörper zu optimieren und die Entwicklung neuer Tumor-Immuntherapien voranzutreiben.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DIE GRUNDLAGEN DES IMMUNSYSTEMS

Unser Immunsystem wird aktiv, wenn physikalische, chemische und mikrobielle Barrieren von körperfremden Erregern und Stoffen durchbrochen werden und diese in den Körper gelangen. Das Immunsystem ist ein vielschichtiges Netzwerk aus Organen, Zellen, Proteinen und löslichen Faktoren und dient der Identifizierung und Eliminierung pathogener Eindringlinge und toxischer Substanzen und schützt den Organismus damit vor Infektionen. Gleichzeitig gilt es, die komplexe Immunantwort so zu steuern, dass überschießende Reaktionen gegen gesunde Körperzellen verhindert werden, um die Gewebshomöostase aufrechtzuerhalten. Um dies zu gewährleisten, bedient sich das Immunsystem der Zusammenarbeit seiner beiden Ebenen. Dazu gehört zum einen die entwicklungs-geschichtlich ältere angeborene Immunantwort, die weitgehend unspezifisch körperfremde und damit möglicherweise gefährliche Erreger bekämpft und zum anderen die adaptive Immunität, die nur bei höher entwickelten Lebewesen vorkommt und Pathogene spezifisch abwehrt. (Murphy et al. 2009; Parkin & Cohen 2001; Vollmar et al. 2012)

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet innerhalb von Minuten bis Stunden die erste effektive Abwehr gegen körperfremde Eindringlinge, um diese bestenfalls zu beseitigen oder sie zu kontrollieren, bis die spezifische, adaptive Immunantwort greift. Während sich Bakterien meist in Blut oder Gewebsflüssigkeiten aufhalten, vermehren sich Viren bevorzugt intrazellulär. Daher werden Krankheitserreger auf humoraler und zellulärer Ebene bekämpft.

Überwinden körperfremde Mikroorganismen das Oberflächenepithel und gelangen in die Blutbahn, setzt die humorale Abwehr in Form des Komplementsystems an. Daneben greifen aktivierte, phagozytierende Effektorzellen (Makrophagen und Granulozyten) ein, die extrazelluläre Erreger zerstören und molekulare Mediatoren (Zytokine) freisetzen. Entgegen ihrer Bezeichnung als „unspezifisch“, können die meisten Zellen der angeborenen Immunität über Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) bestimmte Strukturmuster

(PAMP, *Pattern Associated Molecular Patterns*) auf Pathogenen erkennen. Diese Muster werden exklusiv auf Mikroorganismen exprimiert, wie Lipopolysaccharide (LPS) auf gramnegativen Bakterien, und erlauben eine Unterscheidung zwischen Eigen und Fremd. Toll-like Rezeptoren (TLR) sind die bekanntesten Vertreter der Gruppe der PRR und initiieren - abhängig vom TLR-Typ - nach Bindung pathogener Strukturen eine begrenzte Anzahl verschiedener Signalwege und Immunantworten. Die durch Phagozyten und Zytokine ausgelöste Entzündungsreaktion lockt zudem Monozyten und unreife Dendritische Zellen (DZ) an den Infektionsort, die hier ihre Phagozytose-Aktivität verlieren und zu reifen DZ werden. Dies führt letztlich zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Effektoren der spezifischen Immunität und der Induktion einer adaptiven Immunantwort.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören ebenfalls zur zellulären Komponente der angeborenen Immunität und dienen der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, indem sie befallene Zellen beispielsweise an ihrem „fehlenden Selbst“ erkennen. Gesunde Körperzellen schützen sich durch die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) vor der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen. Da virusbefallene oder entartete Zellen einen MHC-Verlust aufweisen, werden sie von aktivierten NK-Zellen aufgespürt und durch die Sekretion von Perforin und Granzymen lysiert. NK-Zellen schütten zudem das immunstimulierende Zytokin IFN- $\gamma$  aus, welches Makrophagen aktiviert und die Induktion der adaptiven Immunantwort zusätzlich anregt. (Medzhitov & Janeway 2000; Murphy et al. 2009; Parkin & Cohen 2001)

### **1.1.2 Das adaptive Immunsystem**

Die adaptive Immunität ist evolutionsbiologisch ein „Neuling“ und wird durch das Zytokinmilieu während der angeborenen Immunantwort induziert. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem benötigt die erworbene Immunität mehr Zeit, kann jedoch hochspezifisch Erreger eliminieren und dabei ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, um den Organismus vor einer erneuten Infektion mit demselben Erreger zu schützen.

Die zellvermittelte adaptive Immunantwort wird durch B- und T-Lymphozyten sowie Antigen-präsentierende Zellen (APZ), zu denen DZ, Makrophagen, B-Zellen und Monozyten zählen, ausgeführt. Im peripheren Gewebe nehmen unreife DZ Antigene von Erregern auf und migrieren über die Lymphbahn in sekundäre lymphatische Organe, darunter Lymphknoten (LK) und Milz, wo sie in ihrer Funktion als professionelle APZ die prozessierten Peptidfragmente präsentieren.



Gleichzeitig wandern über Hochendotheliale Venolen (HEV, *High Endothelial Venules*) naive T-Lymphozyten gezielt in den LK ein. Nach der spezifischen Erkennung des von DZ präsentierten Antigens über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) wird deren Aktivierung und Differenzierung eingeleitet. Anschließend verlassen aktivierte T-Zellen das Lymphgewebe und wandern zum Infektionsort, wo sie als Effektorzellen wirken. Im Gegensatz zu T-Zellen erkennen reife B-Lymphozyten auch lösliche Antigene direkt über ihren B-Zell-Rezeptor (BZR). Nach ihrer Aktivierung reifen B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche Antikörper in ihrer löslichen Form als Immunglobuline sezernieren. Die Antikörper bilden die humorale Komponente der adaptiven Immunantwort und besitzen dieselbe Antigenspezifität wie der membrangebundene BZR.

Trotz der limitierten Anzahl spezifischer B- und T-Lymphozyten entsteht durch klonale Selektion und somatische Rekombination ein riesiges Repertoire an Lymphozytenklonen mit hochspezifischen Antigenrezeptoren. Nach Eliminierung der Krankheitserreger durch die adaptive Immunantwort werden einige T- und B-Zellen zu Gedächtniszellen und können - und das ist der Vorteil gegenüber der angeborenen Immunität - bei erneuter Pathogen-Exposition schneller proliferieren (klonale Expansion) und den Erreger effizient durch eine spezifische Immunantwort eliminieren. (Murphy et al. 2009; Parkin & Cohen 2001; Vollmar et al. 2012)

#### **1.1.2.1 T-Effektorzellen**

Die Einteilung der T-Effektorzellen erfolgt in zwei Hauptklassen:  $CD8^+$  zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und  $CD4^+$  T-Helferzellen (Th). T-Zellen verlassen nach ihrer Reifung den Thymus und zirkulieren in der Blutbahn und Lymphe, bis sie ihr spezifisches Antigen treffen und aktiviert werden. Während B-Zellen über ihren BZR direkt Antigene extrazellulärer Erreger erkennen und bekämpfen können, unterliegt der TZR, der für die Erkennung intrazellulärer und zytosolischer Erreger benötigt wird, einer MHC-Restriktion. T-Zellen können demnach über ihren Rezeptor Antigene nur erkennen, wenn diese als prozessierte Fragmente von APZ über MHC-Moleküle präsentiert werden. (Doherty & Zinkernagel 1975; Murphy et al. 2009; Parkin & Cohen 2001; Smith-Garvin et al. 2009; Vollmar et al. 2012)

Intrazelluläre Antigene aus virusbefallenen Zellen oder tumorassoziierte Antigene (TAA) werden als Antigenfragmente über MHC-I auf der APZ-Oberfläche präsentiert und von  $CD8^+$  CTL erkannt und über deren TZR gebunden. Dadurch aktivierte CTL können die Zielzelle zum einen durch Ausschüttung von Perforin und Granzymen direkt lysieren und zum anderen weitere Immunzellen durch die Sekretion von  $IFN-\gamma$  stimulieren.

MHC-II bindet dagegen exogene Antigene, die zuvor aus dem extrazellulären Raum von eingewanderten APZ aufgenommen und zu Peptidfragmenten abgebaut wurden.  $CD4^+$  T-Zellen werden durch die Bindung ihres Rezeptors an einen MHC-II-Peptid-Komplex aktiviert und tragen zur Zerstörung des Pathogens bei, indem sie andere Effektor-Immunzellen aktivieren. Die Differenzierung der  $CD4^+$  T-Zellen erfolgt anschließend in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu zu funktionell unterschiedlichen Th-Typen. Durch IL-12 und  $IFN-\gamma$  wird die Entstehung von  $CD4^+$  Th1-Zellen induziert, die für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger wichtig sind. Das von Th1-Zellen sezernierte IL-2 fördert die Proliferation der T-Effektorzellen, welche  $IFN-\gamma$  produzieren und so Makrophagen und andere APZ zur weiteren  $IFN-\gamma$ - und IL-12-Produktion anregen. Zugleich hemmt das Th1-produzierte  $IFN-\gamma$  die Polarisierung von naiven  $CD4^+$  Th-Zellen zu Th2-Zellen, die durch IL-4 gesteuert wird. Diese produzieren die Zytokine IL-4/-5/-6/-10, welche wiederum die Entstehung weiterer Th2-Zellen begünstigen und die Th1-Aktivierung verhindern. Zudem aktivieren sie B-Zellen (AK-Produktion) und lösen damit eine humorale Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger aus. (Abbas et al. 2004; Ada 1994; Murphy et al. 2009; Parkin & Cohen 2001)

Für eine vollständige Aktivierung benötigt eine T-Zelle neben der Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TZR als Signal 1 ein zweites, kostimulatorisches Signal, da die Zelle sonst anerg oder durch Apoptose abgebaut wird. Signal 2 wird meist über eine Interaktion zwischen Liganden der B7-Familie auf aktivierten APZ, den Molekülen CD80/86 (B7-1/-2), mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf T-Zellen induziert. Aber auch eine Bindung von CD40 auf APZ an CD40L auf T-Zellen ist für die Auslösung eines kostimulatorischen Signals möglich (Liu & Janeway 1992; Sharpe & Abbas 2006; Smith-Garvin et al. 2009). Die Produktion von IL-2 durch vollständig aktivierte T-Zellen führt zur Proliferation und klonalen Expansion der ausdifferenzierten, antigenspezifischen T-Lymphozyten, die nun den LK verlassen und gezielt zum Infektionsort migrieren (Homing), um dort als Effektorzellen zu wirken. (Crespo et al. 2013; Parkin & Cohen 2001; Vollmar et al. 2012)

### 1.1.2.2 Regulatorische T-Zellen

Neben Th1- und Th2-Zellen zählen die regulatorischen Treg-Zellen zur Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und hemmen die Funktion unterschiedlicher Immun-Effektorzellen. Physiologisch dienen sie der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und verhindern Autoimmunität. (Burocchi et al. 2013; Gershon et al. 1972; Josefowicz et al. 2012; Kim et al. 2006; Lahl et al. 2007; Nishikawa & Sakaguchi 2014)

Erstmals definierte Sakaguchi (1995) diese suppressive T-Zell-Subpopulation als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg. Da CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, aber auch von aktivierten T-Effektorzellen exprimiert wird, kann es als alleiniges Charakteristikum der Treg nicht verwendet werden. Es wurde durch den Marker Foxp3 (*Forkhead Box Protein 3*) ergänzt, der exklusiv von Treg exprimiert wird und zu der *forkhead/winged*-Helix-Familie gehört. Foxp3, welches von 5-10 % der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird, steuert als Transkriptionsfaktor alle wichtigen Treg-Funktionen und deren Entwicklung. (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003)

Die Untergruppe der „natürlichen“, bereits im Thymus generierten nTreg hemmt die Immunantwort gegen Selbst-Antigene sowie TAA. Neben einer konstitutiven Foxp3-Expression werden nTreg durch den Differenzierungsmarker Helios, ein Mitglied der Ikaros-Familie, charakterisiert (Thornton et al. 2010). Dieser ist jedoch nicht eindeutig, da er inzwischen auch in der zweiten Treg-Subpopulation, den iTreg gefunden wurde (Gottschalk et al. 2012; Zabransky et al. 2012). Diese heterogene Gruppe entsteht unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  (*Tumor Growth Factor  $\beta$* ) peripher aus naiven CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T-Effektorzellen (Teff). nTreg und iTreg arbeiten komplementär (Huang et al. 2014). Es ist beschrieben, dass nTreg insbesondere über inhibitorische Zelloberflächen-Moleküle, wie CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), supprimierend auf die Aktivierung von T-Effektorzellen wirken (Sakaguchi 2004; Wing et al. 2008; Yamaguchi et al. 2013). Der von nTreg konstitutiv exprimierte Transkriptionsfaktor Foxp3 kontrolliert unter anderem die Genexpression für CTLA-4, welches auf Treg stark exprimiert ist. Die Hochregulierung von CTLA-4 und anderen inhibitorischen Molekülen steigert die Aktivität der Treg und damit deren suppressive Funktion, Proliferation und Überleben (Greaves & Gribben 2013; Hodi 2007; O'Garra & Vieira 2004; Pardoll et al. 2012; von Boehmer 2005; Wing et al. 2008). Das suppressive Potenzial der induzierten iTreg wird insbesondere durch die Produktion des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 gesteuert (Adeegbe & Nishikawa 2013; Ng et al. 2013). Die Ausschüttung von IL-10 und TGF- $\beta$  steuert wiederum die weitere Induktion suppressiver Treg und hemmt gleichzeitig die Funktion der Th1-Effektorzellen. (Chen et al. 2003;

Cope et al. 2011; Shevach 2009; Shevach & Thornton 2014; Strauss et al. 2007; Zheng et al. 2004; Zou 2006)

Durch die Suppression der TZR-abhängigen Produktion des immunstimulierenden Zytokins IL-2 wird auch die Aktivierung und zytotoxische Tätigkeit der NK-Zellen beeinträchtigt. Bedingt durch die hohe Expression des IL-2-Rezeptors (CD25) auf Treg, binden diese das meiste IL-2 und entziehen es somit Tef oder NK-Zellen, deren Proliferation und Funktion dadurch zusätzlich supprimiert wird. (Oleinika et al. 2013; Sakaguchi et al. 2008; Shevach et al. 2009)

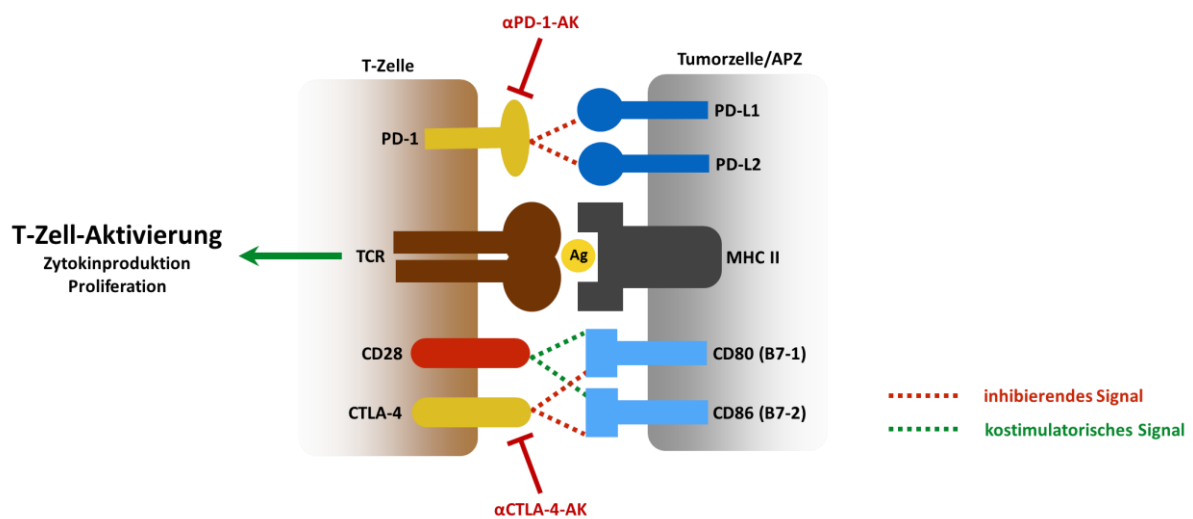
### 1.1.2.3 Immunregulatorische Mechanismen

Die T-Zelle braucht für eine vollständige Aktivierung zwei Signale, damit Anergie, welche mit einer geringen IL-2-Produktion und fehlenden Proliferation einhergeht, oder Apoptose von inaktiven T-Effektorzellen verhindert werden. Gleichzeitig muss mithilfe intrinsischer Kontrollmechanismen die Schädigung des umliegenden, gesunden Gewebes durch eine überschießende Immunreaktion der Effektorzellen verhindert und ein Gleichgewicht der Immunantworten aufrechterhalten werden (Abbas 2003; Murphy et al. 2009; Parkin & Cohen 2001).

Eine wichtige gegenregulatorische Funktion übernehmen inhibitorische Moleküle auf der T-Zell-Oberfläche, die Immun-Kontrollpunkte (Abbildung 1.1). Der bekannteste inhibitorische Rezeptor CTLA-4 (CD152) reguliert die Th1-Aktivität herunter, während er die Treg-Suppression verbessert. Er besitzt die gleichen Liganden wie das kostimulatorische Molekül CD28, nämlich CD80/86 (B7-1/-2). Nach vollständiger T-Zell-Aktivierung wird der intrazelluläre CTLA-4-Pool an der Oberfläche exprimiert und bindet mit einer deutlich erhöhten Affinität kompetitiv an CD80/86. Durch die Hemmung der CD28-B7-Signalkaskade wird auch die T-Zellaktivität, also Zytokinausschüttung und T-Zellproliferation heruntergefahren. (Brunet et al. 1987; Greenwald et al. 2005; Sharpe & Freeman 2002; Walunas et al. 1994)

Das Molekül PD-1 (Programmed Death 1) ist ein weiterer inhibitorische Rezeptor auf T-Zellen, der mit den Liganden PD-L1 und PD-L2 (B7-H1/H2) auf APZ oder Tumorzellen interagiert und nach T-Zell-Aktivierung hochreguliert wird. Während CTLA-4 vor allem die T-Zell-Aktivität im LK limitiert, hat PD-1 Einfluss auf die T-Effektorzellen im peripheren Gewebe oder Tumor (Das et al. 2015). Es wird im Gegensatz zu CTLA-4 auch auf NK-Zellen und B-Zellen exprimiert (Francisco et al. 2010; Freeman et al. 2000; Greenwald et al. 2005; Keir et al. 2008).

Daneben gibt es eine Reihe weiterer inhibitorischer Moleküle zur Prävention von unkontrollierten Immunreaktionen und von Autoimmunität sowie zur Aufrechterhaltung der Immun-Homöostase. (Baumeister et al. 2016; Greaves & Gribben 2013; Nirschl & Drake 2013; Oleinika et al. 2013; Pardoll 2012; Turnis et al. 2015)



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 und des kostimulatorischen Rezeptors CD28 auf T-Zellen sowie ihrer Liganden PD-L1/-L2 und CD80/86 auf APZ/Tumorzellen und Möglichkeiten der therapeutischen Intervention durch blockierende Antikörper.

## 1.2 TUMORENTSTEHUNG

2013 stieg Krebs von der dritthäufigsten Todesursache im Jahr 1990 zum zweithäufigsten Grund nach kardiovaskulären Erkrankungen auf. Diese Entwicklung wurde 2015 auch bundesweit beobachtet, wo ein Viertel aller Todesfälle auf maligne Neoplasien entfiel. Für bestimmte Krebsarten gab es in den letzten Jahren große Fortschritte in der Prävention und neue Therapieoptionen. Dennoch wächst die Herausforderung der Krebsbekämpfung, was zum einen auf die weiter wachsende globale Bevölkerung und steigende Lebenserwartung zurückzuführen ist, aber auch auf Risikofaktoren wie Rauchen, Fettleibigkeit und falsche Ernährungsweise. (Global Burden of Disease Cancer Collaboration 2015; Statistisches Bundesamt 2017; WHO World Cancer Report 2014)

Die Ursache der Krebsentstehung ist das unkontrollierte Wachstum einzelner entarteter Zellen. Hanahan und Weinberg definierten 2000 in ihrem Modell die sechs Kennzeichen von Krebszellen („Hallmarks of Cancer“). Neben der Unabhängigkeit von intrinsischen Wachstumssignalen (Autarkie) verlieren Tumorzellen oft auch ihre Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden oder (anti-) apoptotischen Signalen und haben zudem ein grenzenloses replikatives Potenzial. Desweiteren gehen oft Reparaturmechanismen wie die Apoptose in Krebszellen verloren und sie besitzen die Fähigkeit zur Angiogenese und Metastasierung.

Bei dem mehrstufigen Prozess der Tumorgenese spielen neben exogenen Faktoren wie Kanzerogenen auch zufällige Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen, die oft an der Signaltransduktion der Zellteilung beteiligt sind, eine wichtige Rolle. Durch Mutation der Proto-Onkogene entstehen Onkogene (Rous 1911), deren Produkte eine unkontrollierte Zellteilung einleiten (Weinberg 1983). Als wichtige Reparatursysteme im Körper kontrollieren Tumorsuppressoren wie p53 unter anderem die Zellteilung und leiten bei DNA-Schäden den Zelltod ein. Mutationen in Tumorsuppressor-Genen verhindern diese Kontrollmechanismen (Pietsch et al. 2008). Auch Erbfaktoren können zur Tumorentstehung beitragen. Die Tumorsuppressor-Gene BRCA1/2 sind ein bekanntes Beispiel für die familiäre Häufung von Brustkrebs (Kent et al. 1995).

## 1.3 MECHANISMEN DER TUMORKONTROLLE

Zu den primären Verteidigungsmechanismen gegen Tumoren gehört neben der Apoptose, dem programmierten Zelltod, auch die Seneszenz, die einen irreversiblen Zellzyklus-Stopp darstellt. Beide Prozesse teilen eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten. Als genetische Programme ereignen sie sich nicht zufällig, sondern werden von bestimmten Genen kontrolliert und ausgelöst. Sie sind unentbehrlich für die funktionelle und strukturelle Aufrechterhaltung der Organe und teilen sich Signalwege. Als zelluläre Reparaturmechanismen werden sie in infizierten oder entarteten Zellen aktiv. Da die Inhibierung der Seneszenz und Apoptose eine Voraussetzung für Zelltransformationen ist, sollen diese Reparaturprogramme im Folgenden genauer beleuchtet werden. (Burton & Faragher 2015; Childs et al. 2014)

### 1.3.1 Seneszenz

Die Seneszenz im biologischen Sinn ist ein Synonym für Alterung. Vom Zustand der zellulären Seneszenz spricht man hingegen, wenn Zellen durch Stress-Signale in einen irreversiblen Zellzyklus-Stopp übergehen, der von der reversiblen Ruhephase (G0) zu unterscheiden ist (Tomasetti & Vogelstein 2015). Hayflick und Moorhead zeigten 1961 erstmals, dass ein intrinsischer Zählmechanismus von Zellteilungen für die Mortalität von Zellen in Kultur verantwortlich ist. Der primären Kultur folgt die Zellexpansion, welche in die replikative Seneszenz mündet. Primärzellen können sich in Kultur nach etwa 50 Zellteilungen nicht mehr teilen (Harley et al. 1990). Die dafür verantwortliche „molekulare Uhr“ (Bodnar et al. 1998) sind die von Blackburn (1978) identifizierten Telomere, die die DNS-Enden vor Abnutzung schützen. Erreichen sie - bedingt durch die bei jeder Teilung zunehmende Verkürzung - eine kritische Länge, wird dies als DNS-Schaden gewertet und eine Antwort (DDR, *DNA Damage Response*) ausgelöst, die in einer Inhibierung des Zellzyklus resultiert (Fumagali et al. 2012). Neben der replikativen gibt es auch eine vorzeitige Seneszenz, die durch unterschiedliche Stress-Signale bereits nach wenigen Zellteilungen ausgelöst wird (Passos et al. 2009).

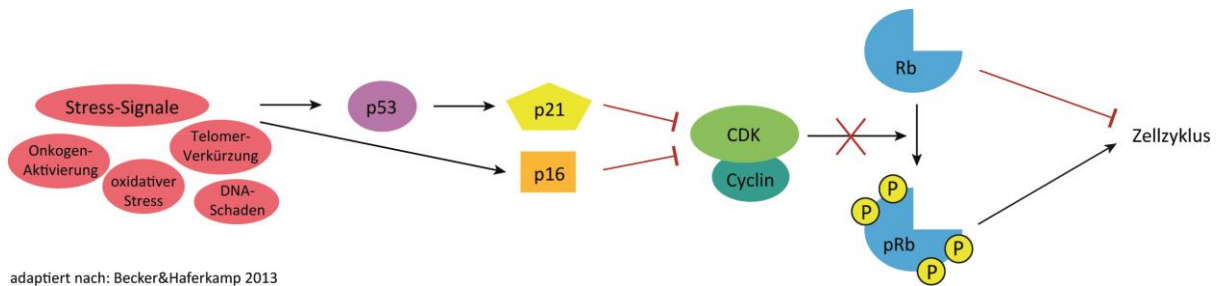
Die Detektion der Seneszenz erfolgt meist über die Aktivität der lysosomalen Seneszenz-assoziierten (SA)- $\beta$ -Galaktosidase (Dimri et al. 1995). Dieses Enzym ist typischerweise bei pH 4 aktiv, aber in seneszenten Zellen steigt durch die Zunahme der Lysosomen auch die lysosomale Aktivität, so dass  $\beta$ -Galaktosidase bereits bei pH 6 arbeitet (Debacq-Chainiaux et al. 2009; Gary & Kindell 2005; Kurz et al. 2000).

Darüber hinaus können seneszente Zellen nicht proliferieren und exprimieren verstärkt Seneszenz-Mediatoren, wie p16, p53, p21 und pRb (Collado & Serrano 2010). Sie haben zudem Heterchromatin-Herde (SAHF, *Senescence Associated Heterochromatin Foci*), die mit den Markern H3K9me3, HP-1 $\gamma$  und  $\gamma$ H2A identifiziert werden (Di Micco et al. 2011; Narita et al. 2003; Scaffidi et al. 2006; Zhang et al. 2005).

Desweiteren zeigen seneszente Zellen eine komplexe pro-inflammatorische Antwort, bekannt als Seneszenz-assoziiertes Sekretorisches Phänotyp (SASP) (Campisi et al. 2013; Coppé et al. 2010). Durch die Sekretion immunstimulierender Zytokine wird ein inflammatorisches Milieu geschaffen, in welchem seneszente Zellen mithilfe immungesteuerter Mechanismen beseitigt werden. Zum einen werden sie direkt von T-Helferzellen erkannt und zum anderen werden seneszente Zellen durch Effektorzellen, die von SASP-Faktoren angelockt wurden, phagozytiert. (Acosta et al. 2008; Hoenicke & Zender 2012; Kang et al. 2011; Kuilman et al. 2008; Xue et al. 2007)

Seneszenz kann über zwei Signalwege (Abbildung 1.2) durch Stressreize wie DNA-Schäden, Onkogene, oxidativen Stress und Telomerverkürzung induziert werden. Mediatoren dieser Signale, die Kinasen, aktivieren die Tumorsuppressoren p16 oder p53. Während aktiviertes p16 zu einer direkten Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK, *Cyclin-dependent Kinase*) führt, wird durch p53 der Tumorsuppressor p21 aktiviert und CDK2 gehemmt. Durch die CDK-Inhibierung behält Rb seine hypophosphorylierte, aktive Form bei und es kommt zu einer irreversiblen Arretierung des Zellzyklus. (Chicas et al. 2010; Collado et al. 2007; van Deursen 2014; Gorgoulis & Halazonetis 2010; Kim et al. 2006; Kuilman et al. 2010; Salama et al. 2014)





adaptiert nach: Becker&Haferkamp 2013

**Abbildung 1.2:** Signalwege der Seneszenz. Durch verschiedene Stress-Stimuli wird der p16-Rb- oder der p53-p21-Rb-Signalweg für Seneszenz initiiert. Die Aktivierung von p21 oder p16 führt zu einer Hemmung Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK), wodurch Rb aktiviert bleibt und es zu einer Zellzyklus-Arretierung kommt.

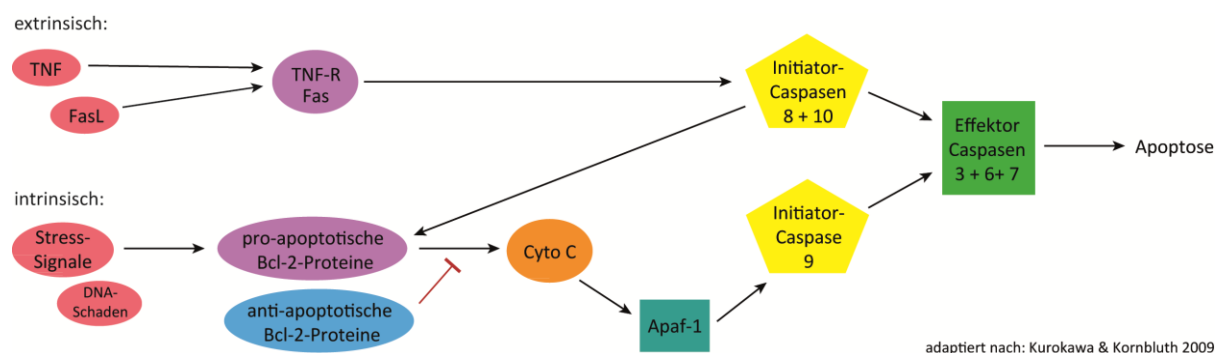
Viele Ergebnisse deuten darauf hin, dass zelluläre Seneszenz eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von Tumoren spielt. Onkogene wie *MYC*, die an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt sind, können zu einer Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) beitragen, die in frühen Stadien der Tumorentstehung als Bremse wirkt. Zudem wurde gezeigt, dass Zellen nach Ausschaltung onkogener Signale durch Zellzyklus-Inhibitoren wie p53 und Rb in die Seneszenz getrieben wurden und so die Expansion von Krebs-Vorstufen verhindert wurde (Collado & Serrano 2010; Serrano et al. 1997).

Daher könnte die Seneszenz als essenzieller Verteidigungsmechanismus gegen Tumorentstehung ein wichtiger Bestandteil neuer Therapien zur Tumoreradikation werden. Nardella und Kollegen (2011) stellten potenzielle zielgerichtete Therapiekonzepte vor, um pro-seneszente Antworten im Tumor zu verbessern. Neben der pharmakologischen Reaktivierung von p53 (Ventura et al. 2007; Xue et al. 2007) induzierten CDK4/6-Inhibitoren (Michaud et al. 2010; O'Leary et al. 2016; Rader et al. 2013; Thangayal et al. 2011) in Tumorzellen Seneszenz, der eine Tumoreliminierung folgte. 2015 wurde der erste CDK4/6-Hemmer Palbociclib für die Behandlung von Brustkrebs zugelassen (Dhillon 2015). Allerdings sollte beachtet werden, dass eine Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) durch Sekretion von SASP-Komponenten die Tumorentwicklung auch fördern kann (Sun et al. 2012).

### 1.3.2 Apoptose

Apoptose, der genetisch regulierte Prozess des programmierten Zelltodes, wurde erstmals 1972 von Kerr, Whiley und Currie beschrieben und die dafür zuständigen Gene von Horvitz & Sulston (1990) entdeckt. Die Apoptose stellt durch die Eliminierung geschädigter Zellen einen der wichtigsten zellulären Verteidigungsmechanismen gegen die Tumorentstehung dar (Fuchs & Steller 2011; Reed 2000).

Extrinsisch wird Apoptose über die Todesrezeptoren TNF-R1 und Fas initiiert, welche die Initiator-Caspasen 8 und 10 aktivieren. Diese leiten, neben zellulärem Stress, den intrinsischen Signalweg ein, der durch anti- und pro-apoptotische Molekülen aus der Bcl-2-Familie reguliert wird (Adams & Cory 2007; Reed et al. 1988; Tsujimoto & Croce 1986). Durch Stress-Reize werden pro-apoptotische Bcl-2-Proteine aktiviert und setzen Cytochrom C aus Mitochondrien frei, um nach Stimulierung des Adaptor-Proteins Apaf-1 die Initiator-Caspase 9 zu aktivieren. Initiator-Caspasen regen durch Spaltung anderer Caspasen die Apoptose an, während die Effektor-Caspasen für zelluläre Veränderungen verantwortlich sind, die zur Einleitung der Apoptose führen (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3:** Signalwege der Apoptose. Extrinsische Signale, wie TNF oder FasL oder intrinsische Stimuli, die durch Regulatoren der Bcl-2-Proteinfamilie gesteuert werden, aktivieren Initiator-Caspasen. Nach Stimulierung der Effektor-Caspasen wird die Apoptose eingeleitet.

Das in vielen Tumoren überexprimierte Onkogen *MYC* steuert als Transkriptionsfaktor unter anderem den Zellzyklus und ist ein wichtiges Apoptose-Gen. Neben seiner pro-onkogenen Wirkung kann *MYC* in Tumorzellen aber auch Apoptose induzieren (Evan et al. 1992; Shi et al. 1992), ebenso wie das Tumorsuppressor-Gen p53 (Yonish-Rouach et al. 1991).

Die Kenntnisse über die Rolle der Apoptose in der Tumorentstehung ermöglichten die Entwicklung unterschiedlicher Therapieansätze. Durch Modulierung von Molekülen, die an der Apoptose beteiligt sind, sollen Tumorzellen gezielt eliminiert werden. Für die Wirkung von Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Imatinib oder Idelalisib wird die induzierte Expression pro-apoptotischer Proteine genutzt (Falkenhorst et al. 2016; Brusa et al. 2005; Chen et al. 2016), während der Bcl-2-Inhibitor Navitoclax anti-apoptotische Mechanismen hemmt (Shi et al. 2011).

## 1.4 TUMORIMMUNOLOGIE

Spontane Tumorremissionen und die erhöhte Tumorzinzidenz bei immunsupprimierten Patienten hatten bereits früher einen Zusammenhang zwischen Immunsystem und Krebs gezeigt (Karnad et al. 1992; Shimamoto et al. 1993). Die wissenschaftliche Untersuchung der Interaktion von Immunsystem und Tumorzellen begann Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Abhandlung Paul Ehrlichs „Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung“ (1909), der den Gedanken der Tumorimmunologie prägte. Demnach kann das Immunsystem, welches ebenso flexibel wie Tumorzellen agiert, diese erkennen und eliminieren und damit die Tumorentwicklung unterdrücken. (Hanahan & Weinberg 2011; Mellman et al. 2011; Pandya et al. 2016; Vesely et al. 2011)

### 1.4.1 Tumor-Immuneditierung

Die Idee, dass das Immunsystem nicht nur Pathogene, sondern auch entartete Körperzellen aufspüren und eliminieren kann, wurde Ende der 1950-er Jahre von Burnet und Thomas in ihrem Modell über die Tumor-Immunüberwachung postuliert. Fast ein halbes Jahrhundert später wurde die These von Dunn und Kollegen (2002) wieder aufgegriffen und erweitert. Das als Tumor-„Immuneditierung“ bezeichnete Konzept wird in drei Stadien unterteilt:

1. **Eliminierung:** Die meisten transformierten Zellen werden entsprechend der Immunüberwachung von Burnet und Thomas durch NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten bereits im Zuge der angeborenen Immunantwort erkannt und zerstört. Beseitigt die Immunabwehr in dieser Phase alle entarteten Zellen, endet die Editierung hier.
2. **Equilibrium:** Während der dynamischen Gleichgewichtsphase wächst der Tumor nicht an, da viele entartete Zellen noch vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Unter dem permanenten Selektionsdruck durch das Immunsystem entzieht sich jedoch ein Teil der Zellen durch Mutation der Überwachung durch T-Lymphozyten. Diese werden folglich nicht antigenspezifisch aktiviert, eine Antitumor-Antwort bleibt aus und die mutierte Tumorzelle bleibt zurück.
3. **Evasion:** Die überlebenden Tumorzellvarianten werden aufgrund ihrer geringen Immunogenität oder Immunresistenz nicht mehr vom Immunsystem erkannt und zeigen sich nach unkontrollierter Teilung als klinisch manifeste Tumorerkrankung.

### 1.4.2 Strategien der Immunevasion

Neben dem Verlust von MHC-Molekülen oder TAA, der bereits die Erkennung der entarteten Zellen durch Immunzellen verhindert, können Tumorzellen durch ein Reihe weiterer Evasionsstrategien eine Immunantwort durch Effektorzellen unterdrücken (Mittal et al. 2014; Muenst et al. 2016).

Beispielsweise können maligne Zellen immuninhibierende Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  sezernieren, die nicht nur Foxp3<sup>+</sup> Treg anlocken, sondern auch die Neubildung von iTreg aus Teff induzieren (Nishikawa & Sakaguchi 2014; Sakaguchi et al. 2009).

Zum immunsuppressiven Milieu im Tumor tragen auch die verstärkte Expression inhibitorischer Rezeptoren wie CTLA-4 auf Treg und die Reduktion kostimulatorischer Moleküle auf intratumoralen T-Zellen bei, die dadurch in die Anergie oder Apoptose getrieben werden und die Fähigkeit zur IL-2-Produktion und Proliferation verlieren. Daneben findet man oft „erschöpfte“ T-Zellen, die durch chronischen Antigenkontakt dauerhaft aktiviert werden und ihre Funktionen verlieren, was sich in einer verminderten Reaktivität äußert. Diese T-Zellen exprimieren oft mehrere inhibitorische Moleküle, die als Erschöpfungsmarker gelten (Crespo et al. 2013; Schietinger & Greenberg 2014; Wherry & Kurachi 2015).

Gleichzeitig passt sich der Tumor im Sinne einer adaptiven Immuntoleranz an die endogene, spezifische Immunantwort der T-Zellen an. Als Antwort auf die IFN- $\gamma$ -Produktion der aktivierten T-Effektorzellen werden auf den meisten Tumorzellen inhibierende Liganden wie PD-L1/-L2 überexprimiert und schützen sie so vor einer Antitumor-Antwort. (Blank et al. 2005; Greaves & Gribben 2013; Joyce & Fearon 2015; Oleinika et al. 2013)

### 1.4.3 Tumor-Immuntherapien

Durch Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie können bereits viele Tumoren beseitigt werden, aber Resistenzen führen zu Tumorregressionen und unterstreichen die Notwendigkeit, mithilfe neuartiger Therapeutika auch die letzte therapieresistente Tumorzelle zu beseitigen. In den letzten Jahrzehnten gab es enorme Erkenntnisgewinne über die Interaktion von Immunsystem und Tumorzelle, welche die Entwicklung von Tumor-Immuntherapien ermöglichten, die das Immunsystem gezielt und unter Umgehung von Tumor-Resistenzmechanismen (Cree & Charlton

2017) unterstützen sollen, um eine Heilung herbeizuführen. (Aldrich et al. 2010; Madorsky et al. 2015; Mellman et al. 2011; Schreiber et al. 2011; Sharma et al. 2011; Snook & Waldman 2013)

Zahlreiche passive und aktive Behandlungsstrategien sind bereits im klinischen Einsatz. Neben Immunstimulanzen wie hochdosiertem IL-2 (Fyfe et al. 1995), werden auch zellbasierte Immuntherapeutika, darunter DZ-Vakzinen (van den Boorn & Hartmann 2013) oder adoptiver T-Zell-Transfer (Rosenberg et al. 2011) genutzt. Zielgerichtete Therapien mit monoklonalen Antikörpern (mAK) wie Rituximab (McLaughlin et al. 1998) oder Trastuzumab (Ross et al. 1998) sind aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken. Mit Antikörpern können nicht nur Tumorzellen angesteuert, sondern auch T-Zellen in die Tumorbekämpfung involviert werden, wie bei dem bispezifischen Antikörper Blinatumomab (Löffler et al. 2000) oder bei Chimären Antigen-Rezeptoren (CAR) (Porter et al. 2011; Park et al. 2016).

#### **1.4.4 Immun-Kontrollpunkt-Inhibierung**

Der Schwerpunkt der neuen Immuntherapien liegt auf der Beeinflussung der T-Zell-Antwort durch Antikörper, die an T-Zell-Moleküle binden und so neben einer Aktivierung der T-Effektorzellen auch eine Hemmung von immunsuppressiven Mechanismen bewirken sollen. Dieser Ansatz wird auch bei der Immun-Kontrollpunkt-Blockade verfolgt, bei der inhibitorische Moleküle wie CTLA-4 und PD-1 (Abbildung 1.3) selektiv durch mAK gehemmt werden. Durch das Lösen dieser immunologischen Bremse wird die Suppression der T-Zell-Aktivität wieder aufgehoben. Nach ihrer Reaktivierung, die sich in einer gesteigerten Proliferation und Zytokinproduktion äußert, können T-Effektorzellen den Tumor wieder bekämpfen, wobei der genaue Wirkmechanismus dieser Antikörper noch nicht entschlüsselt wurde. (Pardoll et al. 2012; Sharma et al. 2011)

Als erster Vertreter der Kontrollpunkt-Inhibitoren wurde 2011 der CTLA-4-blockierende mAK Ipilimumab für die Melanom-Behandlung zugelassen. Dessen erfolgreiche Anwendung in der Zulassungsstudie von Hodi und Kollegen (2010) führte zu einem Umdenken in der Krebstherapie und rechtfertigte die Bezeichnung der neuen Immuntherapeutika als „wissenschaftlichen Durchbruch des Jahres 2013“ durch Science (Couzin-Frankel). Die klinische Anwendung des  $\alpha$ PD-1-Antikörpers Nivolumab wurde nach seiner Zulassung 2014 für die Melanom-Therapie (Hamid et al. 2013; Topalian et al. 2012) inzwischen erweitert (Topalian et al. 2014). Der Zusatznutzen von Nivolumab wurde 2015 auch vom Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) positiv bewertet.

Zahlreiche Studien mit Antikörpern gegen PD-1 oder seine Liganden prophezeien zudem einen baldigen therapeutischen Einsatz bei anderen soliden Tumoren (Brahmer et al. 2015; Gettinger et al. 2015; McDermott et al. 2015) und sogar hämatologischen Erkrankungen (Ansell et al. 2015; Armand et al. 2013).

Zudem wurde ein zusätzlicher Nutzen durch den kombinatorischen Einsatz von zwei oder mehr unterschiedlichen Kontrollpunkt-Hemmern gezeigt (Callahan et al. 2015; Larkin et al. 2015; Postow et al. 2015; Wolchok et al. 2013). Daher werden Kombinationen, auch mit klassischen Verfahren wie Radiotherapie (Grimaldi et al. 2014; Postow et al. 2012) oder Vakzinierung (Hodi et al. 2010; Simpson et al. 2013) in Zukunft vermutlich wachsende Bedeutung erlangen.

Trotz ihres großen Potenzials lässt sich das Ansprechen auf Immuntherapien schwer beurteilen, da sie sich in ihrer Wirkweise stark von klassischen Therapien unterscheiden. Bei Immuntherapeutika wie Ipilimumab kann es durch eine T-Zell-Aktivierung und -Rekrutierung initial zu einer Zunahme der Tumorgröße kommen. Da dies gemäß RECIST-Kriterien (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) eine Tumorregression bedeutet, werden für neuartige Immuntherapien die irRC-Merkmale (*immune-related Response Criteria*) für eine Bewertung des Therapieerfolges verwendet (Hodi et al. 2016; Hoos et al. 2015; Wolchok et al. 2009). Auch in der Folgephase unterscheidet sich die Anti-Tumorantwort der Immuntherapien von derjenigen konventioneller Behandlungsmethoden. Obwohl nur bei einem geringen Anteil der Patienten eine komplette Remission beobachtet wird, sprechen die meisten partiell auf die Therapie an und können mit verbleibenden Tumorzellen oft jahrelang beschwerdefrei leben (Lipson et al. 2013; Topalian et al. 2014).

## 1.5 DAS BURKITT-LYMPHOM

Maligne Lymphome sind Tumoren, die von den Zellen des lymphatischen Systems ausgehen und nach WHO in zwei Gruppen eingeteilt werden. Neben Hodgkin-Lymphomen (Hodgkin 1832), die etwa 10 % aller malignen Lymphome ausmachen und nur die B-Zell-Reihe betreffen, gibt es die heterogene Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). In NHL wird der Tumor in 80 % der Fälle durch Entartungen in der B-Zell-Reihe induziert, 20 % entfallen auf eine unkontrollierte Vermehrung transformierter T-Zellen. NHL werden dabei in indolente, niedrigmaligne und aggressive, hochmaligne Formen klassifiziert. Das Burkitt-Lymphom aus der Gruppe der diffusen NHL ist ein sehr aggressives Lymphom. Nach WHO-Einteilung (Jaffe et al. 2009; Swerdlow et al. 2008) gibt es drei epidemiologische Subtypen. Das endemische BL betrifft insbesondere Kinder in Zentralafrika und wurde erstmals 1958 von Dennis Burkitt beschrieben. Daneben gibt es das sporadische BL (Morton et al. 2006) und die HIV-assoziierte Form des BL (Shiels et al. 2011).

Die Pathogenese des BL ist abhängig von der konstitutiven Aktivierung des *MYC*-Proto-Onkogens, das sich auf Chromosom 8 befindet und für das *MYC*-Protein codiert. Dieses ist als Transkriptionsfaktor für die Steuerung von Genen, die neben Zellproliferation und -differenzierung auch die Apoptose regulieren, verantwortlich (Hecht & Aster 2000; Klapproth & Wirth 2010). Die *MYC*-Überexpression im BL wird durch die Translokationen t(8;14), t(8;2) oder (8;22) verursacht (ar-Rushdi et al. 1983), was zum unkontrollierten Zellwachstum führt, welches wiederum - bedingt durch die hohe Proliferationsrate - weitere Zelltransformationen begünstigt (Dozzo et al. 2016).

Der Therapiestandard beim BL ist eine Polychemotherapie (Magrath et al. 1996). Eine ergänzende Behandlung mit dem mAK Rituximab konnte bei Erwachsenen das 5-Jahres-Überleben um bis zu 80 % verbessern (Hoelzer et al. 2014; Ribera et al. 2013). Obwohl BL zu den am besten behandelbaren aggressiven Erkrankungen des Lymphsystems gehören, machen Tummorrezidive (Kim et al. 2014) und Resistenzen die Erforschung neuer Wirkstoffe erforderlich. Nachdem Rituximab erfolgreich in der Klinik eingesetzt wurde, wird nun neue Hoffnung in Immuntherapien, wie die mAK Ofatumomab und Obinutuzumab (Awasthi et al. 2015) oder den bispezifischen Antikörper Blinatumomab sowie  $\alpha$ CD19-CAR-Therapien gesetzt (Dozzo et al. 2016). Aktuell werden auch Therapien mit Kontrollpunkt-Inhibitoren wie dem  $\alpha$ PD-1-Antikörper Nivolumab in B-Zell-Malignitäten intensiv erforscht (Ansell et al. 2015; Armand et al. 2013; Moskowitz et al. 2016).

## 1.6 AUFGABENSTELLUNG

Gegen Immun-Kontrollpunkte gerichtete Antikörper werden bereits seit einigen Jahren erfolgreich in der Tumorbehandlung eingesetzt und konnten das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom und anderen soliden Tumoren sowie hämatologischen Malignitäten verbessern (Abschnitt 1.4.4). Es wird allgemein angenommen, dass die Blockade gegenregulatorischer Moleküle wie PD-1 oder CTLA-4 funktionell erschöpfte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen reaktiviert und so eine Antitumor-Immunantwort wiederhergestellt wird (Ansell et al. 2015; Larkin et al. 2015; Schadendorf et al. 2015; Turnis et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit sollten neben der Reaktivierung dysfunktionaler T-Lymphozyten weitere Mechanismen untersucht werden, die zum verbesserten Überleben nach Behandlung mit  $\alpha$ PD-1- und  $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern beitragen.

Zur Entwicklung neuer Therapieverfahren sind genaue Kenntnisse über die Interaktion von Tumorzellen und Immunsystem während der Antitumor-Antwort notwendig. Zu diesem Zweck wurde exemplarisch ein präklinisches Spontan-Tumormodell des B-Zell-Lymphoms verwendet, welches die klinische Situation besser widerspiegelt als transplantierbare Maus-Lymphommodelle. Im Gegensatz zu transplantierten Tumoren, bei welchen mutierte Krebszellen in großen Mengen appliziert werden, entstehen endogene Tumoren aus einzelnen transformierten Zellen unter Umgehung einer Immunantwort. Diese kann im  $\lambda$ -MYC-Modell während der Tumorentwicklung untersucht und therapeutisch beeinflusst werden. Die verwendeten transgenen Mäuse tragen das humane Proto-Onkogen *MYC*, das unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Ig- $\lambda$ -Enhancers steht (Kovalchuk et al. 2000), und entwickeln in der zehnten bis 20. Woche nach Geburt autochthon B-Zell-Lymphome. Durch die Überexpression von *MYC* in B-Zellen kommt es zu einer unkontrollierten B-Zell-Expansion, welche sich in einer Hyperplasie der sekundären lymphatischen Organe, insbesondere von Milz und LK äußert. Somit ähneln Entstehung und Krankheitsverlauf im  $\lambda$ -MYC-Mausmodell der Situation beim humanen Burkitt-Lymphom.



In der folgenden Arbeit sollten Mechanismen der Tumorkontrolle durch PD-1- und CTLA-4-blockierende Antikörper untersucht und dabei unten stehende Fragen geklärt werden:

- Können funktionell erschöpfte T-Zellen in  $\lambda$ -MYC-Mäusen durch die Behandlung mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern reaktiviert werden?
- Was passiert mit den B-Lymphomzellen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung?
- Spielen zelluläre Reparaturmechanismen wie Apoptose oder Seneszenz eine Rolle bei der verzögerten Tumorentwicklung nach *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie?
- Haben Zytokine Einfluss auf die Tumorkontrolle durch die *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade?
- Welche Bedeutung haben regulatorische Treg-Zellen für die Entwicklung des  $\lambda$ -MYC-Tumors?
- Können Treg tumorassoziierte Antigene erkennen?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1:** Geräte & Verbrauchsmaterialien

Gerät	Firma
BD FACSAria™ III	Becton Dickinson, Heidelberg
BD LSR II Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Bestrahlungsanlage HWM-D-200 (Strahlungsquelle: 137 Caesium)	GammaCell40, Ottawa (Kanada)
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
EasySep® Magnet	Stemcell Technologies, Vancouver (Kanada)
Einmalpipetten 5/10/25ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmalzählkammer C-Chip	Peqlab, Erlangen
Eismaschine AF 200	Scotsman, Mailand (Italien)
FACS-Röhrchen, klein	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Braunschweig
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühlzentrifuge Megafug 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Mehrlochplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikroskop Aksioskop HE mit AxioCam MRc5 (Axiovision Release 4.6.3 Software)	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwabach
Petrischalen	Greiner, Frickinghausen

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
Reaktionsgefäße 15/50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Air liquid, Düsseldorf
Schüttler IKA®-Schüttler MTS 4	Fröbel Laborgeräte, Lindau
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofer, Reutlingen
Spritze Omnifix® Luer Lock Solo 20m	B.Braun, Melsungen
Spritzenfiltervorsätze (0,22 µm)	neoLab, Heidelberg
Sieb, Cell strainer (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Tischzentrifuge Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellkulturflaschen Cellstar®	Greiner, Frickinghausen

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2:** Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Firma
2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Frankfurt
5-Dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-Galactopyranosid (C <sub>12</sub> FDG)	Life Technologies, Frankfurt
<i>AIM V® AlbuMAX® Serum Free Medium</i>	Life Technologies, Frankfurt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
Bafilomycin A1	Tocris Bioscience, Bristol
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>DirectPCR® Lysis Reagent</i>	peqLab, Erlangen
dNTP	Invitrogen, Carlsbad (USA)

<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i>	Life Technologies, Frankfurt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natrium-Salz	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Frankfurt
Ionomycin, Calcium-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>IC Fixation Buffer</i>	eBioscience, Frankfurt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Life Technologies, Frankfurt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>MEM Non-Essential Amino Acid Solution (100x)</i>	Life Technologies, Frankfurt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Life Technologies, Frankfurt
<i>10x ThermoPol Reaction Buffer</i>	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>OneComp eBeads</i>	eBioscience, Frankfurt
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Frankfurt
<i>10x Permeabilization Buffer</i>	eBioscience, Frankfurt
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	peqLab, Erlangen
<i>10x Reaction Buffer</i>	Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>RPMI 1640 ohne L-Glutamin</i>	Life Technologies, Frankfurt
Streptavidin-β-Galactosidase (500 U/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq Polymerase	Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>Tissue Tek® O.C.T.™ Compound</i>	Sakura, Alphen (Niederlande)
Trypanblau	Life Technologies, Frankfurt
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Tween 20	ICN, Eschwege

### 2.1.3 Medien und Puffer

**Tabelle 3:** Verwendete Puffer und Medien

Medium / Puffer	Zusammensetzung
Basismedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 oder 10 % FKS (hitzeinaktiviert) 100 U / ml Penicillin-G-Natrium 100 µg / ml Dihydrostreptomycinsulfat 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) 50 µM 2-Mercaptoethanol
Carbonatpuffer (pH 9,5)	0,1 M Natriumcarbonat in Millipore-Wasser
Einfriermedium	90 % FKS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
10x Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7,4)	8,25 g Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) 1,00 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> ) 37,0 g Natrium-EDTA ad 100 ml Millipore-Wasser
FACS-Puffer mit/ohne EDTA	PBS 2 % FKS (hitzeinaktiviert) 1 % Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) mit/ohne 2 mM EDTA

### 2.1.4 Kits

**Tabelle 4:** Verwendete Kits

Kit	Firma
Annexin V Apoptosis Detection Kit	eBioscience, Frankfurt
Cell Proliferation Dye eFluor® 450	eBioscience, Frankfurt
EasySep™ Mouse CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies, Vancouver (Kanada)
EasySep™ Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit	Stemcell Technologies, Vancouver (Kanada)
Foxp3/Transkription Factor staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Senescence β-Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technologies, Danvers (USA)

### 2.1.5 Mäuse

Für diese Arbeit wurden transgene  $\lambda$ -MYC-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund verwendet, welche zur Aufrechterhaltung der Zucht mit wt-C57BL/6-Mäusen (Jackson Laboratory, USA) verpaart wurden. Diese Mäuse exprimieren das humane Proto-Onkogen *MYC*, welches unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Verstärkerelementes für die Ig $\lambda$ -Kette exprimiert wird (Kovalchuk et al. 2000). Somit kommt es zu einer Überexpression von *MYC* in allen B-Zellen, welche in der Folge unkontrolliert proliferieren. Zehn bis 20 Wochen nach Geburt entwickelten die  $\lambda$ -MYC-Mäuse spontan B-Zell-Lymphome und wurden nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome gemäß Tierschutzgesetz innerhalb weniger Tage abgetötet. Zu den Abbruchkriterien aus dem Versuchstierantrag gehörten verdickte Lymphknoten (LK), Abdomen-Schwellung, Kurzatmigkeit, Schmerzsymptomatik (gekrümmter Rücken), Gewichtsabnahme, struppiges Fell, Vitalitätsverlust, Absonderung von der Gruppe und Apathie. Der Krankheitsverlauf spiegelt die Situation beim humanen Burkitt-Lymphom wider (Abschnitt 1.5) und führt zu einer Hyperplasie der sekundären lymphatischen Organe, insbesondere von Milz und LK. Als Kontrolle dienten nicht-transgene C57BL/6-Mäuse, welche im Folgenden wt-Mäuse genannt werden.

Des Weiteren wurden DREG-Mäuse („Depletion of **R**egulatory T Cells“) benutzt, die von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen und mit wt-C57BL/6- und  $\lambda$ -MYC-Mäusen verpaart wurden. DREG-Mäuse haben ebenfalls einen C57BL/6-Hintergrund und exprimieren ein Hybridprotein, in welchem der Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und das Reporterprotein GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) fusioniert sind. Mithilfe dieses DTR-GFP-Fusionsproteins, das unter der Kontrolle des Foxp3-Locus (Lahl & Sparwasser 2011) steht, können Foxp3<sup>+</sup> Treg zum einen durch DT-Gabe spezifisch depletiert und zum anderen über GFP direkt detektiert und folglich auch ohne intrazelluläre Färbung sortiert werden.

Um Mechanismen der Tumorsuppression zu erforschen, wurde auch mit p21-defizienten Mäusen auf B6/129-Hintergrund (B6;129S2-*Cdkn1a*<sup>tm1Tyj</sup>/J) (Brugarolas et al. 1995) gearbeitet, welche bei Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) erworben wurden. Diese Mäuse wurden mit wt-C57BL/6 rückgekreuzt und die p21<sup>+/+</sup>, p21<sup>+/-</sup> und p21<sup>-/-</sup> Wurfgeschwister-Mäuse wie beschrieben (Cheng et al. 2000) genotypisiert. Für *In-vivo*-Untersuchungen wurden p21<sup>-/-</sup> mit  $\lambda$ -MYC-Mäusen verpaart und die p21<sup>-/-</sup> x  $\lambda$ -MYC<sup>-/+</sup> -Tiere verwendet.

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Therapeutische Antikörper

**Tabelle 5:** Therapeutische Antikörper für *In-vivo*-Versuche

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
PD-1	J43	Arm. Hamster IgG	BioXCell, West Lebanon (USA)
CTLA-4	UC10-4B9	Arm. Hamster IgG	BioLegend, San Diego (USA)

### 2.1.6.2 Depletionsantikörper

**Tabelle 6:** Depletionsantikörper für *In-vivo*-Versuche

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
IFN- $\gamma$	XMG1.2	Ratte IgG1	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
Asialo-GM1	polyklonal	Kaninchen Ig	eBioscience, Frankfurt
TNF	XT3.11	Ratte IgG1	BioXCell, West Lebanon (USA)
CD122 (TM- $\beta$ 1)	polyklonal	Ratte IgG2b	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
Thy-1.2 (MmTC)	2G5	Maus IgG2a	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München

### 2.1.6.3 Detektionsantikörper

**Tabelle 7:** Fluoreszenz-markierte Detektionsantikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD8a	53-6.7	Ratte IgG2a	eBioscience, Frankfurt
CD8b	eBioH35-17.2	Ratte IgG2b	eBioscience, Frankfurt
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a, $\kappa$	eBioscience, Frankfurt

Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, Frankfurt
Helios	22F6	Armenischer Hamster IgG	eBioscience, Frankfurt
CD19	1D3	Ratte IgG2a	BD Bioscience, Heidelberg
CD19	6D5	Ratte IgG2a, κ	BioLegend, San Diego (USA)
B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a, κ	BD Bioscience, Heidelberg
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	BD Bioscience, Heidelberg
CD11c	N418	Arm. Hamster IgG	BioLegend, San Diego (USA)
PD-1	J43	Arm. Hamster IgG	eBioscience, Frankfurt
PD-1	RMP1-30	Ratte IgG2b, κ	eBioscience, Frankfurt
CTLA-4	UC10-4B9	Arm. Hamster IgG	BioLegend, San Diego (USA)
CTLA-4	1B8	Arm. Hamster IgG	Life Technologies, Frankfurt
CD69	H1.2F3	Arm. Hamster IgG	eBioscience, Frankfurt
CD137	17B5	Golden Syrian Hamster IgG	eBioscience, Frankfurt
MHC I (H-2Kb)	CTKb	Maus IgG2a	Bio-Rad AbD Serotec, Kidlington (UK)
MHC II (I-A/I-E)	2G9	Ratte IgG2a, κ	BD Bioscience, Heidelberg
IFN-γ	XMG 1.2	Ratte IgG1, κ	BioLegend, San Diego (USA)
TNF	MP6-XT22	Ratte IgG1, κ	eBioscience, Frankfurt
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b	eBioscience, Frankfurt
Ki-67	SolA15	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, Frankfurt

#### 2.1.6.4 Panning-Antikörper

**Tabelle 8:** Antikörper für das B-Zell-Panning

Antigen	Klon	Firma
B220	TIB146	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
IgM	HB88	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
κ	HB58	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München



### 2.1.6.5 Antikörper für *In-vitro*-Versuche

**Tabelle 9:** Unmarkierte Antikörper für *In-vitro*-Versuche

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD3	145-2C11	Arm. Hamster	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
CD28	37N	Syr. Hamster	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
MHC Klasse II (I-A <sup>b</sup> /I-E)	M5/114.15.2	Ratte IgG2b, κ	eBioscience, Frankfurt

### 2.1.6.6 Murine rekombinante Zytokine

**Tabelle 10:** Rekombinante murine Zytokine für *In-vitro*-Versuche

Zytokin	Quelle	Firma
rIL-2	E.coli	PeptoTech, Hamburg
rIFN-γ	E.coli	PeptoTech, Hamburg
rTNF	E.coli	PeptoTech, Hamburg

### 2.1.6.7 Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

**Tabelle 11:** Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
p16 <sup>INK4a</sup>	polyklonal	Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ki-67	SolA15	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, Frankfurt
Hoechst® 33342		Kernfärbung	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
YO-PRO®		Kernfärbung	Molecular Probes, Eugene (USA)

### 2.1.7 Primer

Für die Genotypisierung der  $\lambda$ -MYC-Mäuse (Abschnitt 2.2.1) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit zwei verschiedenen Primer-Paaren durchgeführt (Tabelle 12). Eines amplifizierte das Mauspezifische Haushaltsgen *Cd79b* (Fragmentgröße ~300 bp) und wurde als interne PCR-Kontrolle verwendet, das andere amplifizierte das *MYC*-Gen (~450 bp). Für die Genotypisierung der DEREK-Mäuse wurde das Primer-Paar P442/443 verwendet, welches das *DTReGFP*-Fusionsgen amplifiziert (~500 bp). Bei den p21-defizienten Mäusen wurde die p21-Bande (~900 bp) mit dem Primer-Paar oIMR8294 / oIMRo845 amplifiziert, die Mutanten-Bande (~700 bp) mit oIMR8294 und oIMR8296.

**Tabelle 12:** Primer für die Genotypisierung der  $\lambda$ -MYC-, DEREK/ $\lambda$ -MYC-, p21/ $\lambda$ -MYC-Mäuse

Primer	Gen	Sequenz
E2 intfwd	$\lambda$ -MYC	GCTCGTCTCAGAGAAGCTGG
12 rev	$\lambda$ -MYC	ATCTCTCCAGATCTGCTATCTC
B29-18F	<i>Cd79b</i>	GTGGCACGGAACTTCTAGTC
B29-9R	<i>Cd79b</i>	CTTGTCAAGTAGCAGGAAGA
P442	<i>DTReGFP</i>	CCCAGGTTACCATGGAGAGA
P443	<i>DTReGFP</i>	GAACCTCAGGGTCAGCTTGC
oIMR8294 (Common)	<i>p21/Cdkn1</i>	AAGCCTTGATTCTGATGTGGGC
oIMR0845 (wild type)	<i>p21/ Cdkn1</i>	TGACGAAGTCAAAGTTCCACCG
oIMR8296 (Mutant Reverse)	<i>p21/ Cdkn1</i>	GCTATCAGGACATAGCGTTGGC

### 2.1.8 Software

**Tabelle 13:** Software

Methode	Software	Firma
Durchflusszytometrie	BD FACSDiva™ FlowJo 8.8.6	Becton Dickinson, Heidelberg Treestar Inc., Ashland (USA)
Auswertung und Statistik	GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla (USA)
Graphik und Text	Adobe Illustrator CS5 Adobe Photoshop CS5 MS Office	Adobe Systems, San José (USA) Adobe Systems, San José (USA) Microsoft, Redmond (USA)

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Genotypisierung der Mäuse

Die  $\lambda$ -MYC-Mäuse wurden mittels PCR genotypisiert. Hierzu wurde ein kleines Stück des Ohres verwendet, welches zur Nummerierung der Mäuse ausgestanzt worden war. Dieses wurde bei 55 °C über Nacht in *DirectPCR Lysis Reagent* (200  $\mu$ l) und Proteinase K (0,3 mg / ml) im Heizblock inkubiert.

Bei 85 °C wurden die Proben nach 45 min in die PCR eingesetzt (Tabelle 14A). Auf diese Weise wurde die MYC-Expression auch in DERE $\lambda$ -MYC- und p21/ $\lambda$ -MYC-Mäusen nachgewiesen. Bei den DERE $\lambda$ -MYC-Tieren wurde neben der MYC-PCR zusätzlich eine DERE $\lambda$ -PCR (Tabelle 14B), bei p21/ $\lambda$ -MYC-Mäusen eine p21- und Mutanten-PCR (Tabelle 14C) durchgeführt.

**Tabelle 14A:** Reagenzien und Temperatur-Verlauf für PCR zur Genotypisierung der  $\lambda$ -MYC-Mäuse

Mastermix	Volumen	Temperatur-Verlauf im Thermocycler für MYC:	
10x Reaction Buffer	5 $\mu$ l		
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l	94°C	Pause
10 mM dNTP Mix	1 $\mu$ l	94°C	4 min
Taq Polymerase	0,3 $\mu$ l	94°C	45 s
100 $\mu$ M Primer E2 fwd	0,5 $\mu$ l	58°C	30 s
100 $\mu$ M Primer 12 rev	0,5 $\mu$ l	72°C	1 min 30 s
100 $\mu$ M Primer B29-18F	0,5 $\mu$ l	72°C	10 min
100 $\mu$ M Primer B29-9R	0,5 $\mu$ l	4°C	Pause
H <sub>2</sub> O steril	37,6 $\mu$ l		
DNA	1,5 $\mu$ l		

} 35 Zyklen

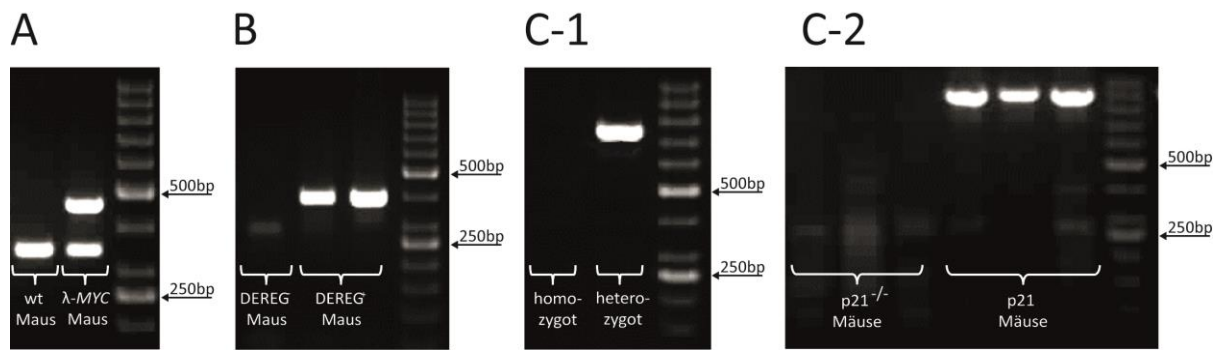
**Tabelle 14B:** Reagenzien und Temperatur-Verlauf für PCR zur Genotypisierung der DEREK-Mäuse

Mastermix	Volumen	Temperatur-Verlauf im Thermocycler für DTReGFP:	
10x NEB Thermo Buffer	2,5 µl		
10 mM dNTP Mix	0,5 µl	94°C	5 min
Taq Polymerase	0,4 µl	94°C	1 min
100 µM Primer P442	0,25 µl	60°C	1 min
100 µM Primer P443	0,25 µl	72°C	1 min
H <sub>2</sub> O steril	20,6 µl	72°C	10 min
DNA	0,5 µl	4°C	Pause

**Tabelle 14C:** Reagenzien und Temperatur-Verlauf für PCR zur Genotypisierung der *p21*<sup>-/-</sup>-Mäuse

Mastermix	Volumen	Temperatur-Verlauf im Thermocycler für <i>p21</i> :	
10x Reaction Buffer	1,20 µl		
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,20 µl	94°C	Pause
2,5 mM dNTP Mix	0,96 µl	94°C	3 min
Taq Polymerase	0,2 µl	94°C	30 s
20 µM Primer oIMR8294	0,8 µl	64°C	1 min
20 µM Primer oIMR8296	0,8 µl	72°C	1 min
20 µM Primer oIMR8294	0,8 µl	72°C	2 min
20 µM Primer oIMRo845	0,8 µl	10°C	Pause
H <sub>2</sub> O steril	4,84 µl		
DNA	2 µl		

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung einer Gelelektrophorese (*MYC*: 2 % Agarose-Gel; *DEREG*: 1,6 % Agarose-Gel; *p21*: 1,5 % Agarose-Gel) aufgetrennt. Anschließend wurden die *MYC*-positiven (Abbildung 2.1A), die *DEREG*-positiven (Abbildung 2.1B) und die *p21*-defizienten (Abbildung 2.1C) Mäuse ermittelt.



**Abbildung 2.1:** Elektrophorese-Gel nach der PCR zur Genotypisierung von  $\lambda$ -MYC-, DEREg- und p21-Mäusen. **(A)** Amplifizierung der DNS von MYC-positiven Mäusen in Spur 2, Spur 1 entstammt MYC-negativen wt-Mäusen. Die obere Bande entspricht dem humanen MYC-Amplikon (~450 bp), die unteren stellen das Maus-spezifische *Cd79b*-Amplikon (~300 bp) dar. **(B)** DNS-Amplifizierung von DEREg-positiven Mäusen und das Amplikon des DTReGFP-Fusionsgens (~500 bp) in Spur 2 und 3, während Spur 1 eine DEREg-negative Maus zeigt. **(C-1)** Mutanten-Bande (~700 bp) in Spur 2 amplifiziert. **(C-2)** p21-Amplikon (~870 bp) in Spur 4-6, welches bei den p21-defizienten Mäusen in Spur 1-3 fehlt. Es wurde in allen Fällen eine 50 bp-DNS-Leiter verwendet. Durchführung der PCR durch A. Geishauser, Helmholtz-Zentrum München.

## 2.2.2 Zellkultur und Zelllinien

**Tabelle 15:** Verwendete Zelllinien

Name	Charakteristik	Referenz
291	B-Zell-Lymphom-Zelllinie aus kranken $\lambda$ -MYC-Mäusen (CBL-Hintergrund)	generiert im Labor R. Mocikat (C. Brenner 2010)
B16F0	Melanom-Zelllinie (CBL-Hintergrund)	bezogen von der LGC Standards GmbH, Wesel (Fidler 1975; Nicolson et al. 1978)

Zur Prävention von Kontamination durch Pilze, Bakterien oder Viren wurden alle Zellkulturarbeiten unter aseptischen Bedingungen (Sterilwerkbank) durchgeführt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in Basismedium (5 % FKS) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten. Sowohl die adhärenente Zelllinie B16F0 als auch die Suspensionszelllinie 291 wurden alle zwei Tage im Verhältnis 1 : 10 geteilt. Die B16F0-Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert, mit 9 ml Basismedium (5 % FKS) vom Flaschenboden gelöst und in frischem Basismedium (5 % FKS) kultiviert

### 2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus lymphoiden Organen

Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und die Milz ebenso wie axilläre, inguinale und mandibuläre Lymphknoten (un)steril entnommen. Zur Generierung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe durch ein Sieb mit einer Porengröße von 40 µm in MEM-Medium gedrückt. Die LK eines Tieres wurden immer vereinigt. Nach Inkubation in Erythrozyten-Lysepuffer wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen und die Zellzahl mithilfe von Einmalzählkammern ermittelt.

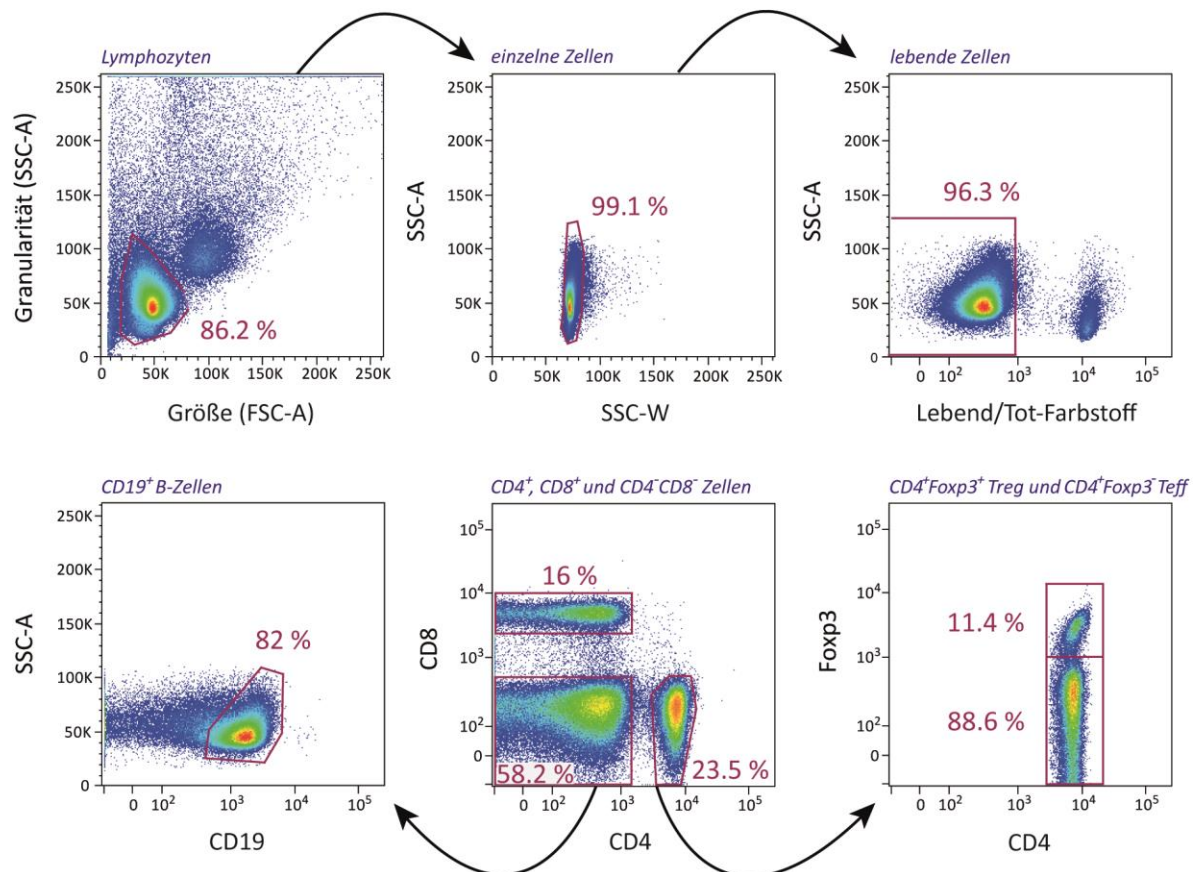
### 2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Oberflächenantigenen auf Zellen oder intrazellulären Molekülen wurde die Durchflusszytometrie, auch als FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) bezeichnet, herangezogen. Die durchflusszytometrische Bestimmung der spezifisch angefärbten Zellen erfolgte am *BD LSR II Flow Cytometer*. Die Daten wurden mit der *FlowJo*-Software ausgewertet, wobei für die Datenanalyse die unten abgebildete Gating-Strategie zur Eingrenzung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie der CD19<sup>+</sup> B-Zellen genutzt wurde (Abbildung 2.2).

Für die Detektion der Oberflächenantigene wurden die zu untersuchenden Zellen (1 x 10<sup>6</sup> pro 50 µl FACS-Puffer) mit den zugehörigen Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern (mAK) (Tabelle 7) für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die optimale Antikörperkonzentration wurde zuvor austitriert. Lebende und tote Zellen wurden durch die zusätzliche Verwendung der *LIVE/DEAD® Fixable Blue* -Lösung voneinander unterschieden.

Zur Erfassung intrazellulärer Zytokine (IFN-γ, TNF, IL-10) wurden die zu analysierenden Zellen zunächst mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A (Verdünnung jeweils 1 : 1000) in Basismedium (10 % FKS) stimuliert. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank und der oben beschriebenen Oberflächenfärbung wurden die Zellen fixiert (*IC Fixation Buffer*; 30 min, 4 °C) und die Zellmembranen permeabilisiert (*1x Permeabilization Buffer*). Die intrazellulären Zytokine wurden schließlich mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörper in 100 µl *1x Permeabilization Buffer* (40 min, 4 °C) gefärbt. Um die Transkriptionsfaktoren Foxp3 und Helios oder das nukleäre Antigen Ki-67 zu detektieren, wurden die Zellen ohne vorangegangene Stimulation mit dem *Foxp3 Staining Buffer Set* fixiert (30 min – 24 h, 4 °C), permeabilisiert und mit Fluoreszenz-markierten mAK für die intrazelluläre Färbung inkubiert (40 min, 4 °C). Sofern möglich, wurden für die Versuche Isotyp-Kontrollen durchgeführt, d.h. Färbungen mit Antikörpern von gleichem Isotyp und Spezifität.

Fehlten passende Isotypkontrollen, wurde eine FMO-Färbung (*Fluorescence Minus One*) durchgeführt.

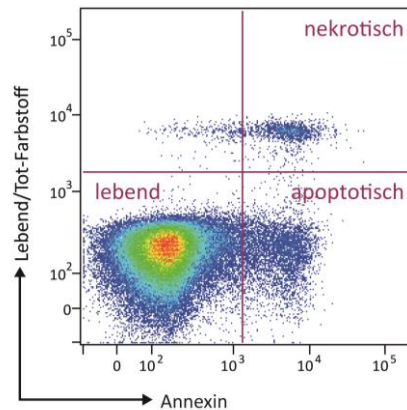


**Abbildung 2.2:** Allgemeine Gating-Strategie zur Bestimmung von T- und B-Lymphozyten am FACS, dargestellt am Beispiel von wt-Splenozyten. Innerhalb der lebenden Lymphozyten wurde unterschieden zwischen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen sowie einer doppelnegativen Population, in welcher die  $CD19^+$  B-Zellen eingegrenzt wurden. Die  $CD4^+$  T-Zellen wurden unterteilt in die Foxp3-exprimierenden Treg und Foxp3-negative Teff.

### 2.2.5 Apoptosedetektion

Zur durchflusszytometrischen Detektion apoptotischer sowie nekrotischer Milz- und LK-Zellen, wurden diese entsprechend den Vorgaben des Herstellers mit dem *Annexin V Apoptosis Detection Kit* (Tabelle 4) angefärbt. Wegen der Calcium-Abhängigkeit von Annexin V durften während des Versuches keine Puffer mit EDTA oder andere Calcium-Chelatoren verwendet werden. Das im Kit für die Vitalitätsfärbung enthaltene Propidiumiodid wurde, da es für eine intrazelluläre Färbung nicht geeignet war, durch die *LIVE/DEAD® Fixable Blue* - Lösung ersetzt.

Im FACS sind lebende Zellen Annexin-negativ und *LIVE/DEAD*<sup>®</sup> *Fixable Blue*-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und *LIVE/DEAD*<sup>®</sup> *Fixable Blue*-negativ und nekrotische Zellen Annexin-positiv und *LIVE/DEAD*<sup>®</sup> *Fixable Blue*-positiv (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3:** Darstellung einer durchflusszytometrischen Bestimmung von apoptotischen (Annexin-positiv und lebend/tot-negativ) und nekrotischen Zellen (Annexin-positiv und lebend/tot-positiv) einer wt-Milz.

## 2.2.6 Seneszenzdetektion

Zur Bestimmung seneszenten Zellen wurden für eine qualitative Auswertung neben lichtmikroskopischen auch Immunfluoreszenz-Aufnahmen erstellt. Um zusätzlich eine genaue quantitative Bestimmung zu erhalten, wurden FACS-Analysen durchgeführt.

### 2.2.6.1 Mikroskopische Detektion mit einem Seneszenz $\beta$ -Galaktosidase Kit

Für Vorversuche wurde die Seneszenz in Organschnitten und Einzelzellsuspensionen mit dem *Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit* (Tabelle 4) gemäß Hersteller-Protokoll nachgewiesen. Unter physiologischen Bedingungen ist die lysosomale  $\beta$ -Galaktosidase bei pH 4 - 4.5 aktiv. Durch eine Anhäufung von Lysosomen wird das Enzym in seneszenten Zellen überexprimiert und die Aktivität der Seneszenz-Assoziierten (SA)- $\beta$ -Galaktosidase kann bereits bei pH 6 gemessen werden. Daher nahmen im *Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit* nur seneszenzente Zellen bei pH 6 nach der Hydrolyse des Substrates X-Gal durch die SA- $\beta$ -Galaktosidase eine blaue Farbe an und erschienen im Vergleich zu nicht seneszenten Zellen vergrößert. Die Mikroskop-Aufnahmen wurden mithilfe des



AxioskopHE-Mikroskopes mit integrierter AxioCam MRc5-Kamera erstellt, welches mit der AxioVision-Software ausgestattet war (Tabelle 1).

### 2.2.6.2 Immunhistochemische Detektion mit p16<sup>INK4a</sup>

Die Immunfluoreszenzfärbung des oft als Seneszenz-Biomarker verwendeten Tumorsuppressors p16<sup>INK4a</sup> wurde in Kooperation mit Dr. Heidi Braumüller und Birgit Fehrenbacher von der Hautklinik der Universität Tübingen mit den dort etablierten Methoden durchgeführt und analysiert.

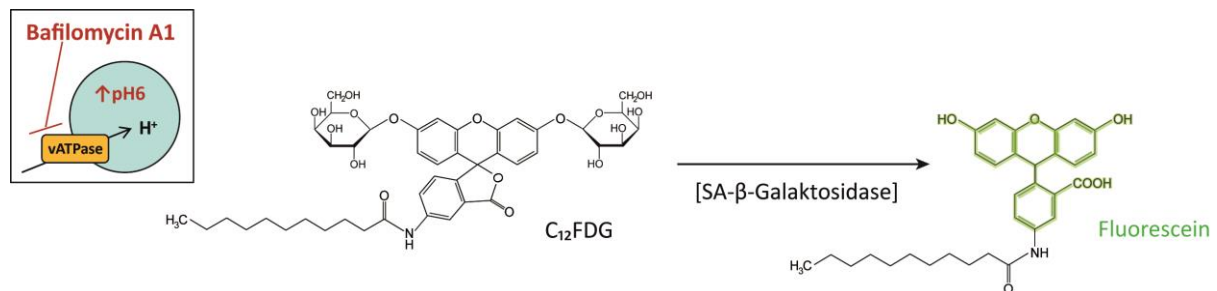
### 2.2.6.3 Durchflusszytometrische Detektion mit C<sub>12</sub>FDG

Um eine exakte quantitative Auswertung der zellulären Seneszenz und die Gegenfärbung von Oberflächenantigenen zu ermöglichen, wurde eine FACS-basierte Methode (Debacq-Chainiaux et al. 2009) angewendet. Das Protokoll hierfür, wie von Ernst und Kollegen (2015) publiziert, wurde von Prof. Dr. Kirsten Lauber und Roman Hennel von der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Klinikums Großhadern in München übernommen.

Bei der durchflusszytometrischen Seneszenzdetektion wurde die Aktivität der lysosomalen SA- $\beta$ -Galaktosidase mithilfe ihres Substrates, des fluorogenen Moleküls 5-Dodecanoylamino fluorescein-di- $\beta$ -Galactopyranosid (C<sub>12</sub>FDG), gemessen. Dazu wurde zunächst der lysosomale pH-Wert durch den vakuolaren H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase)-Hemmer Bafilomycin A1 auf pH 6 angehoben. Bevor C<sub>12</sub>FDG von der SA- $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert wird, ist es membrangängig und nicht-fluoreszierend. Gelangt das Molekül in die Zelle, werden die Galactosyl-Reste durch die SA- $\beta$ -Galaktosidase abgespaltet. Dadurch entsteht ein Fluorescein-Derivat, welches durch seinen lipophilen C12-Rest in der Zellmembran verankert ist und in der Zelle verbleibt (Abbildung 2.4). Bei der FACS-Analyse wurden die Zellen als seneszent betrachtet, wenn zum einen das C<sub>12</sub>FDG-Signal im FITC-Kanal hoch war und zum anderen eine bestimmte Seitwärts-Streuung (SSC-A) erreicht wurde, welche die Granularität der Zellen angibt und aus der Überexpression der Lysosomen in seneszenten Zellen resultiert.

Für die Färbung wurden  $1 \times 10^6$  frische Milzzellen mit PBS gewaschen und mit 100 nM Bafilomycin A1 in 300  $\mu$ l serumfreiem Medium (SFM) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 50  $\mu$ M C<sub>12</sub>FDG in 100  $\mu$ l SFM hinzugefügt und die Suspension wiederum 1 h bei 37 °C inkubiert, um eine Substratumsetzung zu ermöglichen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit LIVE/DEAD® Fixable Blue-Lösung sowie Detektionsantikörpern gefärbt (Abschnitt 2.2.4) und innerhalb weniger Stunden am FACS vermessen. Zur Kontrolle und zur Festsetzung der Gates wurden wt-Milzzellen verwendet.



**Abbildung 2.4:** Allgemeines Prinzip der durchflusszytometrischen Seneszenzdetektion mithilfe der lysosomalen SA-β-Galaktosidase-Aktivität bei pH 6. Nach Anhebung des lysosomalen pH-Wertes auf pH 6 durch Bafilomycin A1 hydrolysiert die SA-β-Galaktosidase ihr Substrat C<sub>12</sub>FDG zu einem Fluorescein-Derivat. Zellen gelten als seneszent, wenn das C<sub>12</sub>FDG-Signal im FITC-Kanal hoch ist und die Granularität (SSC-A) einen an wt-Milzen definierten Wert am Durchflusszytometer erreicht.

### 2.2.7 *In-vitro*-Seneszenzinduktion

Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  und TNF auf die Seneszenz in 291-Tumorzellen zu untersuchen, wurden diese, wie von Braumüller und Kollegen (2013) veröffentlicht, *in vitro* mit einer Kombination aus murinen, rekombinanten rIFN- $\gamma$  und rTNF inkubiert. Dazu wurden die 291-Zellen geerntet und  $0,2 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l Basismedium (5 % FKS) pro Vertiefung in einer 96-Well-Rundboden-Platte ausplattiert. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C mit variierenden Konzentrationen von rIFN- $\gamma$  [10 pg - 100 ng] und rTNF [1 pg - 10 ng] behandelt und die Seneszenz danach am Durchflusszytometer detektiert (Abschnitt 2.2.6.3).

### 2.2.8 *In-vitro*-Stimulation mit $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern

In eine 96-Well-Rundbodenplatte wurden 50  $\mu$ l  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörper (jeweils 2  $\mu$ g / ml) pro Vertiefung pipettiert und diese bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Antikörper-Lösung wurde am folgenden Tag abgesaugt und mit jeweils 200  $\mu$ l PBS und Basismedium (10 % FKS) gewaschen. Pro Vertiefung wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l Basismedium (10 % FKS) ausplattiert und für 72 h bei 37 °C mit IL-2 [50 U / ml] stimuliert.

### 2.2.9 Proliferations-Test mit *Cell Proliferation Dye*

Um bis zu sieben Zellteilung von T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* visualisieren zu können, wurden diese mit *Cell Proliferation Dye eFluor® 450* (CPD) markiert. Dazu wurden Milz- und LK-Zellsuspensionen aus wt- und  $\lambda$ -MYC-Mäusen im Verhältnis 1 : 1 mit einer 20  $\mu$ M CPD-Lösung (in vorgewärmtem PBS) gemischt und diese für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbung wurde durch die Zugabe des vier- bis fünffachen Volumens an kaltem Basismedium (10 % FKS) und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal mit kaltem Basismedium (10 % FKS) gewaschen und in Kultur genommen. Die CPD-Färbung wurde zur Kontrolle an Tag 0 im Durchflusszytometer gemessen.

Nach 72-stündiger *In-vitro*-Stimulation mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern (Abschnitt 2.2.8) wurden die Zellen geerntet, mit *Live/Dead® Fixable Blue*-Lösung markiert und anschließend die Oberfläche sowie intrazelluläres Foxp3 gefärbt. Bei einer Zellteilung wurde die CPD-Farbe gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, was sich in einer halbierten CPD-Fluoreszenzintensität widerspiegelte und eine Messung der T-Zell-Proliferation erlaubte.

### 2.2.10 B-Zell-Panning

Für Kokulturen verwendete T-Zellen aus Milz-Zellsuspensionen wurden vor ihrer Sortierung (Abschnitt 2.2.11) unter Verwendung von anti-B220-, anti-IgM- und anti- $\kappa$ -Panning-AK angereichert. Dazu wurden die Panning-AK (jeweils 5  $\mu$ g / ml) in 4 ml sterilem Carbonat-Puffer (0,1 M, pH 9.5) auf mittelgroßen Petrischalen ausplattiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schalen mit PBS gespült und 50 x 10<sup>6</sup> Zellen / 4 ml Basismedium (10 % FKS) pro Schale zugegeben und diese für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Mittels FACS wurden CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> und NK1.1<sup>+</sup> Zellen gefärbt und ein T-Zell-Anteil von > 80 % ermittelt. Durch die Vorsortierung wurde eine schnellere und effizientere Zellseparation mit dem EasySep® Magneten (Abschnitt 2.2.11.1) oder dem BD FACSAria™ III (Abschnitt 2.2.11.2) ermöglicht.

### 2.2.11 Zellseparation

Zur Gewinnung hoch angereicherter Zellpopulationen aus heterogenen Einzelzellsuspensionen wurden diese entweder manuell mithilfe von Zellseparations-Kits (Stemcell Technologies, Vancouver) nach Angaben des Herstellers isoliert oder maschinell mit dem BD FACSAria™ III sortiert. In beiden Fällen wurde zuvor ein B-Zell-Panning durchgeführt (Abschnitt 2.2.10).

#### 2.2.11.1 EasySep® Magnetseparation

Das Wirkprinzip der Magnetseparation beruht auf einer Negativselektion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einer Positivselektion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg. Für die Isolierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden die Zellen mit einer Mischung aus biotinylierten AK inkubiert, die gegen verschiedene Oberflächen-Antigene auf Maus-Zellen (z.B. CD19, CD8, CD45), aber nicht gegen CD4 gerichtet sind. An die biotinylierten AK werden magnetische Partikel gekoppelt und die so markierten, unerwünschten Zellen (positive Fraktion) werden in einem Magnetfeld an die Wand des Röhrchens gezogen, während die unmarkierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (negative Fraktion) in ein anderes Röhrchen überführt werden können. Die im FACS ermittelte Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag typischerweise bei 90 %. Zur Gewinnung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg werden diese mit einem  $\alpha$ CD25-PE-Detektionsantikörper markiert und mit magnetischen Partikeln inkubiert, welche gegen PE gerichtet sind. Wird das Röhrchen mit der Zellsuspension erneut in den Magneten gestellt, bleiben nun die markierten, erwünschten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg an der Wand klebend im Magnetfeld, während die nicht markierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Treg in ein anderes Röhrchen überführt oder verworfen werden können. Von den positiv sortierten Zellen waren im FACS ca. 80 % CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und davon wiederum ca. 70 % Foxp3<sup>+</sup> Treg.

#### 2.2.11.2 FACSAria™ III

Zur effizienteren Isolierung von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg wurden die Zellen aus DERE<sup>+</sup> wt- und  $\lambda$ -MYC-Mäusen mit dem BD FACSAria™ III in Zusammenarbeit mit Dr. Josef Mysliwietz sortiert. Damit war es möglich, die Foxp3<sup>+</sup> Treg ohne konjugierte magnetische Partikel und mit einer Reinheit von > 95 % von den restlichen Zellpopulationen zu trennen.

### 2.2.12 *In-vitro*-Kokulturen

Zur Untersuchung funktioneller Eigenschaften von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im  $\lambda$ -MYC-Lymphom-Modell wurden verschiedene *In-vitro*-Tests etabliert.

#### 2.2.12.1 Suppressions-Assay

Zur Überprüfung der suppressiven Kapazität der Treg im  $\lambda$ -MYC-Modell wurde ein *In-vitro*-Suppressions-Assay entwickelt. Dafür wurden am Vortag des Versuches  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern (Abschnitt 2.2.8) in die Vertiefungen einer 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert und die Platte über Nacht (4 °C) inkubiert. In einige, unstimulierte Kontroll-Wells wurde nur PBS gegeben.

Am Versuchstag wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg aus Milz und LK einer kranken  $\lambda$ -MYC- oder wt-Maus nach einem B-Zell-Panning (Abschnitt 2.2.10) mittels EasySep<sup>®</sup>-Magnetseparation (Abschnitt 2.2.11.1) isoliert. Auf die gleiche Weise wurden aus Milz- und LK-Zellen einer wt-Maus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff gewonnen und mit CPD-Lösung (Abschnitt 2.2.9) markiert, um sie später detektieren und ihre Proliferation messen zu können. Schließlich wurden die als Suppressor-Zellen fungierenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg mit den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CPD<sup>+</sup> Teff-Responder-Zellen in verschiedenen Verhältnissen in die Vertiefungen der 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert. In Kontroll-Kavitäten wurden nur CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CPD<sup>+</sup> Teff gegeben, wobei die Gesamtzahl an T-Zellen pro Vertiefung immer 10<sup>5</sup> betrug. Nach dreitägiger *In-vitro*-Stimulation wurde die Proliferation der Teff im FACS ermittelt.

#### 2.2.12.2 Tumor-Spezifitäts-Assay

Um zu untersuchen, ob CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus wt-Mäusen tumorreaktiv sind und spezifisch lymphomassoziierte Antigene erkennen können, wurden diese mithilfe des EasySep<sup>®</sup> Magneten isoliert (Abschnitt 2.2.11.1) und *in vitro* für sieben Tage bei 37 °C mit bestrahlten wt-Milzzellen, rIL-2 und mit den bestrahlten Tumorzelllinien 291 oder B16F0 restimuliert. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen sollten nach Erkennung der tumorassoziierten Antigene auf 291-Lymphomzellen proliferieren, bei der irrelevanten B16F0-Zelllinie hingegen nicht. Der Ableseparameter „Proliferation“ wurde durch die Färbung des nukleären Antigens Ki-67 und mittels CPD-Färbung (Abschnitt 2.2.9) durchflusszytometrisch erfasst.

Die Zellen der autologen *MYC*-Lymphomzelllinie 291 und der Melanomzelllinie B16F0 wurden am Vortag des Tumor-Spezifität-Versuches geerntet, auf  $[1 \times 10^5 \text{ Zellen} / 50 \mu\text{l}]$  in Basismedium (10 % FKS) eingestellt und mit 100 Gy bestrahlt. Die Tumorzellen, die nach der Bestrahlung nicht mehr proliferierten, wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und das Medium am nächsten Tag vor der Zugabe in die Kokultur nochmals gewechselt. Am Versuchstag wurden Splenozyten einer wt-Maus auf  $[1.5 \times 10^5 \text{ Zellen} / 50 \mu\text{l}]$  in Basismedium (10 % FKS) eingestellt und mit 30 Gy bestrahlt. Sie enthalten APZ zur T-Zell-Stimulation und wurden bis zu ihrem Einsatz in der Kokultur bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden LK- und Milzzellen einer wt-Maus entnommen und nach dem B-Zell-Panning (Abschnitt 2.2.10) mit  $\alpha\text{CD4}$ -Antikörper sowie CPD-Lösung markiert. Mithilfe des EasySep® Magneten (Abschnitt 2.2.11.1) wurden die  $\text{CD4}^+$  T-Zellen isoliert und auf  $[2 \times 10^5 \text{ Zellen} / 50 \mu\text{l}]$  in Basismedium (10 % FKS) eingestellt. Pro Vertiefung einer 96-Well-Rundboden-Platte wurden die bestrahlten Milzzellen, IL-2 [50 U / ml], die bestrahlten Tumorzellen und die sortierten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen in der genannten Reihenfolge in 200  $\mu\text{l}$  Basismedium (10 % FKS) ausgesät und sieben Tage bei 37 °C stimuliert. Je nach Fragestellung variierte die Zusammensetzung der Kokultur und es wurden entweder die bestrahlten Tumorzellen oder die bestrahlten Milzzellen weggelassen. Zum Nachweis einer spezifischen Peptid-T-Zell-Interaktion wurde zur Kokultur ein MHC-Klasse-II(I-A<sup>b</sup>/I-E)-blockierender Antikörper (Verdünnung 1 : 2000) hinzugefügt.

### 2.2.13 *In-vitro*-MHC-Induktion

Um die Peptidausbeute auf 291-Lymphomzellen für die Sequenzanalyse von MHC-gebundenen Peptiden (Abschnitt 4.7) zu erhöhen, wurden diese *in vitro* mit rIFN- $\gamma$  stimuliert. Für die Induktion von MHC-Klasse-I, insbesondere aber MHC-Klasse-II-Molekülen auf 291-Zellen (Brenner et al. 2010) wurde die Zelllinie in Basismedium (10 % FKS) mit rIFN- $\gamma$  [ $2 \times 10^4 \text{ U} / \text{ml}$ ] für 24 h oder 48 h bei 37 °C kultiviert (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5:** *In-vitro*-Induktion von MHC-Klasse-I/II-Molekülen auf 291-Lymphomzellen. Expression von MHC mit oder ohne rIFN- $\gamma$  [ $2 \times 10^4 \text{ U/ml}$ ], gemessen nach 24 h und 48 h. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=3). Die Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Testes ermittelt.

### 2.2.14 *In-vivo*-Versuche

Die Mäuse wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen im Tierstall des Hämatologikums (Großhadern) gehalten und ad libitum mit Futterpellets und angesäuertem Leitungswasser gefüttert. Alle Tierversuche waren konform mit den tierschutzrechtlichen Bestimmungen und von der *Regierung von Oberbayern* genehmigt.

Bei Überlebensversuchen wurden alle Tiere nach Auftreten von Krankheitssymptomen entsprechend den Tierschutzrichtlinien abgetötet. Zur Analyse der Immunantwort nach *In-vivo*-Therapieversuchen waren diese Mäuse meist nicht geeignet, da Unterschiede zwischen unbehandelten und therapierten Mäusen ab einem bestimmten Krankheitsschweregrad nicht mehr messbar waren.

Daher wurden zur Untersuchung der Immunantwort während der Initialphase eines Therapieversuches die Tiere bereits vor Auftreten der ersten Krankheitssymptome geopfert, um die Immunreaktion während der Frühphase beurteilen und die Tiere vergleichen zu können.

#### 2.2.14.1 Therapieversuche in $\lambda$ -MYC- und p21<sup>ko</sup> / $\lambda$ -MYC-Mäusen

Um den therapeutischen Erfolg durch Kontrollpunkt-Inhibitoren zu untersuchen, wurden die koinhibitorischen Moleküle CTLA-4 und PD-1 *in vivo* blockiert. Dazu wurden klinisch noch unauffällige  $\lambda$ -MYC- oder p21<sup>ko</sup> /  $\lambda$ -MYC-Mäuse i.p. mit einer Kombination aus 100  $\mu$ g  $\alpha$ PD-1- und 100  $\mu$ g  $\alpha$ CTLA-4-Antikörper behandelt. Für Überlebensversuche erfolgte die insgesamt viermalige AK-Gabe alle zehn Tage, beginnend am 55. Lebenstag. Zur Beurteilung der AK-Therapie in der Frühphase wurden die Tiere drei Tage nach der zweiten AK-Injektion abgetötet.

#### 2.2.14.2 Depletionsversuche in $\lambda$ -MYC-Mäusen

Um den Einfluss von IFN- $\gamma$ , TNF, NK-Zellen und T-Zellen auf den Therapieerfolg durch die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung zu untersuchen, wurden die genannten Zytokine und Zellpopulationen spezifisch depletiert. Es wurden dabei sowohl die Auswirkungen auf das Überleben als auch Effekte auf die Frühphase untersucht und mit der Tumorkontrollgruppe verglichen, welche nur die Behandlung mit den Kontrollpunkt-Inhibitoren erhalten hatte. Für alle Depletionsversuche wurden klinisch unauffällige  $\lambda$ -MYC Mäuse ab ihrem 55. Lebenstag verwendet.

Die Depletion von IFN- $\gamma$  und TNF erfolgte am selben Tag, 5 h vor der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe. Die übrigen Depletionsantikörper wurden 24 h vor der PD-1/CTLA-4-Blockade i.p. gespritzt. In Überlebensversuchen wurde die Gabe von Depletionsantikörpern nach Ende der viermaligen  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie im vorausgegangenen Behandlungsrhythmus bis zum Auftreten erster Krankheitssymptome fortgesetzt.

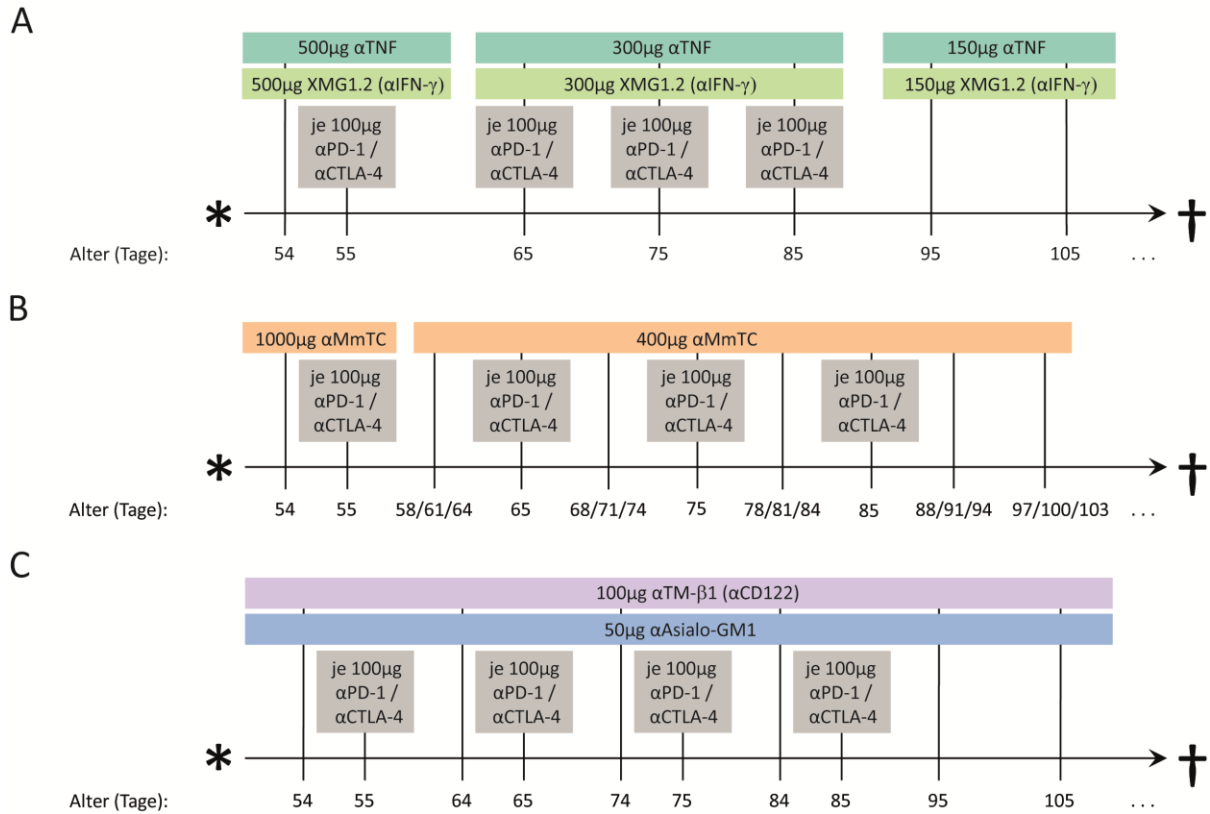
Zur *In-vivo*-Depletion des Zytokins IFN- $\gamma$  wurde während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie der IFN- $\gamma$ -neutralisierende Antikörper XMG 1.2 gemäß dem abgebildeten Therapieschema (Abbildung 2.6A) gespritzt. Analog dazu wurde das Zytokin TNF *in vivo* depletiert.

Mit dem MmTC-Antikörper (Kremmer et al. 1997), welcher an Thy-1.2 auf T-Zellen bindet, wurden *in vivo* alle T-Zellen depletiert. Den klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-Mäusen wurde parallel zur Kombinationsbehandlung mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern auch zwei Mal wöchentlich MmTC entsprechend dem abgebildeten Therapieschema (Abbildung 2.6B) injiziert.

Die zusätzliche Gabe des polyklonalen Antikörpers  $\alpha$ Asialo-GM1 (50  $\mu$ g pro Maus) gemäß dargestelltem Therapieschema (Abbildung 2.6C) führte zu einer Depletion von NK-Zellen und einer Monozyten-Untergruppe. Um eine exklusive Depletion von NK-Zellen zu erreichen, wurde der Antikörper TM- $\beta$ 1 (100  $\mu$ g pro Maus), der an CD122 auf NK-Zellen bindet, analog zur  $\alpha$ Asialo-GM1-Gabe eingesetzt.

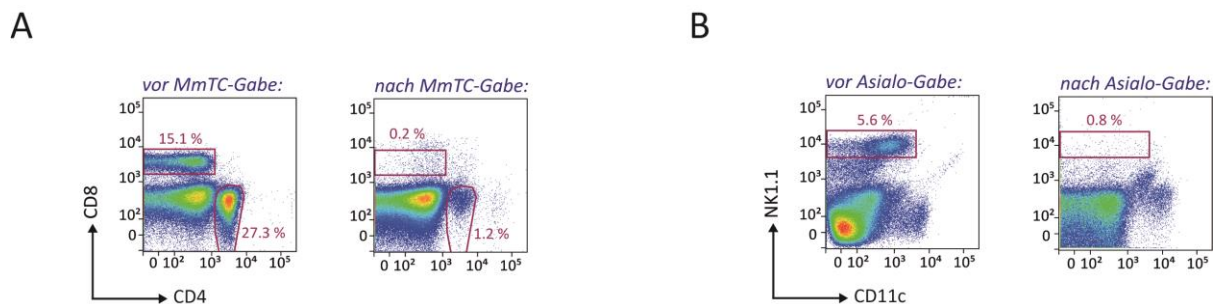
XMG 1.2, MmTC und TM- $\beta$ 1 wurden freundlicherweise von der Plattform „Monoklonale Antikörper“ des Helmholtz-Zentrums München zur Verfügung gestellt.





**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung der **(A)** Depletion der Zytokine IFN-γ oder TNF. **(B)** von T-Zellen mit MmTC und **(C)** von NK-Zellen mit αAsialo-GM1 oder αTM-β1-Antikörpern während der Kombinationstherapie mit den Kontrollpunkt-Inhibitoren αPD-1 und αCTLA-4.

Die Depletion der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen durch MmTC (Abbildung 2.7A) und die NK-Zell-Depletion durch αAsialo-GM1 (Abbildung 2.7B) in der Milz noch gesunder λ-MYC-Mäuse, die zuvor mit αPD-1/αCTLA-4-Antikörpern behandelt worden waren, wurden am FACS kontrolliert.



**Abbildung 2.7:** Nachweis für die erfolgreiche Depletion der jeweiligen Zellpopulationen durch MmTC und αAsialo in der Milz klinisch gesunder λ-MYC-Mäuse nach αPD-1/αCTLA-4-Therapie. **(A)** Kontrolle der T-Zell-Depletion nach MmTC-Gabe in einer repräsentativen Darstellung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Anteile. **(B)** Repräsentative Abbildung der NK-Zell-Anteile zur Überprüfung der NK-Zell-Depletion durch αAsialo-GM1.

### 2.2.15 Histologische Methoden

Zur histologischen Untersuchung wurden Milzen und LK der zu untersuchenden Tiere entnommen, in *Tissue Tek® O.C.T.™ Compound* eingebettet und auf Trockeneis an das durchführende Institut geschickt.

Immunhistologische Versuche und Immunfluoreszenz-Färbungen wurden in enger Kooperation mit Prof. Dr. Martin Röcken, Dr. Heidi Braumüller, Ellen Brenner und Birgit Fehrenbacher von der Hautklinik der Universität Tübingen durchgeführt und ausgewertet. Die verwendeten AK und Reagenzien sind in Tabelle 11 aufgeführt. Histopathologische Untersuchungen und HE-Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend vom Institut für Pathologie in Tübingen analysiert.

### 2.2.16 Statistische Auswertungen

Für die statistischen Auswertungen der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5 gearbeitet. Das Signifikanzniveau wurde graphisch durch ein ( $p < 0,05$ ), zwei ( $p < 0,01$ ) bzw. drei Sternchen ( $P < 0,001$ ) abgebildet. Nicht-signifikante Unterschiede wurden als „ns“ dargestellt oder nicht separat gekennzeichnet.

Für die in den Experimenten erhobenen Daten wurde eine Normalverteilung angenommen. Statistische Ausreißer innerhalb einer Stichprobe wurden mithilfe des Ausreißertests nach Grubbs bestimmt. Zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen diente der ungepaarte Student's t-Test, bei welchem die gleiche Varianz beider Gruppen vorausgesetzt wurde (F-Test). Durch die Welch-Korrektur konnten signifikante Varianz-Unterschiede ausgeglichen werden. Wurden drei oder mehr Gruppen miteinander verglichen, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur herangezogen. Zur Berechnung der Unterschiede zwischen Kaplan-Meier-Überlebenskurven aus den *In-vivo*-Versuchen diente der Log-Rank-Test.

Sofern nicht anders angegeben, bezieht sich  $n$  auf die Anzahl der Mäuse.

## 3 ERGEBNISSE

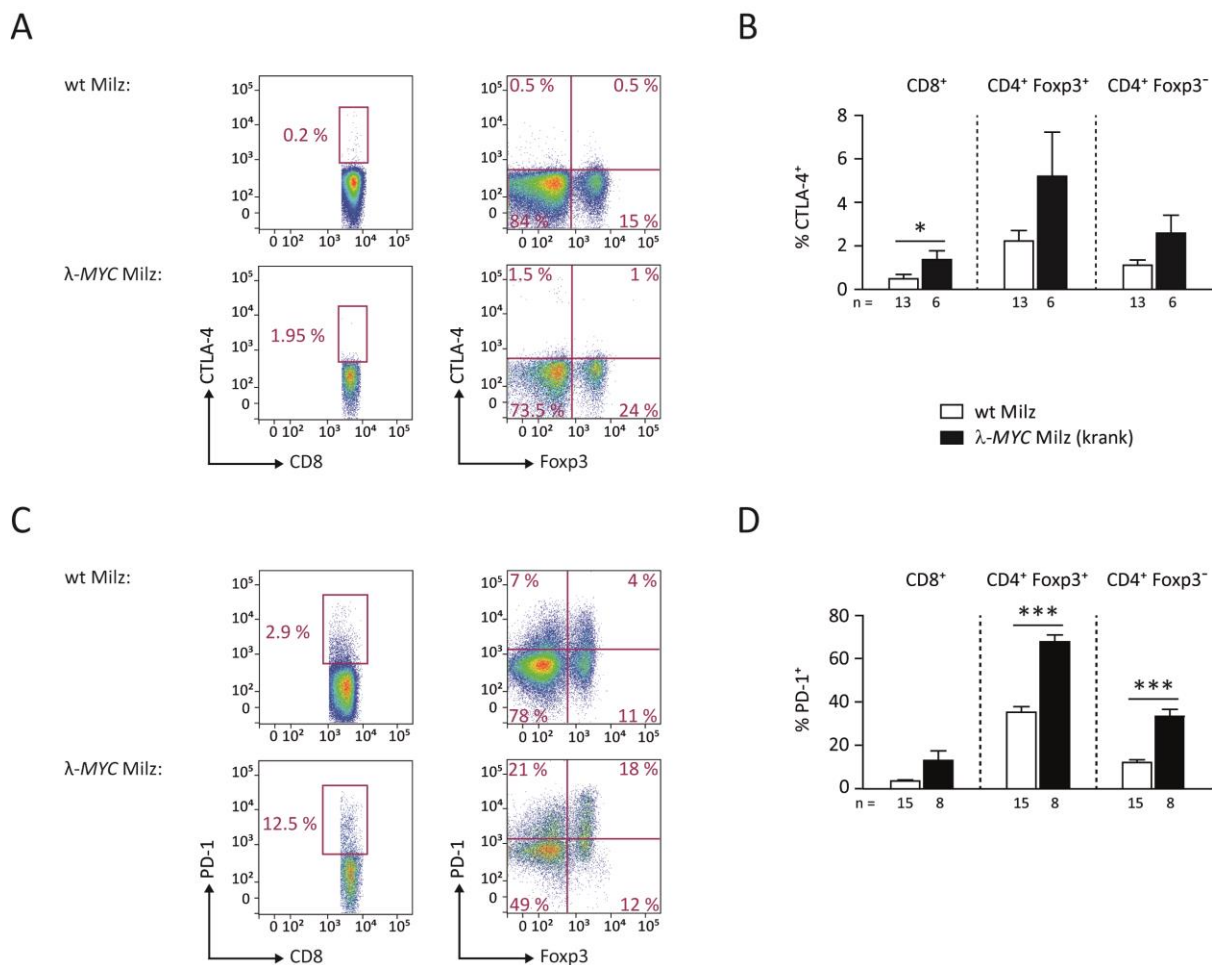
### 3.1 EINSATZ VON IMMUN-KONTROLLPUNKT-INHIBITOREN IM MURINEN $\lambda$ -MYC-LYMPHOMMODELL

Wider Erwarten hatten frühere Arbeiten gezeigt, dass T-Zellen in  $\lambda$ -MYC-Tumoren einen aktivierten Phänotyp aufwiesen und die Fähigkeit zur IFN- $\gamma$ -Produktion, Degranulation und *In-vivo*-Proliferation besaßen. Dennoch waren sie in ihrer Funktion eingeschränkt, da sie die Tumorprogression nicht verhindern konnten. Dies wurde zum einen auf eine Erschöpfung der T-Effektorzellen und zum anderen auf die Population der immunsupprimierenden CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg zurückgeführt. Durch eine Doppelblockade der inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 mit monoklonalen Antikörpern (mAK) *in vivo*, wie sie auch bereits in der Klinik durchgeführt wird (Larkin et al. 2015), konnte jedoch eine signifikante Überlebenssteigerung beobachtet werden (Riedel 2013). Allgemein wird angenommen, dass eine langanhaltende Antitumor-Immunantwort nach Therapie mit Immun-Kontrollpunkt-Inhibitoren durch die Wiederherstellung der T-Zell-Funktion ausgelöst wird (Turnis et al. 2015). Daher sollte zunächst die Funktion der T-Zellen untersucht werden.

#### 3.1.1 Vermehrte Expression der inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 auf intratumoralen T-Zellen

Für die Regulierung der T-Zell-Rezeptor (TZR)-vermittelten Antwort spielen die Moleküle CTLA-4 und PD-1 eine wichtige Rolle und werden von T-Effektorzellen nach deren Aktivierung hochreguliert. Der inhibitorische Rezeptor CTLA-4 konkurriert mit dem kostimulatorischen Molekül CD28 um die Bindung an die CD80/CD86-Liganden auf Antigen-Präsentierenden Zellen (APZ), führt aber im Gegensatz zu CD28 zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung. PD-1 ist ein weiterer Rezeptor, der T-Zell-Antworten negativ reguliert. Er wird häufig als Resultat einer chronischen TZR-vermittelten Aktivierung überexprimiert und zeigt in vielen Tumoren den Erschöpfungsgrad von T-Zellen an.

Die Expression von CTLA-4 und PD-1 auf zytotoxischen CD8<sup>+</sup> CTL, regulatorischen CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T-Effektorzellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die drei T-Zell-Populationen in  $\lambda$ -MYC-Tumoren wiesen im Vergleich zu wt-Mäusen eine signifikante Zunahme der inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 (Abbildung 3.1A und 3.1B) und PD-1 (Abbildung 3.1C und 3.1D) auf ihrer Oberfläche auf. Da Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen sowohl in wt- als auch in  $\lambda$ -MYC-Milzen wesentlich mehr CTLA-4 und PD-1 exprimierten als CD8<sup>+</sup> CTL und Foxp3<sup>-</sup> Teff, soll ihre Rolle im  $\lambda$ -MYC-Modell in Abschnitt 3.4 genauer untersucht werden.



**Abbildung 3.1:** Im Vergleich zu wt-T-Zellen erhöhte Expression der inhibitorischen Moleküle CTLA-4 und PD-1 auf intratumoralen Milz-T-Zellen. Repräsentative Abbildungen der **(A)** CTLA-4- und **(C)** PD-1- Expression auf CD8<sup>+</sup> CTL sowie CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff. Durchflusszytometrische Analyse der Expression mittels Oberflächenfärbung. Anteil **(B)** CTLA-4- und **(D)** PD-1-positiver CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff. Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SEM abgebildet. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Testes ermittelt.

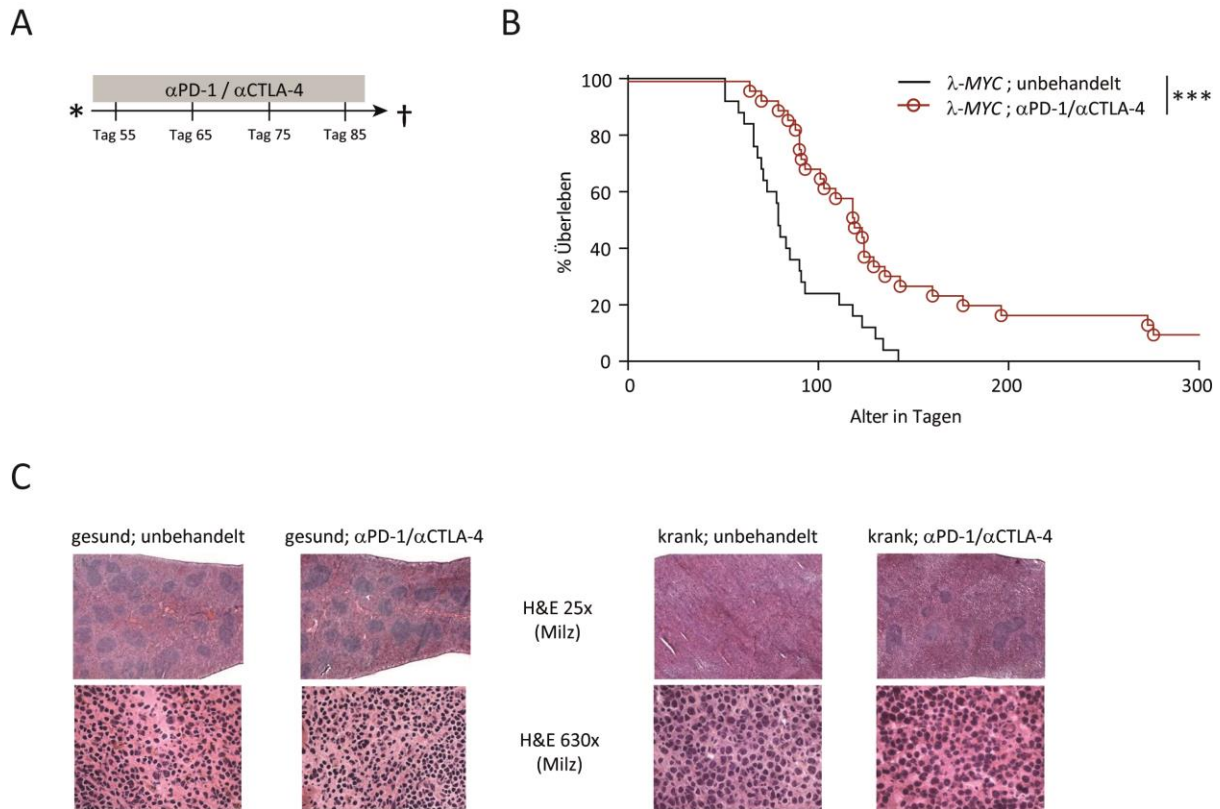
### 3.1.2 Überlebensvorteil und verbesserte Morphologie der Lymphorgane nach *In-vivo*-Blockade von PD-1 und CTLA-4

Da bereits für verschiedene Tumormodelle beschrieben wurde, dass die Hemmung inhibitorischer Signale zu einer Reaktivierung erschöpfter T-Zellen und zur Tumorregression beitragen kann, erschien die *In-vivo*-Blockade der auf intratumoralen T-Zellen hoch exprimierten PD-1- und CTLA-4-Rezeptoren als eine vielversprechende Möglichkeit, das Tumorwachstum aufzuhalten. Riedel (2013) konnte zeigen, dass im  $\lambda$ -MYC-Modell die *In-vivo*-Blockierung nur eines inhibitorischen Rezeptors keine verbesserte Tumorkontrolle zur Folge hatte, während eine Kombinationstherapie aus  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern das Überleben der Mäuse signifikant steigerte. Aufbauend auf diesen Resultaten, wurden die *In-vivo*-Therapieversuche fortgeführt, um die Rolle der T-Zellen und Mechanismen der Tumorkontrolle genauer zu untersuchen.

Für Überlebensversuche (Abschnitt 2.2.14) wurden klinisch gesunde  $\lambda$ -MYC-Mäuse ab ihrem 55. Lebensstag insgesamt viermal alle zehn Tage mit jeweils 100  $\mu$ g  $\alpha$ PD-1- und  $\alpha$ CTLA-4-Antikörper behandelt (Abbildung 3.2A). Im Vergleich zu der untherapierten Kontrollgruppe zeigten  $\lambda$ -MYC-Tiere nach der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung ein signifikant verbessertes Überleben (Abbildung 3.2B). In einigen der behandelten Mäuse wurde die Lymphomentwicklung sogar gänzlich unterdrückt, was in Anbetracht der hohen Aggressivität des  $\lambda$ -MYC-Tumors ein beeindruckendes Ergebnis darstellt.

Um die Immunantwort in der Frühphase der Therapie zu untersuchen, wurden  $\lambda$ -MYC-Tiere nach zweimaliger  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe geopfert, wenn sie noch keine Krankheitssymptome entwickelt hatten und mit unbehandelten Kontrolltieren gleichen Alters verglichen, die ebenfalls klinisch unauffällig waren.

Kryopräparate aus  $\lambda$ -MYC-Milzen wurden histologisch mit einer Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung untersucht (Abbildung 3.2C). Die Tiere wurden in klinisch gesunde und bereits erkrankte Mäuse unterteilt, wobei in beiden Gruppen ein Teil unbehandelt war und der andere mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern therapiert worden war.  $\lambda$ -MYC-Mäuse, deren lymphatische Organe noch nicht vergrößert waren, wiesen unabhängig von der Behandlung vollkommen normale Milzen auf.  $\lambda$ -MYC-Tiere hingegen, die bereits Tumoren entwickelt hatten, zeigten eine diffuse Infiltrierung von Tumorzellen, charakterisiert durch die Anwesenheit polymorpher, großer Nuclei. Die weiße Pulpa war in der kranken, unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Maus gänzlich durch Tumorzellen ersetzt, während sie in den behandelten, kranken Mäusen noch vorhanden war und eine erkennbare T-Zell-Zone aufwies.



**Abbildung 3.2:** Effekt der *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade auf das Überleben der  $\lambda$ -MYC-Mäuse und die Morphologie ihrer Milz. **(A)** Therapieschema. Für Überlebensversuche wurde, beginnend am 55. Lebensstag, klinisch unauffälligen  $\lambda$ -MYC-Mäusen alle 10 Tage eine Kombination aus jeweils 100  $\mu$ g  $\alpha$ PD-1 und  $\alpha$ CTLA-4-Antikörper insgesamt viermal i.p. injiziert. **(B)** Überleben der Mäuse dargestellt im Kaplan-Meier-Diagramm. Statistische Auswertung durch Log-Rank-Test. Verglichen mit der unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Kontrollgruppe (n=25) zeigten Mäuse nach der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie (n=29) ein signifikant verbessertes Überleben. **(C)** Repräsentative Aufnahmen von HE-Färbungen der Milz aus  $\lambda$ -MYC-Mäusen mit oder ohne  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung, die noch klinisch gesund oder bereits erkrankt waren. Durchführung der Histologie durch L. Quintanilla-Fend, Institut für Pathologie, Universität Tübingen.

### 3.1.3 Funktionsanalyse der T-Zellen nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade

Nachdem gezeigt worden war, dass eine *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie das Überleben der  $\lambda$ -MYC-Mäuse verlängert hatte, sollte die Antitumor-Immunantwort in therapierten Mäusen auf zellulärer Ebene studiert werden.

Um Aufschluss über die Funktion der T-Zellen nach der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung und damit eine mögliche Erklärung für das verbesserte Überleben der Tiere nach Therapie zu bekommen, wurden Aktivierungszustand, proliferative Kapazität und Zytokinproduktion der intratumoralen T-Zellen aus Milzen therapierter Mäuse untersucht und mit unbehandelten Kontrollen verglichen (Abbildung 3.3).

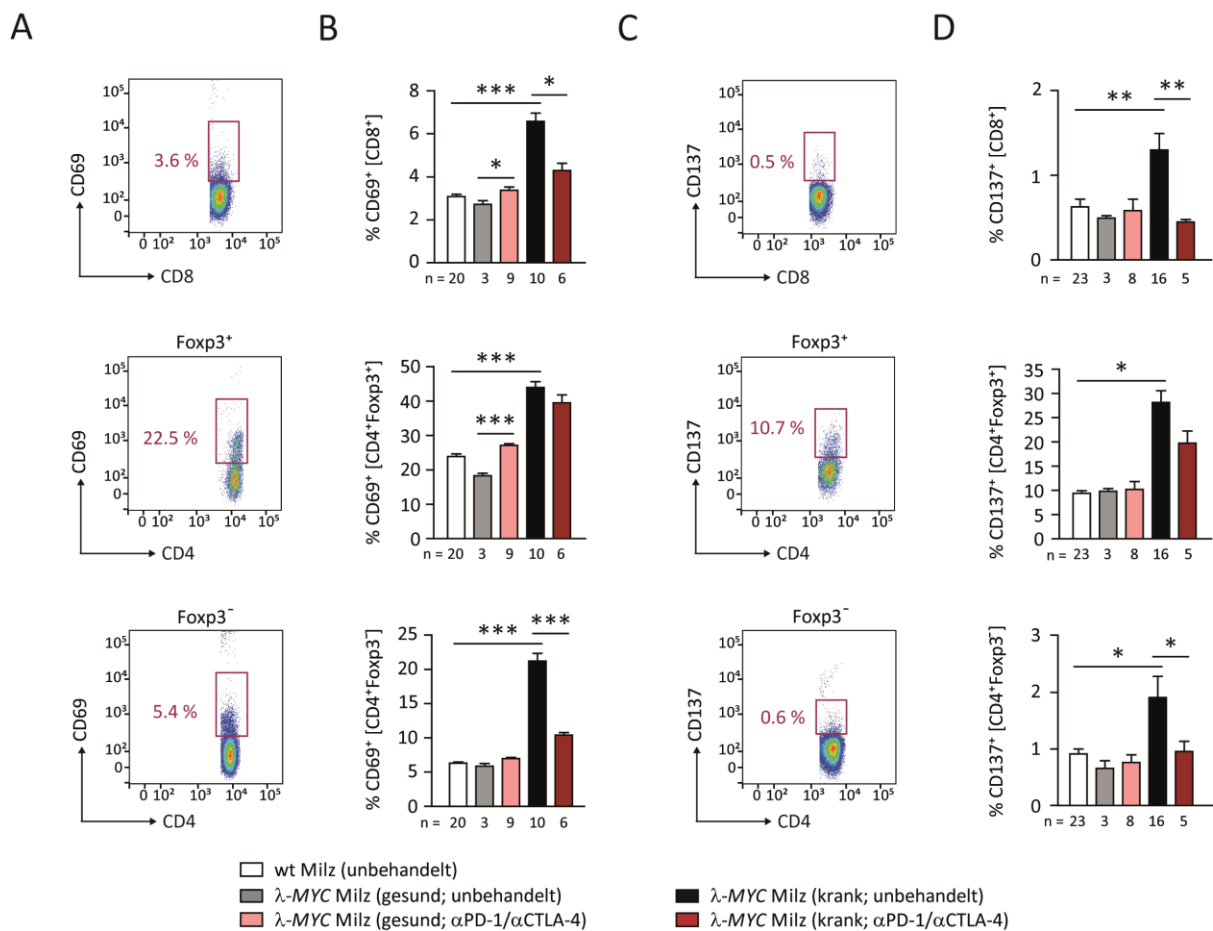
#### 3.1.3.1 Aktivierung der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff und CD8<sup>+</sup> CTL

Der T-Zell-Aktivierungszustand *in vivo* wurde mithilfe des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und des kostimulatorischen Rezeptors CD137 (4-1BB), welcher nach TZR-spezifischer Aktivierung auf der T-Zell-Oberfläche hochreguliert wird, untersucht.

In der durchflusszytometrischen Analyse von wt-Milzzellen wird deutlich, dass CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> CTL und CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> Teff die höchste CD69-Expression aufwiesen (Abbildung 3.3A). Die Gesamtauswertung in Abbildung 3.3B zeigt, dass alle tumorinfiltrierenden T-Zellen signifikant mehr CD69 exprimierten als entsprechende T-Zell-Populationen in der wt-Milz. Vergleich man klinisch gesunde, zweimalig  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierte  $\lambda$ -MYC-Mäuse mit unbehandelten Tieren gleichen Alters, wurde eine Zunahme des Aktivierungsmarkers CD69 nach Antikörper-Gabe beobachtet. Hatten die Tiere bereits Lymphome entwickelt, war die CD69-Expression in kranken, untherapierten  $\lambda$ -MYC-Mäusen hingegen höher als in viermalig  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-behandelten Mäusen.

Während CD8<sup>+</sup> CTL und CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> Teff kaum CD137 auf wt-Milzzellen exprimierten, betrug der Anteil CD137-positiver CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ungefähr 10 % (Abbildung 3.3C). Die Darstellung aller Ergebnisse in Abbildung 3.3D lässt erkennen, dass der Anteil CD137-exprimierender Treg in  $\lambda$ -MYC-Milzen sogar dreimal so hoch war wie in wt-Milzen und auch intratumorale CTL und Teff mehr CD137 auf ihrer Oberfläche hatten als entsprechende wt-Mäuse.

Somit scheint innerhalb der tumorinfiltrierenden T-Zellen vor allem die Population der Foxp3<sup>+</sup> Treg, aber auch ein geringer Teil der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen spezifisch über den TZR nach Erkennung eines bestimmten Tumorantigens aktiviert worden zu sein. Eine *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade in klinisch gesunden Mäusen hatte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen keine Auswirkung auf die CD137-Expression. In erkrankten Mäusen hingegen sanken die CD137-Expression und damit der Anteil TZR-spezifisch aktivierter T-Zellen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.



**Abbildung 3.3:** Aktivierungszustand der T-Zellen in klinisch gesunden und kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Erfassung der Aktivierungs-Marker **(A)** CD69 und **(C)** CD137 auf CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> Teff, dargestellt am Beispiel von wt-Splenozyten. Anteil **(B)** CD69- und **(D)** CD137-positiver T-Zellen in der Milz als Balkendiagramme zusammengefasst. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikanz mittels Student's t-Test ermittelt.



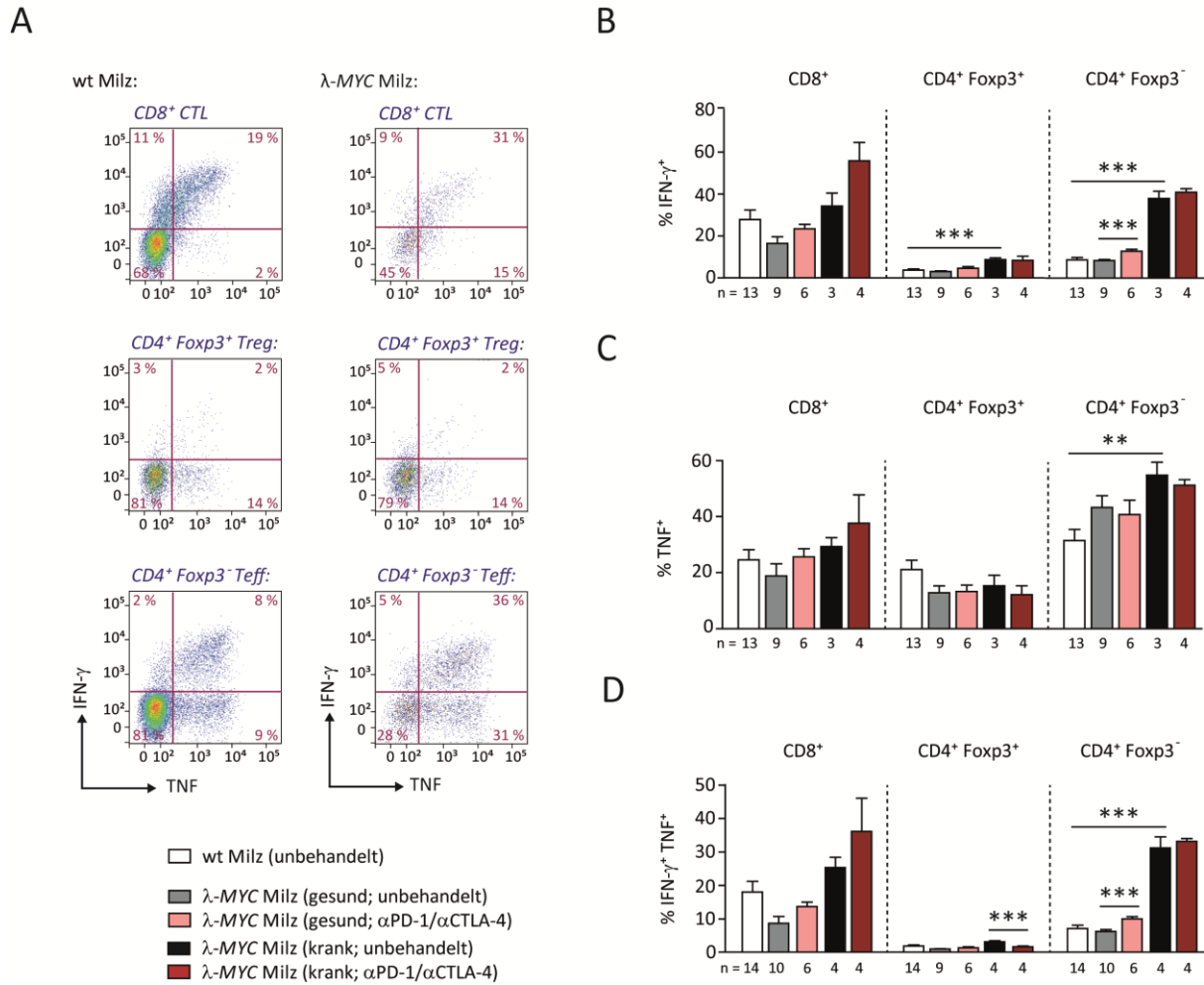
### 3.1.3.2 Gesteigerte Produktion der immunstimulierenden Zytokine IFN- $\gamma$ und TNF

Neben NK-Zellen sind ausdifferenzierte und aktivierte CTL- und Th1-Effektorzellen die wichtigsten Produzenten von IFN- $\gamma$ , schütten aber auch TNF aus. Da diese Zytokine essenziell für die Ausbildung einer Antitumor-Antwort sind, wurde die TNF- und IFN- $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff in Milzen von  $\lambda$ -MYC-Mäusen, die zuvor mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern therapiert worden waren, nach *Ex-vivo*-Stimulation mit PMA und Ionomycin gemessen. Durch Zugabe des intrazellulären Proteintransport-Inhibitors Brefeldin A wurde die Zytokinausschüttung unterdrückt, wodurch die Zytokine in den T-Zellen verblieben und nach intrazellulärer Färbung (Abschnitt 2.2.4) mittels FACS analysiert werden konnten.

Trotz der Erschöpfungszeichen in intratumoralen T-Zellen (Abschnitt 3.1.1) wird in Abbildung 3.4A deutlich, dass CD8<sup>+</sup> CTL und insbesondere auch CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff aus kranken  $\lambda$ -MYC-Milzen im Vergleich zu wt-Splenozyten mehr IFN- $\gamma$ - und TNF produzierten, während die Zytokinproduktion in Foxp3<sup>+</sup> Treg unverändert niedrig blieb.

Sowohl in klinisch gesunden als auch bereits erkrankten  $\lambda$ -MYC-Mäusen nahm nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie neben der Sekretion von IFN- $\gamma$  (Abbildung 3.4B) und TNF (Abbildung 3.4C) auch die IFN- $\gamma$ /TNF-Koproduktion (Abbildung 3.4D) durch CD8<sup>+</sup> CTL im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff aus Milzen klinisch unauffälliger Mäuse, die zuvor mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern behandelt worden waren, wiesen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Ausschüttung (Abbildung 3.4B) und IFN- $\gamma$ /TNF-Koproduktion (Abbildung 3.4D) auf.

In kranken Mäusen hingegen nahm die Zytokinproduktion (Abbildungen 3.4B-D) der Teff trotz  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung nicht zu. Lediglich bei CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg hatte die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung keine Auswirkung auf die Zytokinproduktion.



**Abbildung 3.4:** Gesteigerte IFN- $\gamma$ - und TNF-Produktion in T-Zellen von  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Nach vierstündiger Ex-vivo-Stimulation bei 37 °C mit PMA und Ionomycin wurden die T-Zellen nach einer Oberflächen- und intrazellulären Färbung hinsichtlich ihrer Zytokinausschüttung durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** Repräsentative Ergebnisse der Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF durch CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff aus Milzen von wt- und kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen. Quantitative Darstellung der Anteile **(B)** IFN- $\gamma$ - und **(C)** TNF-produzierender sowie **(D)** IFN- $\gamma$ /TNF-koproduzierender CTL, Treg und Teff. Abgebildet als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test berechnet.

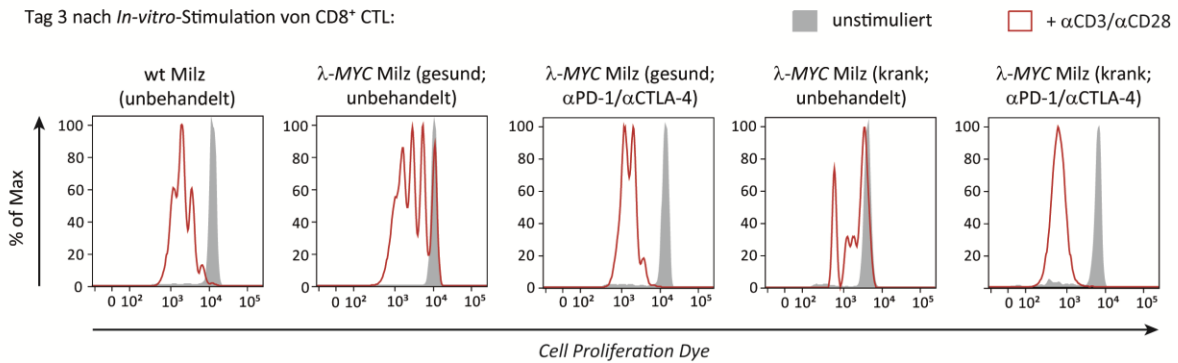
### 3.1.3.3 Verbesserte *In-vitro*-Proliferation und erhöhte Absolutzahl von T-Zellen

T-Zellen zeigten nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie im Vergleich zu unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Tieren eine Zunahme der T-Zell-Aktivierung (Abschnitt 3.1.3.1) und Produktion immunstimulierender Zytokine (Abschnitt 3.1.3.2), exprimierten gleichzeitig aber mehr CTLA-4 auf ihrer Oberfläche (Daten nicht gezeigt), welches als Erschöpfungsmarker gilt. Daher wurde die T-Zell-Funktion in Bezug auf die Restimulierbarkeit *in vitro* nach Inkubation mit immobilisierten  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern gemessen. Diese Art der *In-vitro*-Stimulation spiegelt die natürliche T-Zell-Aktivierung über die Antigenbindung an den TZR wider. Dazu wurden Milzzellen mit *Cell Proliferation Dye* (CPD) markiert (Abschnitt 2.2.9) und *in vitro* mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern sowie rIL-2 stimuliert (Abschnitt 2.2.10). Drei Tage später wurde anhand der CPD-Verdünnung die Proliferation der CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 3.5A).

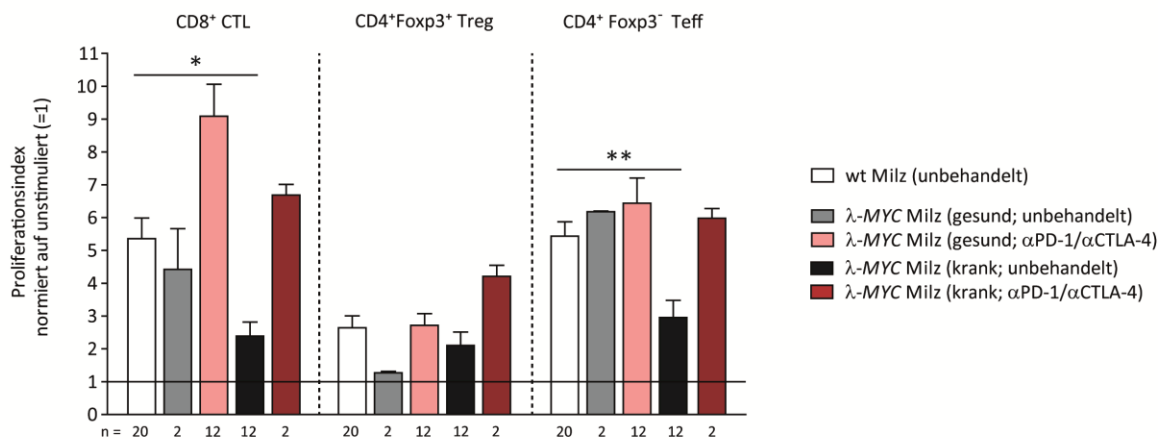
Riedel (2013) hatte gezeigt, dass T-Zellen durch die Zugabe von  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern *in vitro* stärker proliferierten als ohne Antikörper-Zusatz. Nun wurde untersucht, ob dies auch möglich war, wenn man Milzzellen aus zuvor mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern therapierten  $\lambda$ -MYC-Tieren *in vitro* stimulierte. Abbildung 3.5B zeigt die relative Proliferation der T-Zellen, die auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle normiert wurde, welche den Proliferationsindex = 1 erhielt. Im Vergleich zu wt-Milzzellen, ließen sich T-Zellen aus erkrankten  $\lambda$ -MYC-Mäusen *in vitro* kaum zur Proliferation stimulieren. Nach Therapie mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern war die *In-vitro*-Proliferation der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen tatsächlich erhöht. Erstaunlicherweise wurde gezeigt, dass selbst erschöpfte T-Zellen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie der  $\lambda$ -MYC-Mäuse reaktiviert wurden und nach  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Stimulation *in vitro* stärker proliferierten als T-Zellen unbehandelter Kontrollen.

Um zu überprüfen, ob sich die T-Zellproliferation in der absoluten Zellzahl der CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff in der Milz widerspiegelt, wurde die Zellzahl der gesamten Milz während der Zellaufarbeitung (Abschnitt 2.2.3) ermittelt und über den Anteil der einzelnen T-Zell-Populationen die absolute Zellzahl berechnet. In Abbildung 3.5C ist zu sehen, dass in erkrankten  $\lambda$ -MYC-Mäusen signifikant weniger CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen als in wt-Milzen gefunden wurden. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wurden nach der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie von  $\lambda$ -MYC-Tieren in der Milz mehr CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezählt. Diese Ergebnisse waren somit in Einklang mit der zuvor beobachteten gesteigerten Proliferation nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4 Behandlung. Ebenso war die absolute T-Zellzahl auch in kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung signifikant höher als in unbehandelten.

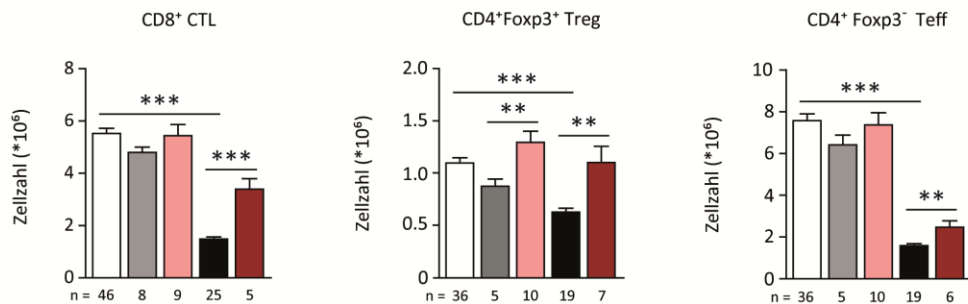
A

Tag 3 nach *In-vitro*-Stimulation von CD8<sup>+</sup> CTL:

B



C

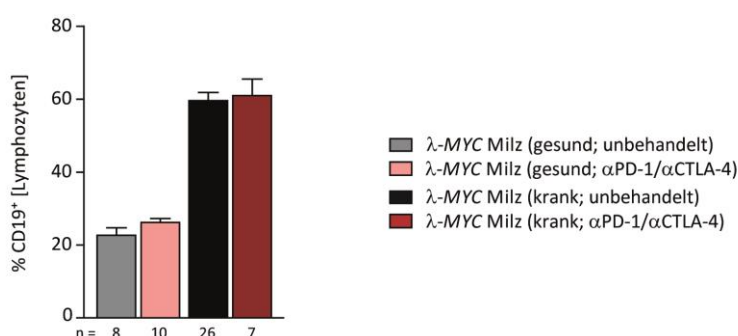


**Abbildung 3.5:** CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff aus λ-MYC-Mäusen, die zuvor mit αPD-1/αCTLA-4-Antikörpern behandelt wurden, lassen sich im Vergleich zu unbehandelten Tieren *in vitro* besser stimulieren, was durch die Absolutzellzahl bestätigt wird. Klinisch gesunden oder bereits erkrankten λ-MYC-Tieren wurde nach *In-vivo*-αPD-1/αCTLA-4-Therapie die Milz entnommen, die Splenozyten mit CPD markiert und für 72h mit immobilisierten αCD3/αCD28-Antikörpern sowie rIL-2 stimuliert. Kontrollen wurden ohne αCD3/αCD28-Stimulation inkubiert. **(A)** Analyse der CPD-Verdünnung mittels FACS. Repräsentative Histogramme, dargestellt am Beispiel von CD8<sup>+</sup> CTL. **(B)** Die relative Proliferation der T-Zellen in der Milz wurde als Proliferationsindex dargestellt, der auf die unstimulierte Kontrolle (=1) normiert wurde. **(C)** Quantitative Analyse der absoluten T-Zellzahl in der Milz nach *In-vivo*-Therapie mit αPD-1/αCTLA-4-Antikörpern im Vergleich zu unbehandelten λ-MYC-Mäusen. Abgebildet als Mittelwerte ± SEM. Signifikanzberechnung mithilfe des Student's t-Testes.

### 3.2 MECHANISMEN DER TUMORSUPPRESSION DURCH DIE *IN-VIVO*-THERAPIE MIT $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-ANTIKÖRPERN

In Abschnitt 3.1 wurde beschrieben, dass durch die *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nicht nur das Überleben signifikant verlängert wurde, sondern auch T-Zellen reaktiviert wurden. Sie hatten nach der Therapie einen aktivierten Phänotyp, produzierten mehr IFN- $\gamma$  und TNF und proliferierten *in vitro* stärker, was sich in der absoluten T-Zellzahl widerspiegelte. Die T-Zell-Reaktivierung bietet eine Erklärung für das verzögerte Tumorwachstum bei den Ansprechern nach Doppelblockade von PD-1 und CTLA-4. Auch in der Klinik wurde bereits für verschiedene Tumoren eine verzögerte Tumorprogression nach Behandlung mit Kontrollpunkt-Inhibitoren beobachtet (Larkin et al. 2015; Topalian et al. 2014). Da die Behandlung mit Kontrollpunkt-Inhibitoren bei den wenigsten dieser Patienten zu einer Tumordestruktion, sondern eher zu einer stabilen Erkrankung führte (Schadendorf et al. 2015; Wolchok et al. 2013), scheinen neben der Tumoreliminierung durch zytotoxische T-Lymphozyten auch andere Mechanismen für die Tumorkontrolle durch Immuntherapien benötigt zu werden.

Neben den T-Zellen wurden nun die Tumorzellen genauer untersucht. Der Anteil der CD19<sup>+</sup> Zellen an lebenden Lymphozyten (Abbildung 3.6) war nach Therapie der  $\lambda$ -MYC-Mäuse mit PD-1/CTLA-4-blockierenden Antikörpern im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen unverändert. Dies galt sowohl für klinisch gesunde als auch für bereits erkrankte  $\lambda$ -MYC-Tiere.



**Abbildung 3.6:** Kein Einfluss auf den Anteil der lebenden CD19<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz nach  $\alpha$ PD-1/  $\alpha$ CTLA-4-Behandlung im Vergleich zu untherapierten Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-Testes ermittelt.

T-Effektorzellen, die durch die *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade reaktiviert worden waren (Abschnitt 3.1.3), hatten die Lymphomzellen demnach nicht zerstört. Daher stellte sich die Frage nach anderen Tumorkontroll-Mechanismen, die das verlängerte Überleben der Tiere begründeten.

### **3.2.1 Untersuchung der Seneszenz nach PD1/CTLA-4-Inhibierung *in vivo***

Die Seneszenz zählt zu den wichtigsten zellulären Abwehrmechanismen gegen Tumorzellen. Sie wird durch eine irreversible Zellzyklus-Arretierung bei gleichzeitigem Verlust der Proliferationsfähigkeit charakterisiert. In Anlehnung an die von Braumüller und Kollegen (2013) veröffentlichten Ergebnisse wurde die zelluläre Seneszenz als möglicher Mechanismus für die Hemmung der Tumorprogression durch die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie genauer untersucht.

#### **3.2.1.1 Mikroskopische und durchflusszytometrische Detektion der Onkogen-induzierten Seneszenz mittels SA- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität**

Für die Induktion der Seneszenz wird die Aktivierung der wichtigsten anti-onkogenen Signalwege, nämlich der Tumorsuppressoren p53, p16 und Rb benötigt, welche in den meisten Tumoren inaktiviert sind. In der Literatur werden zwei Wege der Seneszenzinduktion, der p53-p21-Rb- oder der p16-Rb-Signalweg, postuliert, welche - ausgelöst durch Stressfaktoren wie Onkogene oder DNA-Schäden - eine irreversible Arretierung des Zellzyklus initiieren (Abschnitt 1.3.1).

Zur Überprüfung dieses Mechanismus wurde in Vorversuchen die Seneszenz mithilfe der etablierten Methode der Seneszenz-Assoziierten (SA)- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Da seneszente Zellen mehr  $\beta$ -Galaktosidase besitzen, spaltet dieses Enzym bereits bei pH 6, und nicht bei pH 4, Galaktosidase-Reste ab. Mit dem auf dieser Reaktion beruhenden *Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit* (Abschnitt 2.2.6.1) wurden Milzzellen zunächst mit X-Gal, einem  $\beta$ -Galaktosidase-Substrat, bei pH 6 inkubiert und die Substratumsetzung anhand der dadurch entstehenden blauen Färbung der Zellen mikroskopisch erfasst. Aufnahmen von Milz-Einzelzellsuspensionen (Abbildung 3.7A) belegen, dass in wt-Milzzellen keine blauen und damit seneszenten Zellen vorkamen. In den Splenozyten kranker  $\lambda$ -MYC-Tiere hingegen wurden bei pH 6 die charakteristisch vergrößerten und durch SA- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität deutlich blau gefärbten Zellen gefunden, die Ausdruck einer MYC-Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) waren.

Da sich mikroskopisch (Abschnitt 2.2.6.1) seneszente Zellen nur unzureichend quantifizieren lassen und einzelne Zellpopulationen nicht unterschieden werden können, wurde die Seneszenz in einer Immunfluoreszenz-Färbung mithilfe des Seneszenzmarkers p16<sup>Ink4a</sup> (Abschnitt 2.2.6.2) ermittelt. Zwar konnten nun einzelne Zellpopulationen detektiert werden, aber auch hier blieb die Quantifizierung der seneszenten Zellen mittels Auszählen von Sichtfenstern subjektiv.

Für eine exakte quantitative Analyse der zellulären Seneszenz und Ermittlung der Zellpopulationen wurde eine FACS-basierte Methode zur Ermittlung der SA- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Abschnitt 2.2.6.3) angewendet, welche über die Umsetzung ihres Substrates C<sub>12</sub>FDG (5-Dodecanoylaminofluorescein-di- $\beta$ -Galactopyranosid) mittels FACS gemessen wurde. Eine gleichzeitige Oberflächenfärbung ließ zudem eine Unterscheidung zwischen CD19<sup>+</sup> B-Zellen sowie CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu. Die in Abbildung 3.7B dargestellte durchflusszytometrische Auswertung mittels C<sub>12</sub>FDG zeigt, dass CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen als seneszent definiert wurden, wenn neben dem C<sub>12</sub>FDG-Signal im FITC-Kanal auch die Seitwärts-Streuung (SSC-A) eine bestimmte Höhe erreichte. Die durch die Seitwärts-Streuung gemessene Granularität einer Zelle nimmt im seneszenten Zustand durch die Anhäufung von Lysosomen zu. Zur Festsetzung der Gates wurden stets die wt-Milzzellen benutzt.

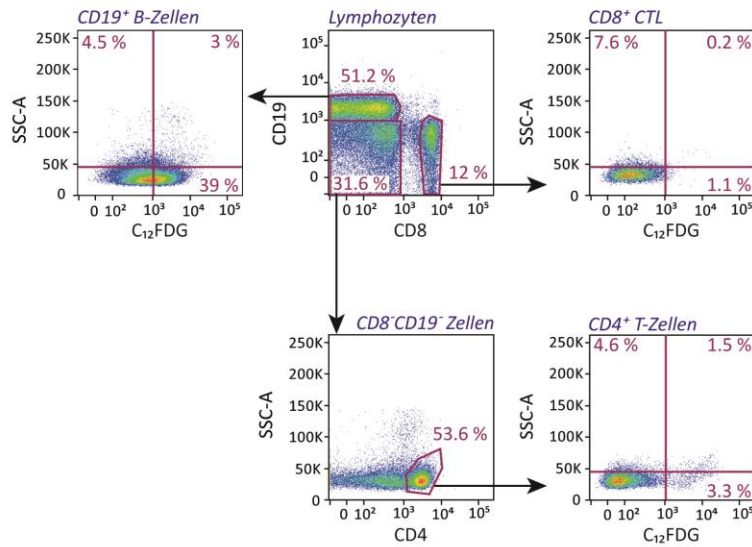
Wie bereits bei der mikroskopischen Analyse (Abbildung 3.7A) fand man auch mit der C<sub>12</sub>FDG-Methode (Abbildung 3.7C) in wt-Splenozyten kaum seneszente Zellen, während der prozentuale Anteil seneszenten B- und T-Zellen in Milzen kranker  $\lambda$ -MYC-Tiere signifikant erhöht war. Die OIS war in Lymphom-B-Zellen mit Abstand am stärksten ausgeprägt, was durch die Ermittlung der absoluten Zellzahlen in der Milz bestätigt wurde. Während nur 0.2 - 0.5 x 10<sup>6</sup> T-Zellen in der kranken  $\lambda$ -MYC-Milz seneszent waren, galt das für 20 x 10<sup>6</sup> und damit 40 % der B-Zellen.

A

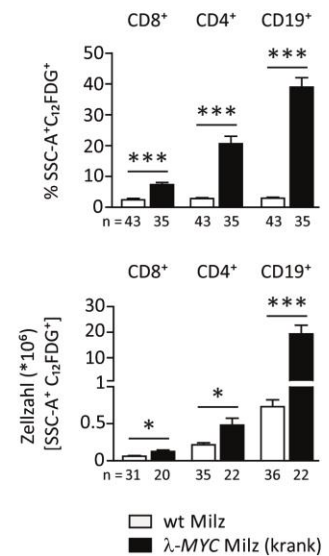
SA- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung bei pH 6:



B



C



**Abbildung 3.7:** Mikroskopische und durchflusszytometrische Seneszenzdetektion mittels SA- $\beta$ -Galaktosidase. **(A)** Exemplarische Aufnahme einer Milz-Einzelzellsuspension, die mithilfe des *Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kits* gefärbt wurde. Verglichen mit nicht seneszenten wt-Zellen waren seneszente Splenozyten kranker  $\lambda$ -MYC-Tiere durch die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bei pH 6 blau und vergrößert. **(B)** Repräsentative Darstellung der Seneszenzdetektion mittels FACS mittels C<sub>12</sub>FDG in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen am Beispiel von wt-Milzzellen, mit denen die Gates bestimmt wurden. Zellen wurden als seneszent definiert, wenn sie eine bestimmte Seitwärts-Streuung (SSC-A) erreichten und das C<sub>12</sub>FDG-Signal im FITC-Kanal hoch war. **(C)** Quantitative Analyse der SSC-A<sup>+</sup>C<sub>12</sub>FDG<sup>+</sup> seneszenten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen in wt- und kranken  $\lambda$ -MYC-Milzen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test.

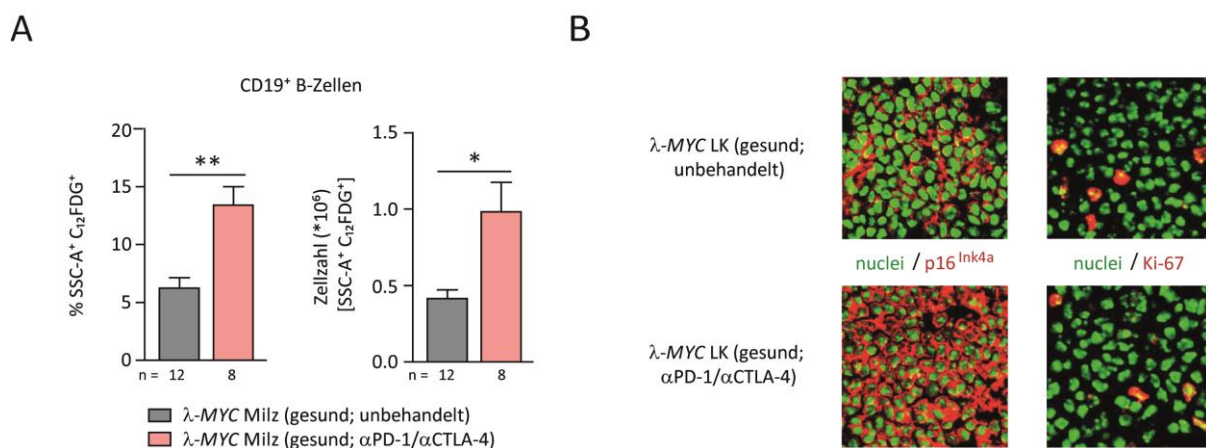


### 3.2.1.2 Seneszenzinduktion in B-Zellen durch die *In-vivo*- $\alpha$ PD1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie

Neben der in Abschnitt 3.2.1.1 beobachteten OIS in kranken  $\lambda$ -MYC-Tieren sollte geprüft werden, ob die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie in Tumorzellen Seneszenz auslösen kann, da bereits für unterschiedliche Tumormodelle eine Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) beobachtet wurde (Rader et al. 2013; Xue et al. 2007). Zur besseren Vergleichbarkeit und zum Ausschluss eines zu starken Einflusses der MYC-induzierten Seneszenz wurden klinisch gesunde  $\lambda$ -MYC-Tiere verwendet.

Tatsächlich wurde in Lymphomzellen der Milz eine signifikante prozentuale Zunahme der Seneszenz nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade im Vergleich zu untherapierten Kontrollen gemessen. Dies wurde durch die Erfassung der absoluten Zellzahl der seneszenten B-Zellen bestätigt (Abbildung 3.8A). Die  $C_{12}$ FDG-Methode erlaubt keine Parallelfärbung intrazellulärer Marker, da  $C_{12}$ FDG sonst aus den Zellen austreten würde. Daher konnte die Proliferationsfähigkeit, die in seneszenten Zellen verloren geht (Abschnitt 1.3.1), nicht durch eine Ki-67-Gegenfärbung ermittelt werden.

Eine Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 3.8B) mithilfe des intrazellulären Seneszenzmarkers  $p16^{Ink4a}$  bestätigte eine starke Zunahme der  $p16^{Ink4a}$ -positiven Lymphomzellen in den LK von  $\lambda$ -MYC-Tieren nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung im Vergleich zu untherapierten Kontrollen, während gleichzeitig die Ki-67-Expression abnahm.



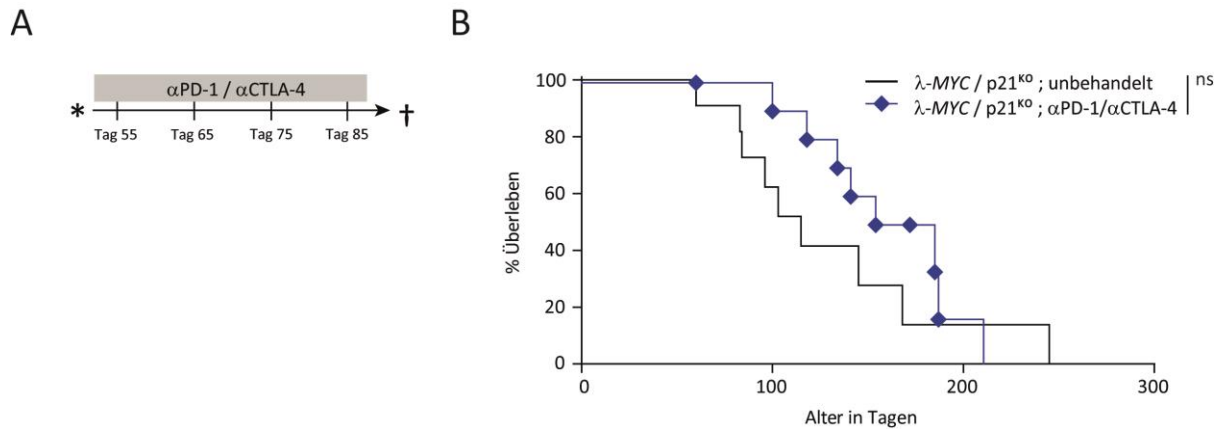
**Abbildung 3.8:** Seneszenzinduktion in Lymphomzellen nach *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie. **(A)** FACS-Analyse der SSC-A<sup>+</sup>C<sub>12</sub>FDG<sup>+</sup> seneszenten B-Zellen  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung im Vergleich zu untherapierten Kontrollmilzen. **(B)** Exemplarische Immunfluoreszenz-Aufnahmen von klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-LK mit oder ohne  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie und Detektion der B-Zell-Seneszenz mithilfe von  $p16^{INK4a}$  und Ki-67. Durchführung der Immunfluoreszenz durch H. Braumüller und B. Fehrenbacher, Hautklinik der Universität Tübingen.

### 3.2.1.3 *In-vivo*-Nachweis der Tumorsuppression durch die $\alpha$ PD1/ $\alpha$ CTLA-4-induzierte Seneszenz mithilfe von $p21^{KO}$ / $\lambda$ -MYC-Mäusen

Seneszenz wird über den p53-p21-Rb oder den p16-Rb-Signalweg induziert (Abschnitt 1.3.1). Während der Tumorsuppressor p53 sowohl Apoptose als auch Seneszenz auslösen kann, sind p21 und p16 wichtige Seneszenzmarker. Durch genetische Ausschaltung von p21 oder p16 lässt sich die Bedeutung der Seneszenzinduktion für den therapeutischen Effekt *in vivo* überprüfen. Dazu wurden p21-defiziente mit  $\lambda$ -MYC-Mäusen gekreuzt (Abschnitt 2.1.5). Die Kreuzung mit  $p16^{KO}$ -Mäusen war keine Option, da p16-defiziente Mäuse in gleichen Zeitraum wie  $\lambda$ -MYC-Mäuse B-Zell-Lymphome entwickeln und die Ursache für die Tumorbildung somit uneindeutig wäre. In  $p21^{KO}$ -Mäusen kommt es ebenfalls zur Lymphombildung, jedoch zu einem viel späteren Zeitpunkt, der sich nicht mit der MYC-induzierten Tumorbildung überschneidet. Sollte der therapeutische Erfolg der Kontrollpunkt-Inhibitoren tatsächlich das Ergebnis einer Seneszenzinduktion in Tumorzellen sein, sollten  $p21^{KO}$ / $\lambda$ -MYC-Mäuse trotz der *In-vivo*-Therapie mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern (Abschnitt 2.2.14.1) kein verlängertes Überleben im Vergleich zu untherapierten, p21-defizienten  $\lambda$ -MYC-Mäusen zeigen.

Nach viermaliger i.p. Gabe der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörper (Abbildung 3.9A) zeigten die therapierten p21-defizienten  $\lambda$ -MYC-Mäuse ein geringfügig, jedoch nicht signifikant verbessertes Überleben im Vergleich zu den unbehandelten  $p21^{KO}$ / $\lambda$ -MYC-Mäusen (Abbildung 3.9B).

Im Gegensatz zu p21-exprimierenden  $\lambda$ -MYC-Tieren wurden hier nach der Antikörper-Therapie jedoch keine Langzeitüberleber beobachtet. Die Ergebnisse stehen somit in Einklang mit den bisherigen Beobachtungen, dass die Seneszenzinduktion in B-Zellen für den Therapieerfolg durch Kontrollpunkt-Inhibitoren eine wesentliche Rolle spielt.



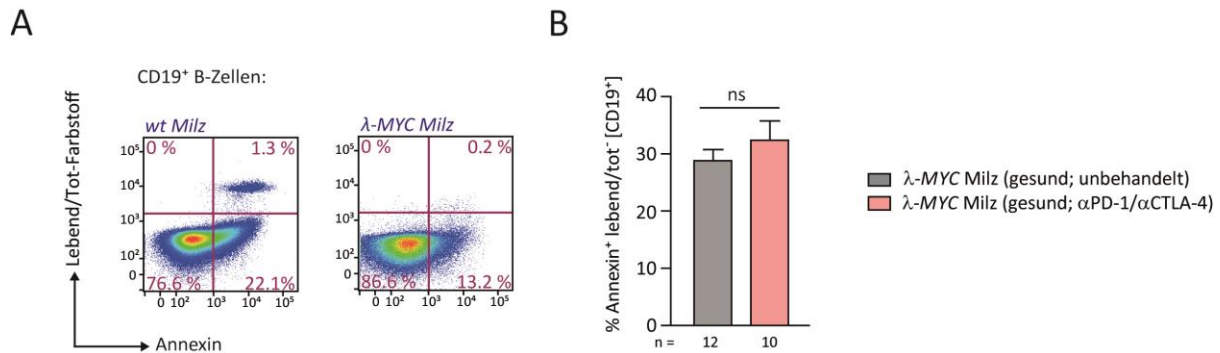
**Abbildung 3.9:** Verminderte Wirksamkeit der *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Blockade in  $p21^{KO}$ / $\lambda$ -MYC-Mäusen. **(A)** Applikationsschema. Klinisch gesunden  $p21^{KO}$ / $\lambda$ -MYC-Mäusen wurden ab dem 55. Lebensstag alle 10 Tage insgesamt viermal je 100  $\mu$ g PD-1- und CTLA-4-Antikörpern i.p. injiziert. **(B)** Überleben abgebildet im Kaplan-Meier-Diagramm. Leichter Überlebensvorteil der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierten  $p21^{KO}$ / $\lambda$ -MYC-Mäuse ( $n=8$ ) verglichen mit unbehandelten Kontrollen ( $n=9$ ). Signifikanzbestimmung mittels Log-Rank-Test.

### 3.2.2 Apoptoseinduktion in B-Zellen nach $\alpha$ PD1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung *in vivo*

Neben der Seneszenz zählt auch die von Kerr, Wylie und Currie (1972) erstmals beschriebene Apoptose, der programmierte Zelltod, zu den primären Verteidigungsmechanismen der Zelle und wurde als weiterer Grund für den Therapieerfolg der Kontrollpunkt-Blockade analysiert. Apoptose wird durch eine Reihe extrinsischer und intrinsischer Signale ausgelöst, um unter anderem entartete Zellen zu entfernen und so die Tumorprogression zu hemmen (Abschnitt 1.3.2).

Die durchflusszytometrische Analyse mittels Annexin V-Färbung ergab, dass trotz der Beteiligung des Transkriptionsfaktors *MYC* an der Apoptose der Anteil apoptotischer B-Zellen in den Milzen kranker  $\lambda$ -MYC-Mäuse im Vergleich zu wt-Mäusen abnahm (Abbildung 3.10A).

Verglichen mit unbehandelten Kontrollen wurde eine leicht gesteigerte Apoptose in B-Lymphozyten von  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade beobachtet (Abbildung 3.10B), die jedoch nicht signifikant war.

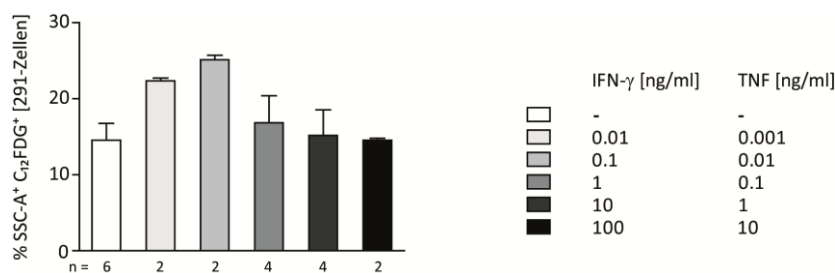


**Abbildung 3.10:** Erhöhter Anteil apoptotischer CD19<sup>+</sup> B-Zellen in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade im Vergleich zu unbehandelten Tieren. **(A)** Durchflusszytometrische Detektion apoptotischer (Annexin<sup>+</sup> lebend/tot<sup>-</sup>), CD19-positiver B-Zellen, dargestellt am Beispiel von Milzzellen aus wt- und kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen. Quantitative Auswertung der Anteile apoptotischer (Annexin<sup>+</sup> lebend/tot<sup>-</sup>) B-Zellen in der Milz. Abgebildet als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Signifikanz wurde unter Verwendung des Student's t-Testes berechnet.

### 3.2.3 *In-vitro*-Seneszenzinduktion in 291-Lymphomzellen mit IFN- $\gamma$ und TNF

Zum einen ist bekannt, dass in Tumorzellen durch IFN- $\gamma$  und TNF Seneszenz induziert wird (Braumüller et al. 2013) und zum anderen wurde in Abschnitt 3.1.3.2 eine erhöhte IFN- $\gamma$ - und TNF-Produktion von T-Zellen in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie beobachtet.

Um zu klären, ob es sich um einen direkten Effekt von IFN- $\gamma$  und TNF auf die Tumorzellen handelt, wurden aus kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen generierte, autologe Lymphomzellen (Zelllinie 291) *in vitro* mit rIFN- $\gamma$  und rTNF behandelt (Abschnitt 2.2.7) und die Seneszenz anschließend mittels C<sub>12</sub>FDG-Methode (Abschnitt 2.2.6.3) detektiert. Bei einer Zugabe von 0.1 ng rIFN- $\gamma$  und 0.01 ng rTNF wurde eine signifikante Zunahme seneszenten 291-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11:** *In-vitro*-Seneszenzinduktion in 291-Lymphom-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit einer variierenden Kombination aus murinem rIFN- $\gamma$  und rTNF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Detektion der Seneszenz mittels C<sub>12</sub>FDG mittels FACS. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Berechnung der Signifikanz unter Verwendung des Student's t-Testes.

### 3.3 ABHÄNGIGKEIT DER $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-INDUZIERTEN TUMORKONTROLLE VON ZYTOKINEN

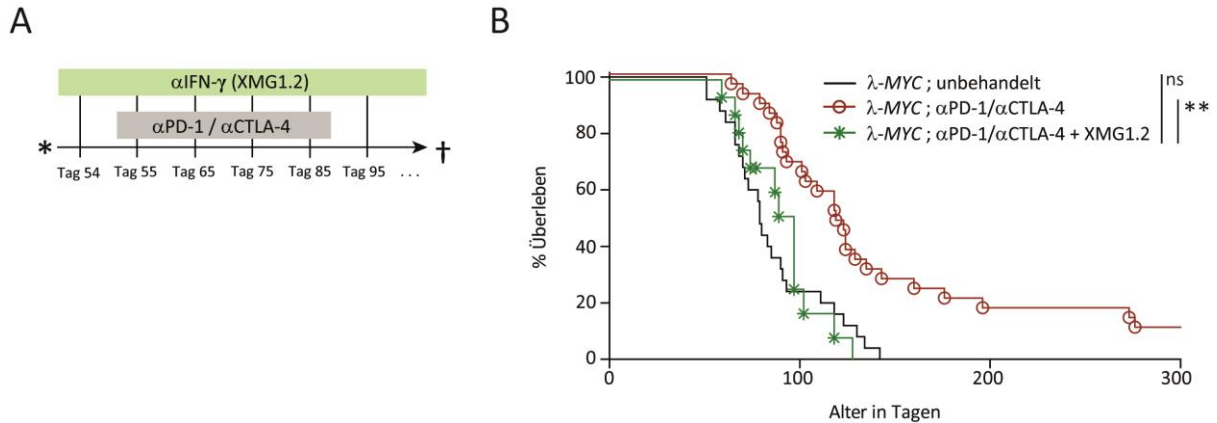
In Abschnitt 3.2 wurde dargelegt, dass trotz *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie der Anteil der Lymphomzellen unverändert blieb und somit eine Zerstörung der Tumorzellen durch reaktivierte T-Zellen ausgeschlossen werden konnte. Daher wurden neben der T-Zell-Reaktivierung andere potenzielle Mechanismen untersucht, die die verzögerte Tumorbildung nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung erklärten. In den Lymphomzellen wurde nach Antikörper-Therapie mithilfe der SSC-A/ $C_{12}$ FDG- oder  $p16^{Ink4a}$ - Expression eine signifikante Induktion der Seneszenz gemessen, welche ein wichtiger Mechanismus zur Hemmung der Tumorbildung ist. *In vitro* konnte die Seneszenz in 291-Lymphomzellen zudem durch Zugabe von rIFN- $\gamma$  und rTNF induziert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass Immun-Kontrollpunkt-Inhibitoren Seneszenz in Lymphomzellen induzieren können und dass IFN- $\gamma$  und TNF dabei eine Rolle spielen.

#### 3.3.1 Effekte der IFN- $\gamma$ -Neutralisierung *in vivo* mittels XMG1.2 auf die Therapie mit $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern

Da T-Zellen vor allem eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion zeigten (Abschnitt 3.1.3.2), wurde zunächst die Rolle von IFN- $\gamma$  für die verbesserte Tumorkontrolle nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie analysiert.

##### 3.3.1.1 Sinkende Tumorkontrolle durch IFN- $\gamma$ -Depletion

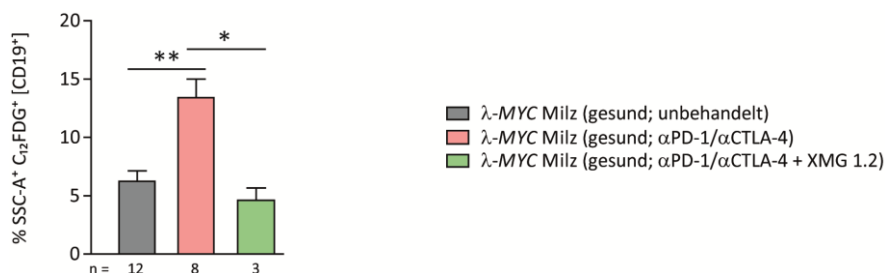
Um die Bedeutung von IFN- $\gamma$  für das verbesserte Überleben der  $\lambda$ -MYC-Mäuse nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie zu untersuchen, wurde klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-Tieren *in vivo* der IFN- $\gamma$ -neutralisierende Antikörper XMG1.2 zusätzlich zur Kontrollpunkt-Blockade gemäß Schema (Abbildung 3.12A) appliziert. Wie erwartet, hatte XMG1.2 negative Auswirkungen auf die Tumorkontrolle der  $\lambda$ -MYC-Mäuse nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade (Abbildung 3.12B). Im Vergleich zu Tieren, die nur mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern behandelt wurden, hatten Tiere nach einer zusätzlichen IFN- $\gamma$ -Depletion ein signifikant verkürztes Überleben und erkrankten im gleichen Alter wie gänzlich unbehandelte Kontrollen. Dies war ein direkter Beweis für die Notwendigkeit von IFN- $\gamma$  für die Lymphomkontrolle durch die *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie in  $\lambda$ -MYC-Tieren.



**Abbildung 3.12:** Notwendigkeit von IFN- $\gamma$  für die verbesserte Tumorkontrolle durch die *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie in  $\lambda$ -MYC-Mäusen. **(A)** Depletionsschema. Klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-Mäusen wurde während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie der IFN- $\gamma$ -neutralisierende Antikörper XMG1.2 i.p. gespritzt. Die Erstinjektion von 500  $\mu$ g XMG1.2 erfolgte 24 h vor der ersten  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe. Anschließend erhielten die Mäuse 5 h vor der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Injektion 300  $\mu$ g XMG1.2. Nach Tag 85 bekamen die Tiere in zehntägigem Abstand 150  $\mu$ g XMG1.2. **(B)** Überleben der Mäuse dargestellt im Kaplan-Meier-Diagramm. Verglichen mit der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-behandelten Gruppe (n=29), zeigten  $\lambda$ -MYC-Mäuse, die zusätzlich mit XMG1.2 behandelt wurden (n=13), ein signifikant reduziertes Überleben, welches ähnlich dem der unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Kontrollgruppe (n=25) war. Die Signifikanz wurde mithilfe des Log-Rank-Testes berechnet.

### 3.3.1.2 Verminderte B-Zell-Seneszenz durch XMG1.2

Eine durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen klinisch gesunder  $\lambda$ -MYC-Mäuse ergab, dass der Anteil seneszenten SSC-A<sup>+</sup>C12FDG<sup>+</sup> B-Zellen, der zuvor durch die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie erhöht worden war, durch XMG1.2 auf den Wert der unbehandelten Tiere sank (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13:** Notwendigkeit von IFN- $\gamma$  für die verbesserte Tumorkontrolle durch die *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie in  $\lambda$ -MYC-Mäusen. FACS-Auswertung der SSC-A<sup>+</sup>C12FDG<sup>+</sup> seneszenten Milz-B-Zellen nach Therapie mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern und XMG1.2 im Vergleich zu Tieren, die nur mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern oder gar nicht behandelt wurden. Ergebnisse abgebildet als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Testes berechnet.

### 3.3.1.3 Abnehmende Apoptose in B-Zellen nach IFN- $\gamma$ -Neutralisierung

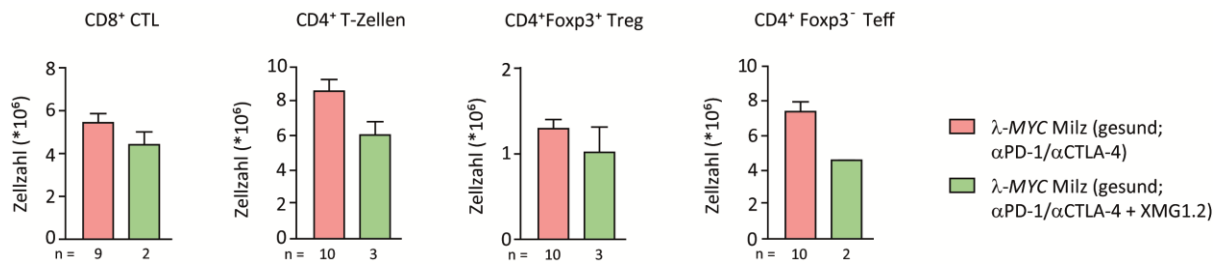
Nachdem im vorherigen Abschnitt die IFN- $\gamma$ -abhängige Seneszenzinduktion in Lymphomzellen durch Kontrollpunkt-Inhibitoren gezeigt wurde, sollte nun der Effekt von XMG1.2 auf die B-Zell-Apoptose analysiert werden. Die geringfügige Apoptoseinduktion in B-Zellen durch die *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, wurde durch eine zusätzliche IFN- $\gamma$ -Depletion wieder rückgängig gemacht (Abbildung 3.14). Damit scheint die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-induzierte Apoptose ebenfalls IFN- $\gamma$ -abhängig zu sein, wenn auch nicht so deutlich wie die Seneszenzinduktion.



**Abbildung 3.14:** Abnehmender prozentualer Anteil apoptotischer (Annexin<sup>+</sup> lebend/tot<sup>-</sup>) B-Lymphozyten in der Milz klinisch gesunder  $\lambda$ -MYC-Tiere nach i.p. Injektion von  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4- und XMG1.2-Antikörpern verglichen mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierten oder unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Tieren. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  SEM. Signifikanzberechnung mithilfe des Student's t-Testes.

### 3.3.1.4 Reduzierte T-Zellzahl nach XMG1.2-Gabe

Durch die *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie von  $\lambda$ -MYC-Tieren wurde eine Reaktivierung der T-Zellen erreicht, deren absolute Zellzahl und IFN- $\gamma$ -Produktion signifikant stieg (Abschnitt 3.1.3). Durch die IFN- $\gamma$ -Neutralisierung während der PD-1/CTLA-4-Blockade in klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-Mäusen nahmen die absoluten Zahlen der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz im Vergleich zu Kontrollen, die nur mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4 therapiert wurden, jedoch wieder ab (Abbildung 3.15). Innerhalb der Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielten die Foxp3<sup>+</sup> Treg mit einer unveränderten Zellzahl keine Rolle für die Reduktion, während die Zahl der Foxp3<sup>-</sup> Teff signifikant zurückging.



**Abbildung 3.15:** Abnahme der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Absolutzellzahlen nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade und IFN- $\gamma$ -Depletion mit XMG1.2 verglichen mit Milz-T-Zellzahlen klinisch gesunder  $\lambda$ -MYC-Tiere, die nur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörper erhalten hatten. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikanz mittels Student's t-Test ermittelt.

### 3.3.2 Verringerte Tumorsuppression und B-Zell-Seneszenz durch TNF-Depletion

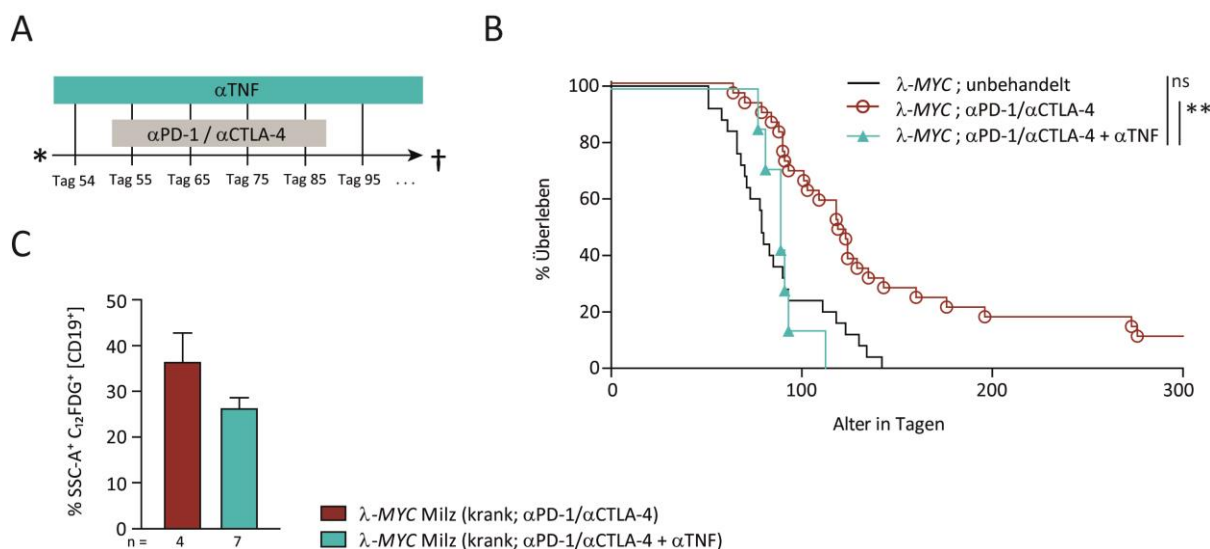
Nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung von  $\lambda$ -MYC-Tieren schütteten T-Effektorzellen neben IFN- $\gamma$  auch mehr TNF aus (Abschnitt 3.1.3.2), und *in vitro* ließ sich mit rIFN- $\gamma$  und rTNF in 291-Lymphomzellen Seneszenz induzieren (Abschnitt 3.2.3). Da das T-Zell-Zytokin TNF neben IFN- $\gamma$  wichtig für eine Antitumor-Antwort ist und die Rolle von IFN- $\gamma$  für die Tumorkontrolle in  $\lambda$ -MYC-Tieren schon in Abschnitt 3.3.1 analysiert wurde, sollte nun die Abhängigkeit des Therapieerfolges von TNF *in vivo* untersucht werden.

Dazu wurden  $\lambda$ -MYC-Tiere neben der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie gemäß Depletionsschema (Abbildung 3.16A) zusätzlich mit einem TNF-depletierenden Antikörper behandelt.

Wie bereits die *In-vivo*-IFN- $\gamma$ -Neutralisierung (Abschnitt 3.3.1), hatte auch die TNF-Depletion eine verminderte Tumorkontrolle zur Folge.  $\lambda$ -MYC-Tiere, die parallel zur Kontrollpunkt-Blockade mit  $\alpha$ TNF-Antikörper behandelt wurden (Abbildung 3.16B), starben signifikant früher als nur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierte Mäuse und erkrankten damit ähnlich früh wie unbehandelte Kontrollen, womit die Notwendigkeit von TNF für die Tumorkontrolle durch  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung in  $\lambda$ -MYC-Tieren bewiesen wurde.

Im Vergleich zu nur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierten kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen wurde in zusätzlich TNF-depletierten Tieren eine Abnahme seneszenten SSC-A<sup>+</sup>C<sub>12</sub>FDG<sup>+</sup> B-Zellen beobachtet (Abbildung 3.16C).





**Abbildung 3.16:** Effekt von TNF auf die Tumorkontrolle in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie *in vivo*. **(A)** Injektionsschema. Klinisch gesunden Tieren wurde während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung ein TNF-depletierender Antikörper i.p. gespritzt. Die Erstinjektion von 500  $\mu$ g  $\alpha$ TNF erfolgte 24 h vor der ersten  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe. Danach erhielten die Mäuse 5 h vor jeder  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Injektion 300  $\mu$ g TNF-Antikörper. Nach Tag 85 wurde in zehntägigen Abständen 150  $\mu$ g  $\alpha$ TNF-Antikörper gespritzt. **(B)** Überleben der Mäuse dargestellt im Kaplan-Meier-Diagramm. Im Vergleich zur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierten Gruppe (n=29) zeigten  $\lambda$ -MYC-Mäuse mit zusätzlicher  $\alpha$ TNF-Behandlung (n=7) ein signifikant reduziertes Überleben, welches sich dem Überleben der unbehandelten Kontrollgruppe (n=25) annäherte. Die Signifikanz wurde mithilfe des Log-Rank-Testes ermittelt. **(C)** Anteil  $\text{SSC-A}^+ \text{C}_{12}\text{FDG}^+$  seneszenten B-Zellen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe und gleichzeitiger TNF-Depletion im Vergleich zur Therapie ohne TNF-Depletion. Abgebildet als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikanz ermittelt mithilfe des Student's t-Testes.

Diese Resultate zeigen, dass in  $\lambda$ -MYC-Mäusen der Therapieerfolg nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung und auch die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-induzierte B-Zell-Seneszenz TNF-abhängig war, da sie wie auch die Tumorkontrolle nach TNF-Neutralisierung wieder zurückging, wenn auch nicht so deutlich wie nach der IFN- $\gamma$ -Depletion *in vivo* (Abschnitt 3.3.1.1).

Für die Bereitstellung von TNF und IFN- $\gamma$  werden neben T-Zellen auch NK-Zellen benötigt. Daher wurde im Folgenden der direkte Einfluss der T-Zell- und NK-Zell-Population auf die Tumorsuppression nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie *in vivo* untersucht.

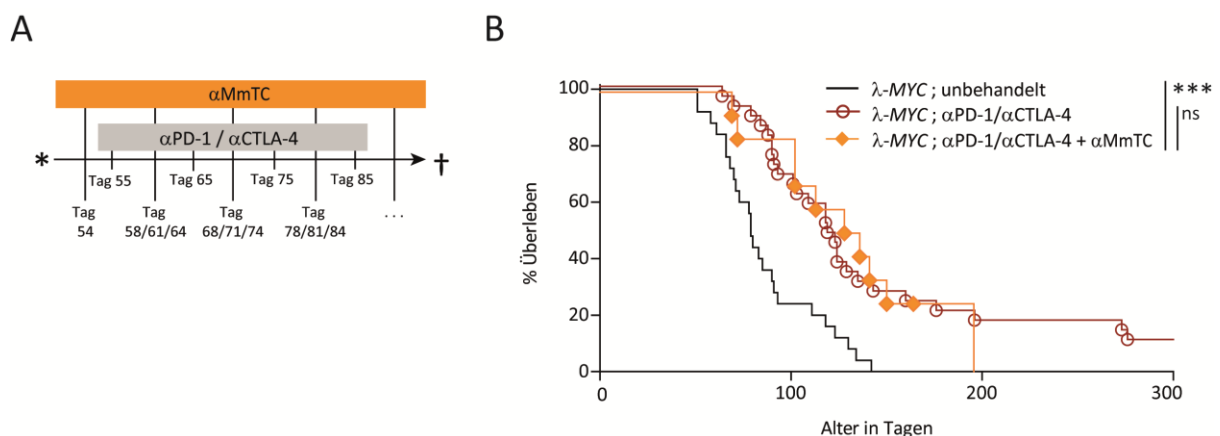
### 3.3.3 Keine Beeinträchtigung der Tumorkontrolle durch T-Zell-Depletion mittels MmTC

Wie in Abschnitt 3.1.3 gezeigt wurde, wiesen intratumorale T-Zellen im  $\lambda$ -MYC-Modell auch im fortgeschrittenen Krankheitsstadium einen aktivierten Phänotyp auf und konnten - im Gegensatz zu NK-Zellen (Brenner et al. 2010) - noch IFN- $\gamma$  produzieren. Um die Funktionalität der T-Effektorzellen

zu untersuchen, hatte Riedel (2013) den Effekt einer T-Zell-Depletion mithilfe des Antikörpers MmTC *in vivo* untersucht und überraschenderweise festgestellt, dass  $\lambda$ -MYC-Tiere ohne T-Zellen kein verringertes Überleben im Vergleich zu unbehandelten Mäusen hatten. T-Zellen waren demnach im  $\lambda$ -MYC-Modell für die Tumorkontrolle nicht essenziell. Doch die T-Zell-Reaktivierung nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade und die daraus resultierende erhöhte Proliferation, Aktivierung und Zytokinproduktion (Abschnitt 3.1.3) sowie die Notwendigkeit von IFN- $\gamma$  und TNF für den Erfolg der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2) deuteten auf eine wichtige Rolle der T-Zellen für die Tumorkontrolle in  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-behandelten  $\lambda$ -MYC-Mäusen.

Um deren Bedeutung zu untersuchen, erhielten die  $\lambda$ -MYC-Tiere daher neben der viermaligen  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe gemäß Injektionsschema (Abbildung 3.17A) zusätzlich bis zu ihrer Erkrankung zweimal wöchentlich den pan-T-Zell-depletierenden Antikörper MmTC (Abschnitt 2.2..2). Obwohl der Unterschied im Überleben zwischen den T-Zell-depletierten Mäusen und Tieren, die nur die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie erhalten hatten, nicht signifikant war (Abbildung 3.17B), fiel auf, dass es nach T-Zell-Depletion keine Langzeitüberleber gab.

Demnach beeinflussten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen trotz ihrer Funktion als IFN- $\gamma$ - und TNF-Produzenten das Überleben der behandelten Tiere nicht, schienen jedoch eine Rolle für das Langzeitüberleben nach Kontrollpunkt-Inhibierung zu spielen.



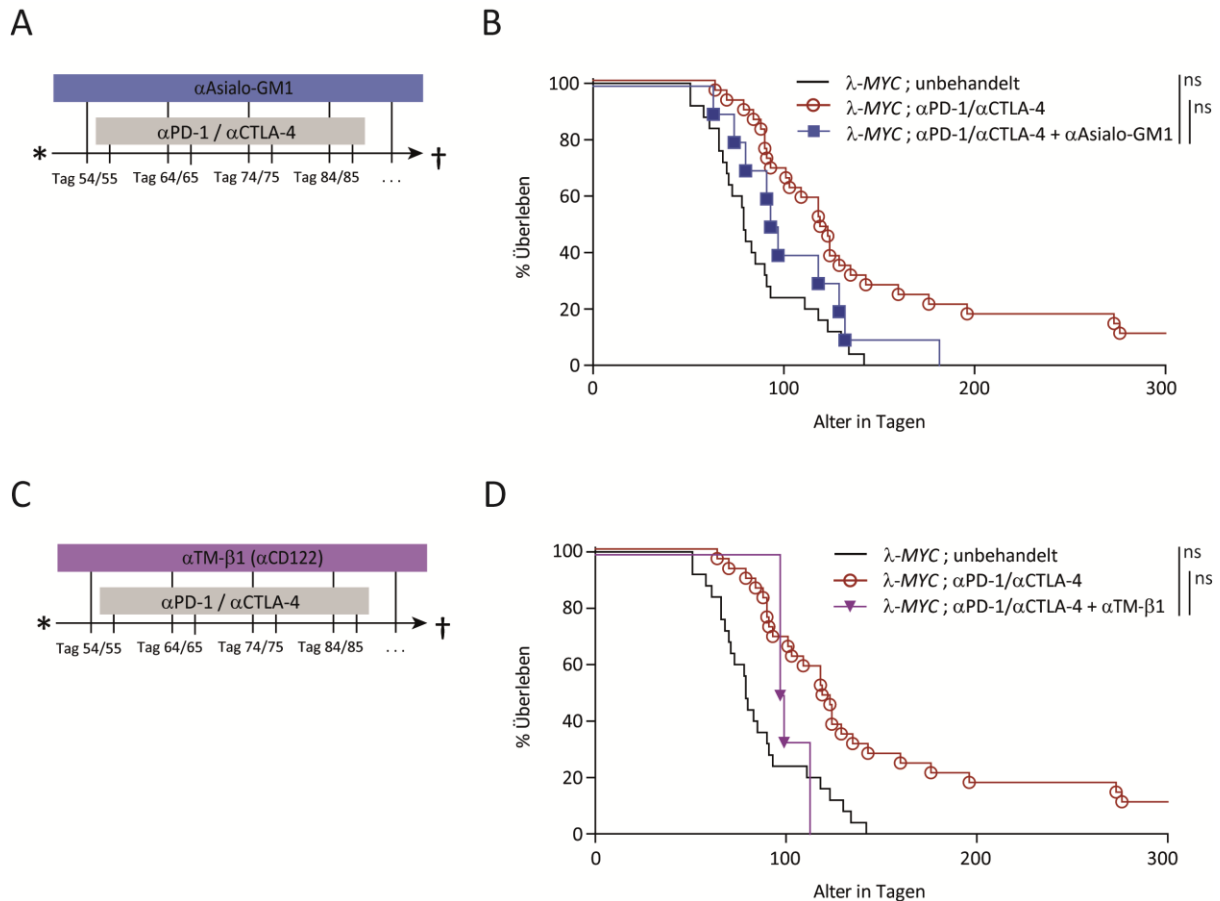
**Abbildung 3.17:** Einfluss einer T-Zell-Depletion mit MmTC auf das Überleben der  $\lambda$ -MYC-Mäuse nach *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie. **(A)** Schematische Darstellung der Antikörper-Injektionen. Klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-Mäusen wurde während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie der T-Zell-depletierende Antikörper MmTC i.p. gespritzt. Die Erstdosis von 1000  $\mu$ g MmTC i.p. erfolgte 24 h vor der ersten Injektion der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörper. Danach erhielten die Mäuse bis zu ihrer Erkrankung zweimal wöchentlich 400  $\mu$ g MmTC. **(B)** Überleben der Mäuse abgebildet im Kaplan-Meier-Diagramm. Im Vergleich zur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierten Gruppe (n=29) zeigten zusätzlich mit MmTC behandelte  $\lambda$ -MYC-Mäuse (n=10), keinen signifikanten Unterschied im Überleben. Die Signifikanz wurde mithilfe des Log-Rank-Testes berechnet.

### 3.3.4 Einfluss der NK-Zellen auf die Tumorkontrolle durch *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade

Da T-Zellen als wichtige IFN- $\gamma$ -Quelle für den Therapieerfolg durch die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung ausgeschlossen wurden (Abschnitt 3.3.3), wurde die Bedeutung der NK-Zellen, von denen bekannt ist, dass sie die wichtigste IFN- $\gamma$ -Quelle sind, untersucht. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass intratumorale NK-Zellen im frühen Krankheitsstadium noch funktional waren und eine effektive Anti-Tumorantwort ausführen konnten. Die Notwendigkeit der NK-Zellen für eine erfolgreiche Tumorbekämpfung wurde in verschiedenen Modellen nachgewiesen (Adam et al. 2005; Brenner et al. 2010; Pötzl et al. 2017).

Um *in vivo* die Rolle der NK-Zellen auf die verbesserte Tumorkontrolle in  $\lambda$ -MYC-Tieren nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie zu analysieren, wurde den Tieren zur NK-Zell-Depletion (Abschnitt 2.2.14.2) zusätzlich der polyklonale Antikörper  $\alpha$ Asialo-GM1 gemäß Behandlungsschema (Abbildung 3.18A) appliziert. Neben NK-Zellen kann  $\alpha$ Asialo-GM1 auch einen Teil der Monozyten depletieren. Um einen Effekt der Monozyten-Depletion auf die Tumorkontrolle auszuschließen, wurde zur exklusiven NK-Zell-Depletion der Antikörper TM- $\beta$ 1, der an CD122 auf der NK-Zell-Oberfläche bindet, analog zur  $\alpha$ Asialo-GM1-Applikation eingesetzt (Abbildung 3.18C).

Verglichen mit der  $\lambda$ -MYC-Gruppe, die nur mit den Kontrollpunkt-Inhibitoren behandelt wurde, reduzierte die zusätzliche NK-Zell-Depletion sowohl durch  $\alpha$ Asialo-GM1- (Abbildung 3.18B) als auch durch TM- $\beta$ 1-Gabe (Abbildung 3.18D) das Überleben, wenn auch nicht signifikant. Im Gegensatz zu der Neutralisierung von IFN- $\gamma$  oder TNF (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2), kam es durch die NK-Zell-Depletion nicht zu einem vollständigen Rückgang der Überlebensrate auf das Niveau der unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Kontrolltiere.



**Abbildung 3.18:** Effekt der NK-Zell-Depletion mit  $\alpha$ Asialo-GM1 oder TM- $\beta$ 1 auf die Tumorkontrolle in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade. **(A) / (C)** Depletionschema. Klinisch unauffälligen  $\lambda$ -MYC-Mäusen wurde 24 h vor der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie  $\alpha$ Asialo-GM1 (50  $\mu$ g) oder TM- $\beta$ 1 (100  $\mu$ g) i.p. appliziert. Ab Tag 85 bekamen die Mäuse in zehntägigen Abständen 50  $\mu$ g  $\alpha$ Asialo-GM1 oder 100  $\mu$ g TM- $\beta$ 1. **(B) / (D)** Überleben der Mäuse gezeigt im Kaplan-Meier-Diagramm. Im Vergleich zur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierten Gruppe (n=29) entwickelten  $\lambda$ -MYC-Mäuse, die zusätzlich mit  $\alpha$ Asialo-GM1 (n=10) oder TM- $\beta$ 1 (n=7) behandelt wurden, früher Lymphome und näherten sich damit der Überlebenskurve der unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Kontrollgruppe (n=25) an. Signifikanzermittlung mithilfe des Log-Rank-Testes.

Die Depletionsversuche in Abschnitt 3.3 belegten die Abhängigkeit der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-vermittelten Tumorsuppression von IFN- $\gamma$ . Dabei scheinen NK-Zellen, deren IFN- $\gamma$ -Produktion durch die Kontrollpunkt-Blockade signifikant zunahm (Fauser, persönliche Mitteilung), für die Bereitstellung von IFN- $\gamma$  auszureichen. Durch die Depletion von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen wurde jedoch das Langzeitüberleben der Mäuse aufgehoben. Dies könnte ein Hinweis sein, dass T-Zellen nicht als IFN- $\gamma$ -Produzenten und für die Seneszenzinduktion, sondern für die komplette Eradikation der Tumorzellen benötigt werden.

### 3.4 DIE ROLLE DER REGULATORISCHEN T-ZELLEN IM $\lambda$ -MYC-MODELL

Es ist bekannt, dass nach *In-vivo*-T-Zell-Stimulation insbesondere die  $CD4^+Foxp3^+$  Treg CTLA-4 hochregulieren (Abbildung 3.1B; Deppisch 2015). Um deren Rolle bei der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-vermittelten Tumorsuppression zu untersuchen, wurden die Treg zunächst hinsichtlich ihrer Funktionen und Eigenschaften im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell analysiert.

#### 3.4.1 Suppressiv Kapazität der $CD4^+Foxp3^+$ Treg im *In-vitro*-Versuch

Zur funktionellen Charakterisierung der  $CD4^+Foxp3^+$  Treg wurde deren suppressives Potenzial in einem *In-vitro*-Suppressions-Test untersucht, da bereits gezeigt wurde, dass mit steigendem Anteil der Treg deren supprimierender Effekt auf die Proliferation der Teff zunimmt (Collison & Vignali 2011; Koch et al. 2012; Okoye et al. 2014; Scurr et al. 2014).

Für das  $\lambda$ -MYC-Lymphom-Modell wurde in einem standardisierten *In-vitro*-Suppressions-Versuch der Einfluss von  $CD4^+Foxp3^+$  Treg auf die Proliferationsfähigkeit der  $CD4^+Foxp3^-$  Teff untersucht. Dazu wurden zunächst  $CD4^+CD25^-$  Teff (Foxp3-Expression < 5 %) mittels EasySep® Magnetseparation (Abschnitt 2.2.11.1) aus wt-Milzen und -LK isoliert, mit *Cell Proliferation Dye* (CPD) (Abschnitt 2.2.9) markiert und diese  $CD4^+CD25^-CPD^+$  Teff als Responder-Zellen verwendet. Gleichzeitig wurden mit derselben Methode  $CD4^+CD25^+$  Treg aus Milz- und LK-Zellen von wt- oder  $\lambda$ -MYC-Tieren gewonnen, welche als Suppressor-Zellen fungierten und mit den Teff in den Verhältnissen 10 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 10 kokultiviert wurden. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurde immer eine Gesamtzahl von  $1 \times 10^5$   $CD4^+$  T-Zellen gegeben. Als Kontrolle dienten  $CD4^+CD25^-$  Responder-Zellen, die ohne Treg-Zugabe (Verhältnis 0 : 1) ebenfalls für 72 h mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern und rIL-2 kultiviert wurden (Abbildung 3.19A).

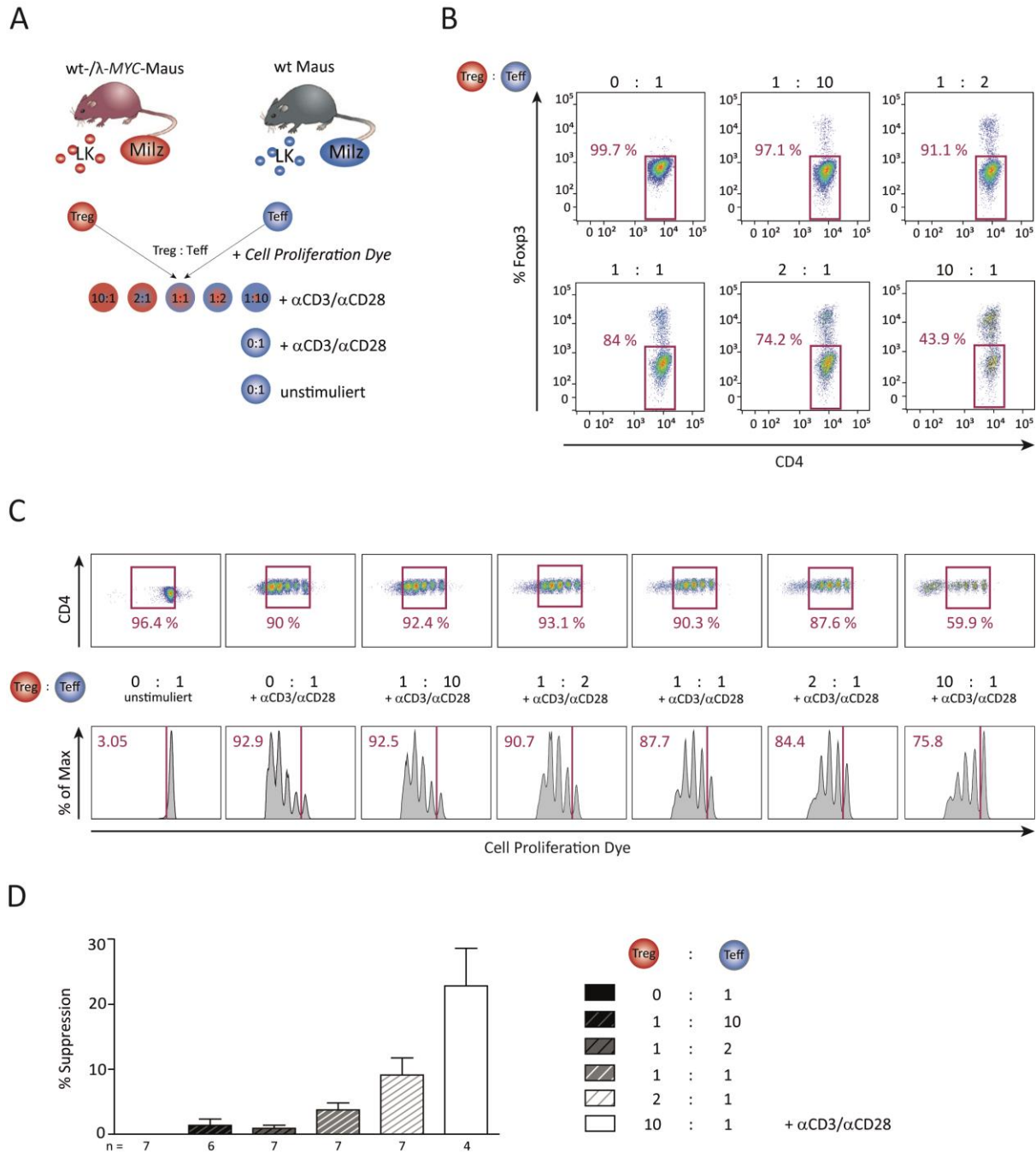
Eine alleinige Färbung des Oberflächenmarkers CD25 lässt eine exakte Bestimmung von Treg nicht zu, da auch aktivierte Teff CD25 exprimieren. Durch die durchflusszytometrische Analyse des Treg-spezifischen Markers Foxp3 nach der dreitägigen Inkubation wurden die an Tag 0 eingesetzten Verhältnisse überprüft (Abbildung 3.19B) und die  $Foxp3^-$  Teff zur Erfassung ihrer Proliferationskapazität eingegrenzt.

Die Proliferation der Teff wurde mittels FACS anhand der Verdünnung des Proliferationsfarbstoffes CPD analysiert, dessen Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung abnahm (Abbildung 3.19C oben). Wie in Abbildung 3.19C (unten) in den Histogrammen zu sehen ist, konnten so bis zu vier Zellteilungen dargestellt werden. Dabei wurde deutlich, dass die Teff-Proliferation abhängig vom Anteil der Treg in der Kultur variierte und ein steigender Treg-Anteil eine reduzierte Teff-Proliferation zur Folge hatte.

Die Ergebnisse aller Versuche sind in Abbildung 3.19D zusammengefasst. Um die einzelnen Versuche besser vergleichen zu können, wurde die Teff-Proliferation normiert. Als Bezugsgröße diente die Teff-Proliferation (100 %) in einer Kultur ohne Treg (Verhältnis 0 : 1). Die Suppression wurde berechnet als Differenz zwischen dem Anteil der normierten, proliferierenden Zellen und 100 %.

Die suppressive Fähigkeit der Treg schien unabhängig von ihrer Herkunft zu sein, da Treg aus wt- oder kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen auf Einzelzell-Ebene eine vergleichbare hemmende Wirkung hatten (nicht abgebildet).

In Abschnitt 1.3.3 wurde gezeigt, dass die absolute Treg-Zahl in kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen nicht so stark abnahm wie die absolute Teff-Zahl (Abbildung 3.5C), was zu einem erhöhten Treg-Anteil im Tumor führte. Auf Einzelzellebene zeigten Treg aus kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen im Vergleich zu wt-Treg keine erhöhte suppressive Kapazität (Daten nicht gezeigt). Wenn aber der Treg-Anteil an den intratumoralen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in  $\lambda$ -MYC-Tieren erhöht ist, dann könnte alleine dadurch eine verstärkte Suppression zustande kommen.



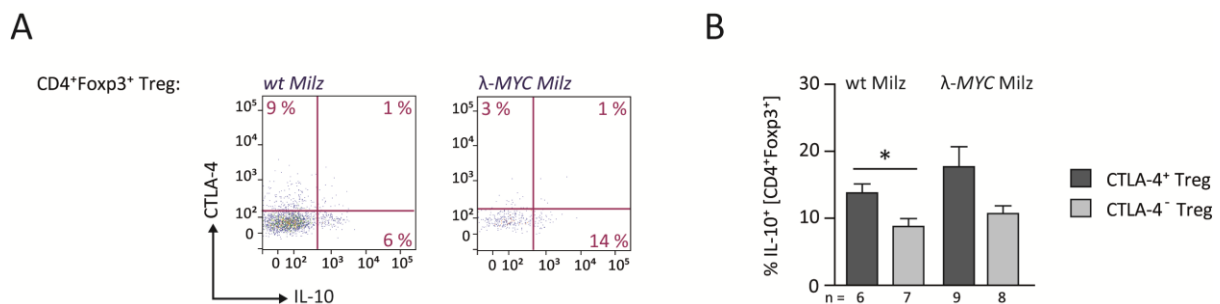
**Abbildung 3.19:** Dosisabhängige Inhibition der Teff-Proliferation durch Treg im *In-vitro*-Suppressions-Versuch. **(A)** Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Isolierung der  $CD4^+CD25^+$  Treg erfolgte aus wt- oder  $\lambda$ -MYC-Mäusen, während  $CD4^+CD25^-$  Teff aus wt-Mäusen gewonnen und mit *Cell Proliferation Dye* (CPD) markiert wurden. Pro Vertiefung wurde eine Gesamtzahl von  $10^5$   $CD4^+$  T-Zellen mit variierenden Treg/Teff-Verhältnissen eingesetzt und die Kultur für 72 h mit  $\alpha CD3/\alpha CD28$ -Antikörpern und IL-2 stimuliert. **(B)** Exemplarische Darstellung der Anteile an  $Foxp3^-$  Teff und  $Foxp3^+$  Treg nach 72 h in der Kokultur mittels FACS, nachdem zuvor die lebenden  $CD4^+$  T-Zellen eingegrenzt worden waren. **(C)** Durchflusszytometrische Erfassung der Teff-Proliferation in der Kokultur mit Treg für die angegebenen Verhältnisse nach mindestens einer durchlaufenen Zellteilung. Graphische Darstellung des CPD-Verlustes in proliferierenden Teff in den jeweiligen Histogrammen mit dem prozentualen Anteil proliferierender Teff oben links. Repräsentative Daten aus bis zu sieben Versuchen. **(D)** Mit zunehmendem Treg-Anteil in der Kultur wurde die Teff-Proliferation stärker inhibiert. Nach Normierung der Teff-Proliferation in der Kultur auf die Teff-Proliferation ohne Treg-Zugabe (100%) wurde die Suppression wie folgt berechnet:  $100\% - \text{normierte Teff-Proliferation}$ . Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet.

### 3.4.2 IL-10 und CTLA-4 im immunsupprimierenden Tumormilieu

Der Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Treg an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist im  $\lambda$ -MYC-Tumor stark erhöht (Abschnitt 3.4.1). Treg können einerseits durch die erhöhte Expression des gegenregulatorischen Moleküls CTLA-4 (Tanaka & Sakaguchi 2017) und andererseits durch die verstärkte Produktion des immuninhibierenden Zytokins IL-10 (Riedel 2013; Ng et al. 2013) eine effektive Immunantwort erschweren.

Die Untersuchung dieser beiden suppressiven Merkmale am Durchflusszytometer ergab, dass CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg aus  $\lambda$ -MYC-Milzen mehr IL-10 produzierten als Treg aus wt-Milzen (Abbildung 3.20A). In der Population der CTLA-4<sup>+</sup> Treg ist ein größerer Anteil IL-10-produzierender Zellen als in der Gruppe der CTLA-4-negativen Treg (Abbildung 3.20B).

Folglich könnten intratumorale Treg mit einer besonders hohen CTLA-4-Expression, welche auf eine verstärkte suppressive Aktivität deutet, die Antitumor-Antwort der T-Effektorzellen durch ihre gesteigerte IL-10-Produktion noch effektiver beeinträchtigen.



**Abbildung 3.20:** Erhöhte IL-10-Produktion der CTLA-4-exprimierenden CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg im Vergleich zu CTLA-4-negativen Treg in Milz- und LK-Zellen von wt- und kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen. **(A)** Repräsentative Darstellung der IL-10/CTLA-4-Koexpression in Treg. *Ex-vivo*-Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin bei 37°C für 4 h und FACS-Analyse nach einer CTLA-4-Oberflächen-Färbung und intrazellulären Färbung von IL-10. **(B)** Anteil IL-10-produzierender Treg, die CTLA-4 exprimieren im Vergleich zu CTLA-4-negativen Treg. Ergebnisse abgebildet als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt.



### 3.4.3 Bedeutung von Helios<sup>+</sup> nTreg und Helios<sup>-</sup> iTreg

In der Treg-Population unterscheidet man grundsätzlich die „natürlichen“ nTreg, die im Thymus während der Selektion gegen Selbst-Antigene entstehen, und die iTreg, die peripher nach Erkennung körperfremder Antigene aus naiven CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff induziert werden. Es wird angenommen, dass nTreg, welche konstitutiv Foxp3 exprimieren, eher über CTLA-4 suppressiv wirken. Dagegen sollen iTreg insbesondere für die IL-10-Ausschüttung verantwortlich sein.

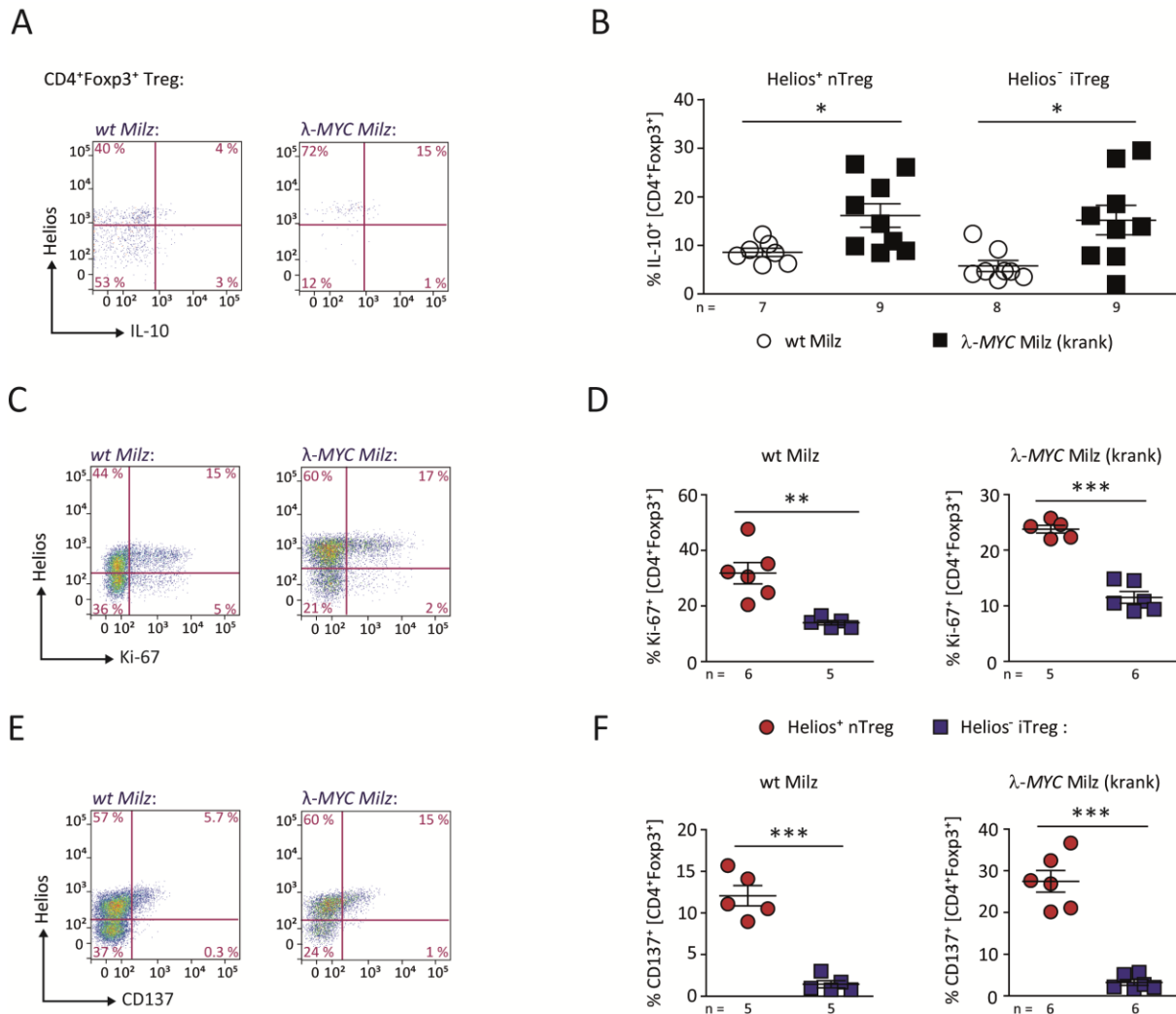
Nachdem die CTLA-4- und IL-10-Expression durch Treg im vorherigen Kapitel analysiert wurde und nicht klar war, um welche Treg-Population es sich handelte, wurden diese nun mithilfe des nTreg-Markers Helios, eines Transkriptionsfaktors aus der Ikaros-Familie, unterschieden. Die meisten intratumoralen Foxp3<sup>+</sup> Treg wurden als Helios<sup>+</sup> nTreg identifiziert (3.21A).

Die durchflusszytometrische Messung der IL-10-Produktion (Abbildung 3.21A) nach *In-vitro*-Stimulation mit PMA und Ionomycin ergab, dass Treg aus erkrankten  $\lambda$ -MYC-Mäusen signifikant mehr IL-10 produzierten als wt-Treg (Abbildung 3.21B). Entgegen der allgemeinen Annahme waren jedoch nicht nur intratumorale Helios<sup>-</sup> iTreg für die IL-10-Produktion verantwortlich, sondern ebenso Helios<sup>+</sup> nTreg, die in gleichem Maße IL-10 produzierten (Abbildung 3.21B).

Hinsichtlich ihrer Ki-67-Expression (Abbildung 3.21C) proliferierten nTreg sowohl in wt- als auch kranken  $\lambda$ -MYC-Tieren fast doppelt so stark wie Helios<sup>-</sup> iTreg (Abbildung 3.21D). Demnach sammeln sich nTreg durch ihre erhöhte Proliferation möglicherweise verstärkt im Tumor an. Geht man von einer suppressiven Funktion der Treg aus, könnten nTreg demnach wichtiger für die Inhibierung der Immunantwort im  $\lambda$ -MYC-Modell sein als iTreg.

Da vermutet wurde, dass nTreg tumorassoziierte Antigene (TAA) über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) erkennen können, wurde die Expression des Oberflächenproteins CD137, welches nach TZR-spezifischer Aktivierung auf T-Zellen exprimiert wird, mittels FACS analysiert (Abbildung 3.21E). Wie in Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben, wurde CD137 im  $\lambda$ -MYC-Modell kaum von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen, sondern vor allem von Treg exprimiert. Der hohe Anteil an CD137<sup>+</sup> Treg in  $\lambda$ -MYC-Lymphomen scheint dabei fast vollständig auf die Subpopulation der nTreg zurückzuführen sein, die fast zehnmal so viel CD137 exprimierten wie iTreg (Abbildung 3.21F).

Die Treg-Untergruppe der Helios<sup>+</sup> nTreg hatte aufgrund ihrer gesteigerten Proliferation und CD137-Expression im Tumor anscheinend tumorassoziierte Antigene (TAA) erkannt. Diese Hypothese wurde im nächsten Abschnitt in einer *In-vitro*-Kokultur überprüft.



**Abbildung 3.21:** Untersuchung von Helios<sup>+</sup> nTreg und Helios<sup>-</sup> iTreg. **(A)** Repräsentative Abbildung der Koexpression von IL-10 und Helios in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg in wt- und kranken λ-MYC-Milzzellen. Die Zellen wurden bei 37°C für 4 h *ex vivo* mit PMA und Ionomycin inkubiert und die Expression von IL-10 und Helios nach einer intrazellulären Färbung mittels FACS bestimmt. **(B)** Anteil IL-10-produzierender nTreg und iTreg in wt- und kranken λ-MYC-Milzen. Exemplarische Darstellungen der Koexpression von Helios mit **(C)** Ki-67 und **(E)** CD137 in Treg aus wt- und λ-MYC-Milzzellen. FACS-Analyse der Helios- und Ki-67-Expression nach einer intrazellulären und der CD137-Expression nach einer Oberflächenfärbung. **(D)** Anteile Ki-67-positiver und **(F)** CD137-exprimierender nTreg im Vergleich zu iTreg in wt- und kranken λ-MYC-Milzen. Ergebnisse abgebildet als Mittelwerte ± SEM. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Testes ermittelt.

### 3.4.4 Untersuchung lymphomassoziierter Antigene in *In-vitro*-Kokulturen

Um der Frage nachzugehen, ob Foxp3<sup>+</sup> Treg spezifisch lymphomassozierte Antigene erkennen, wurde ein Tumor-Spezifitäts-Versuch etabliert.

#### 3.4.4.1 Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach *In-vitro*-Stimulierung

Der in Abbildung 3.22A gezeigte Versuchsaufbau (Abschnitt 2.2.12.2) sieht eine *In-vitro*-Restimulierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus wt-Tieren für 7 Tage mit bestrahlten Tumorzellen unter rIL-2-Zugabe vor. Neben der aus kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen generierten, autologen B-Lymphomzelllinie 291 wurde die B16F0-Melanomzelllinie als Negativkontrolle verwendet. Die T-Zellen in der Kultur wurden mit APZ aus zuvor bestrahlten, nicht proliferierenden wt-Splenozyten stimuliert.

Als Ablesesystem diente die Proliferation (Abbildung 3.22B) der Foxp3<sup>+</sup> Treg und Foxp3<sup>-</sup> Teff. Diese wurde mit Ki-67 und anhand des Verlustes des CPD-Farbstoffes, mit welchem die CD4<sup>+</sup> T-Zellen zuvor markiert worden waren (Abschnitt 2.2.9) und dessen Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung reduziert wurde, mittels FACS analysiert.

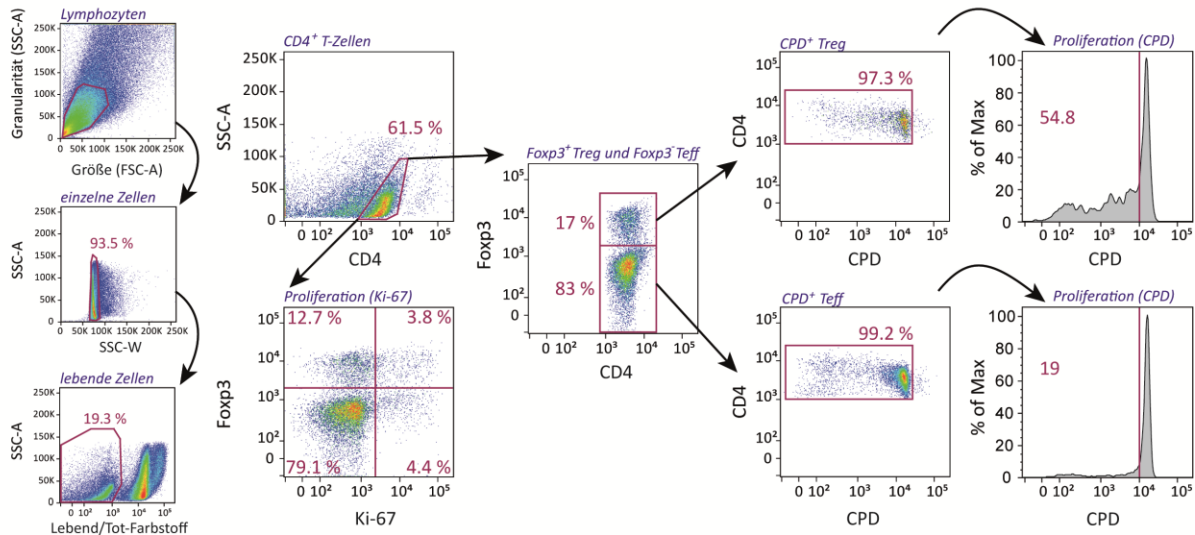
CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg aus wt-Mäusen exprimierten an Tag 0 mehr Ki-67 und proliferierten damit stärker als CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff (Abbildung 3.22C). Nach siebentägiger Inkubation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus wt-Mäusen mit rIL-2, bestrahlten Tumorzellen und APZ in Form bestrahlter Milzzellen wurde deren Proliferation mittels Ki-67-Expression durchflusszytometrisch bestimmt und als Maß für die Erkennung lymphomassoziierter Antigene verwendet. Bei einer spezifischen Erkennung von TAA auf 291-Lymphomzellen sollten CD4<sup>+</sup> T-Zellen folglich in der Kokultur mit 291-Zellen proliferieren, in der Kultur mit der irrelevanten B16F0-Melanomzelllinie hingegen nicht.

Tatsächlich zeigt Abbildung 3.22D, dass Treg in der 291-Kokultur signifikant stärker proliferierten als in der Kultur ohne Tumorzellen oder mit den B16F0-Melanomzellen, was für die Erkennung von TAA spricht. Die geringe Proliferation der Treg in der Kokultur ohne APZ schloss zudem eine Kreuzpräsentation durch 291-Zellen aus. Teff zeigten hingegen in keiner der Kokulturen eine verstärkte Proliferation und erkannten damit keine TAA.

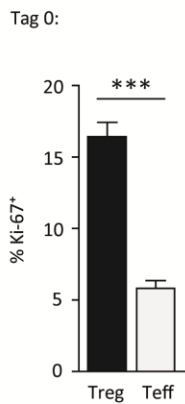
A



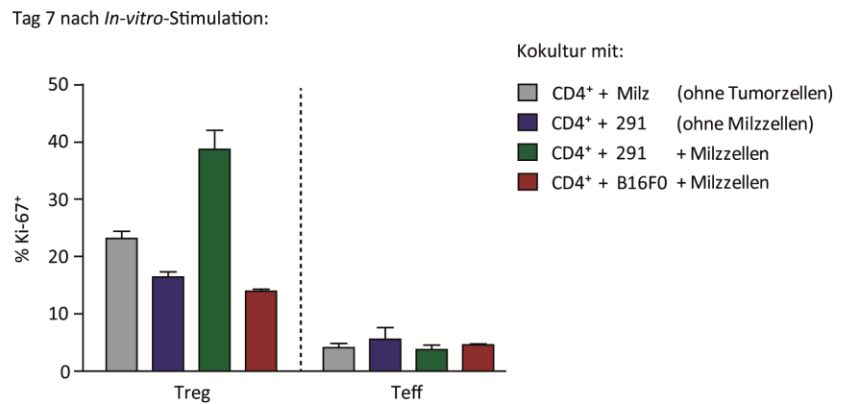
B



C



D

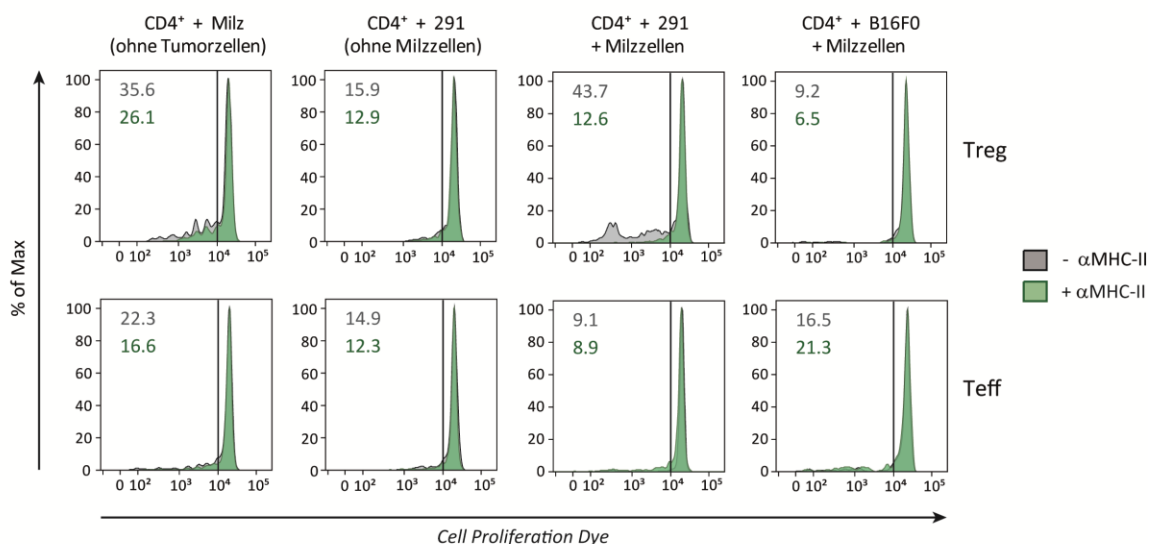


**Abbildung 3.22:** Aufbau des *In-vitro*-Spezifitäts-Versuches und allgemeine Gating-Strategie zur Messung der Proliferation von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff. Bestimmung Ki-67-Expression von T-Zellen nach siebentägiger *In-vitro*-Stimulation in verschiedenen Kokulturen. **(A)** Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus. CD4<sup>+</sup> wt-T-Zellen wurden für 7 Tage bei 37°C mit rIL-2 stimuliert. Wahlweise wurden bestrahlte (100 Gy) 291-Lymphomzellen oder B16F0-Melanomzellen und bestrahlte (30 Gy) wt-Milzzellen eingesetzt. Je nach Fragestellung wurde zusätzlich ein αMHC-II-Antikörper hinzugefügt. **(B)** Exemplarische durchflusszytometrische Erfassung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proliferation mittels Ki-67 oder der CPD-Verdünnung in proliferierenden Treg und Teff in den Histogrammen mit Angabe des prozentualen Anteils proliferierender T-Zellen. **(C)** Anteil Ki-67-positiver Treg und Teff an Tag 0. Dargestellt als Mittelwert ± SEM (n=3). Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test berechnet. **(D)** Ki-67-Expression von Treg und Teff als Duplikate aus einer wt-Maus, die für 7 Tage *in vitro* bei 37 °C mit den angegebenen Zellen kokultiviert wurden. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM. Die Signifikanz wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt.

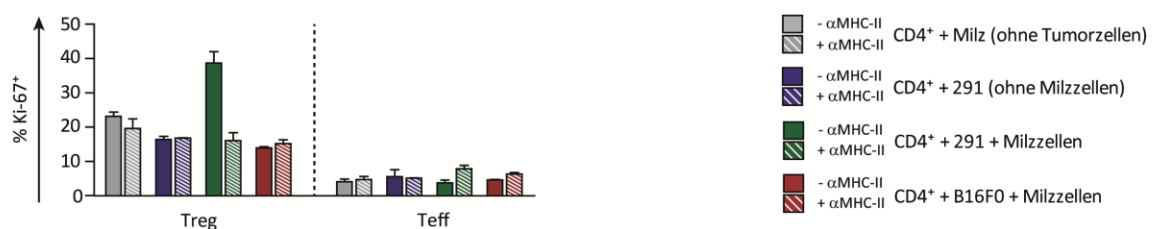
### 3.4.4.2 Effekte einer *In-vitro*-MHC-II-Blockade auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Zur Überprüfung einer spezifischen Peptid-T-Zell-Interaktion wurde den Kokulturen ein MHC-Klasse-II (I-A<sup>b</sup>/I-E)-blockierender Antikörper zugegeben. Als Kontrolle dienten die jeweiligen Kulturen ohne MHC-II-Hemmung. Nach siebentägiger Stimulation wurde die Proliferation der Foxp3<sup>+</sup> Treg und Foxp3<sup>-</sup> Teff anhand des CPD-Verlustes und der damit abnehmenden Mittleren Fluoreszenzintensität des Proliferationsfarbstoffes mittels FACS gemessen. Das repräsentative Beispiel einer wt-Maus in Abbildung 3.23A zeigt, dass im Vergleich zu den Kulturen ohne  $\alpha$ MHC-II-Antikörper, die Proliferation nur in Treg, nicht aber in Teff durch die MHC-II-Inhibierung *in vitro* reduziert wurde. In der Kokultur mit den B16F0-Zellen gab es auch für Treg keine Unterschiede in der Proliferation. Die Ergebnisse wurden durch Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 bestätigt (Abbildung 3.23B).

A



B



**Abbildung 3.23:** Reduzierte *In-vitro*-Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Kokultur nach Zugabe eines  $\alpha$ MHC-II (I-A<sup>b</sup>/I-E)-Antikörpers (Verdünnung 1:2000). CPD-markierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in variierender Zusammensetzung für 7 Tage mit rIL-2 stimuliert. **(A)** CPD-Verlust und Proliferation der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff wurden mittels FACS detektiert. Repräsentative Histogramme für die jeweilige Kokultur mit oder ohne  $\alpha$ MHC-II-Zugabe mit Angabe des prozentualen Anteils proliferierender Zellen. **(B)** Ki-67-Anteil von Treg und Teff als Duplikate aus einer wt-Maus für die angegebene Kokultur mit oder ohne MHC-II-Blockade. Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Signifikanzberechnung mithilfe des Student's t-Testes.

## 4 DISKUSSION

Bei Tumorerkrankungen kommt es durch den Funktionsverlust von T-Effektorzellen zu einer eingeschränkten Immunantwort (Wang et al. 2011; Wherry 2011; Whiteside et al. 2016). Funktionell erschöpfte T-Zellen werden charakterisiert durch eine hohe Expression gegenregulatorischer Rezeptoren, beispielsweise PD-1 und CTLA-4. Diese sogenannten Immun-Kontrollpunkte dienen im physiologischen Kontext der Limitierung überschießender Immunreaktionen, während Tumoren denselben Mechanismus zur Unterdrückung T-Zell-abhängiger Immunantworten nutzen (Lesokhin et al. 2015; Schietinger & Greenberg 2014). Um die Antitumor-Immunität wiederherzustellen und so die Tumorprogression zu hemmen, zielen daher viele immuntherapeutische Strategien auf die Reaktivierung der funktionellen Eigenschaften erschöpfter T-Zellen mithilfe von Kontrollpunkt-Inhibitoren (Apetoh et al. 2015; Crespo et al. 2013; Fourcade et al. 2009; Turnis et al. 2015).

Bereits seit einigen Jahren werden gegen PD-1 und CTLA-4 gerichtete Antikörper erfolgreich in der Tumorbehandlung eingesetzt (Hodi et al. 2010; Schadendorf et al. 2015). Das auffallendste Merkmal dieser neuen Antikörperklasse ist ihre Fähigkeit, langanhaltende Tumorregressionen zu induzieren (Baumeister et al. 2016; Lesokhin et al. 2015). Obwohl wenige Patienten nach der Kontrollpunkt-Blockade von einer kompletten Tumorremission profitieren, sprechen die meisten partiell auf die Therapie an und können mit zurückbleibenden Krebszellen oft jahrelang beschwerdefrei leben (Lipson et al. 2013; Topalian et al. 2014).

Mithilfe des murinen  $\lambda$ -MYC-Tumormodells (Kovalchuk et al. 2000), welches die klinische Situation genauer reflektiert als transplantierbare Lymphommodelle, sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkweise der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung ermittelt werden. Neben einer Therapie-induzierten Reaktivierung der T-Zellen wurden auch Mechanismen für die stabile Wachstumsarretierung der Tumorzellen nach Kontrollpunkt-Blockade gefunden.

### 4.1 DIE SYNERGISTISCHE ANWENDUNG VON IMMUN-KONTROLLPUNKT-INHIBITOREN IM $\lambda$ -MYC-LYMPHOMMODELL

Durchflusszytometrische Analysen hatten gezeigt, dass intratumorale CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf ihrer Oberfläche signifikant mehr CTLA-4 und PD-1 exprimierten als entsprechende wt (Abbildung 3.1), was auf deren funktionelle Erschöpfung hindeutet. Die tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten

boten daher geeignete Zielstrukturen für den therapeutischen Einsatz CTLA-4- und PD-1-antagonisierender Antikörper im  $\lambda$ -MYC-Modell.

Dabei ist die monotherapeutische Applikation von  $\alpha$ PD-1- und  $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern meist nicht so effektiv wie die Blockade mehrerer Immun-Kontrollpunkte (Callahan et al. 2015; Melero et al. 2015). Der synergistische Effekt einer  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Kombinationstherapie wurde durch eine Reihe präklinischer (Dai et al. 2015; Duraiswamy et al. 2013) sowie klinischer Studien (Larkin et al. 2015; Postow et al. 2015; Wolchok et al. 2013) gezeigt und konnte im endogenen  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell bestätigt werden (Riedel 2013). Den positiven Ergebnissen folgte 2015 die Zulassung der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Kombination zur Melanom-Behandlung.

Es überrascht nicht, dass die Kombinationsbehandlung synergistisch wirkt, da CTLA-4 und PD-1 an unterschiedlichen Punkten der T-Zell-Aktivierung angreifen (Curran et al. 2010; Mellman et al. 2011). CTLA-4 reguliert die frühe T-Zell-Aktivierung und -Proliferation im LK (Walunas et al. 1994) sowie die Treg-vermittelte Immunsuppression (Tanaka & Sakaguchi 2017). Somit könnte eine CTLA-4-Inhibierung nicht nur die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen verbessern (Kvistborg et al. 2014), sondern auch die suppressive Funktion der Treg-Zellen hemmen (Qezada et al. 2006). PD-1 beeinflusst hingegen die Effektorfunktion der T-Zellen, da es insbesondere deren Aktivität im peripheren Gewebe und Tumor hemmt (Freeman et al. 2000; Ishida et al. 1992; Keir et al. 2007; Nishimura et al. 1999). Aufgrund der PD-1-Expression auf B- und NK-Zellen, kann eine PD-1-Blockade zudem die Antikörperproduktion der B-Zellen und die NK-Zell-Aktivität verbessern (Velu et al. 2009).

Neben immunologischen Effekten wurden auch unterschiedliche Genexpressionsprofile in Tumorproben von Patienten, die zuvor mit  $\alpha$ PD-1-,  $\alpha$ CTLA-4- oder beiden Antikörpern behandelt worden waren, festgestellt (Chen et al. 2016; Das et al. 2015). Der dominante Signalweg der CTLA-4-Blockade war die Zellproliferation, während PD-1-regulierte Gene in die Steuerung von T- und NK-Zellen sowie zytolytische Funktionen involviert waren. Die kombinatorische Behandlung induzierte wiederum andere Gene als die Monotherapien. Das einzige Gen, das sowohl nach  $\alpha$ PD-1- und  $\alpha$ CTLA-4- als auch nach der Kombinationstherapie hochreguliert wurde (Das et al. 2015), war IFN- $\gamma$ . Diesem wird häufig eine positive Korrelation mit dem klinischen Ansprechen nach Ipilimumab-Behandlung zugesprochen (Hamid et al. 2011; Ji et al. 2012).

Die Vorteile einer PD-1/CTLA-4-Doppelblockade wurden hinreichend belegt. Für die vorliegende Arbeit wurden junge, klinisch gesunde  $\lambda$ -MYC-Tiere daher ausschließlich mit der Kombination aus PD-1- und CTLA-4-blockierenden Antikörpern therapiert. Deren Überleben und immunologische Prozesse wurden mit unbehandelten  $\lambda$ -MYC-Kontrollmäusen verglichen.

## 4.2 T-ZELL-REAKTIVIERUNG NACH *IN-VIVO*-PD-1/CTLA-4-BLOCKADE

Die therapeutische Wirksamkeit der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung wird allgemein einer verbesserten Antitumor-Antwort zugeschrieben, die durch die Reaktivierung erschöpfter T-Zellen hervorgerufen wird (Pardoll et al. 2012; Sharma et al. 2011). Duraiswamy und Kollegen (2013) beobachteten in murinen Modellen des Kolon- und Ovarialkarzinoms eine verstärkte Tumordinfiltration von T-Effektorzellen, die eine hohe PD-1- und CTLA-4-Expression aufwiesen. Nach PD-1/CTLA-4 Blockade *in vivo* kam es nicht nur zu einer Tumorabstoßung in zwei Drittel der Mäuse, sondern zudem zu der funktionellen Reaktivierung tumorinfiltrierender CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Neben einer verstärkten Proliferation war auch deren Zytokinproduktion erhöht. Eine verstärkte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ - und TNF durch intratumorale T-Zellen nach *In-vivo*-Kontrollpunkt-Inhibierung wurde bereits vielfach beobachtet und als möglicher Grund für deren antitumorale Wirkung genannt (Curran et al. 2010; Fourcade et al. 2014; Goding et al. 2013; Gubin et al. 2014).

Auch im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell zeigten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen aus erkrankten  $\lambda$ -MYC-Mäusen einige Erschöpfungsmerkmale, etwa die erhöhte PD-1- und CTLA-4-Expression (Abbildung 3.1) oder eine verminderte Proliferation (Abbildung 3.5). Gleichzeitig hatten sie einen aktivierten Phänotyp (Abbildung 3.3) und produzierten mehr IFN- $\gamma$  und TNF (Abbildung 3.4). Obwohl diese Antigen-spezifisch aktivierten T-Zellen demnach das Potenzial hatten, eine Antitumor-Antwort zu induzieren, konnte die Tumorentwicklung nicht verhindert werden. Die *In-vivo*- $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Kombinationsbehandlung von  $\lambda$ -MYC-Mäusen konnte das Überleben der Tiere jedoch signifikant verbessern und führte in einigen Mäusen sogar zur Heilung des aggressiven, endogen wachsenden  $\lambda$ -MYC-Lymphoms (Abbildung 3.2B). Durch die PD-1/CTLA-4-Blockade konnten auch die T-Zell-Funktionen in den behandelten  $\lambda$ -MYC-Mäusen wiederhergestellt werden. Dabei wurde nicht nur die Spätphase der Tumorerkrankung, sondern auch die Immunantwort in der Initialphase untersucht. Zu diesem Zweck wurden mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern behandelte Tiere vor Ausbruch der Erkrankung geopfert und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Im Vergleich zu untherapierten  $\lambda$ -MYC-Kontrollen wurde in behandelten Tieren nach *In-vitro*- $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Stimulation eine verstärkte Proliferation (Abbildung 3.5B) der intratumoralen T-Zellen beobachtet, die sich in deren Absolutzahl widerspiegelte (Abbildung 3.5C). Die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF nahm nach der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung ebenfalls zu (Abbildung 3.4). T-Effektorzellen aus klinisch gesunden  $\lambda$ -MYC-Mäusen, die zuvor mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern behandelt worden waren, exprimierten zudem verstärkt den frühen Aktivierungsmarker CD69 (Abbildung 3.3B). Hingegen hatte die Antikörpertherapie keinen Effekt auf die Expression des



stimulierenden Rezeptors CD137 (Abbildung 3.3D), der nach TZR-spezifischer Aktivierung hochreguliert wird. In bereits erkrankten Tieren wurde trotz  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe jedoch eine Abnahme der Aktivierung gemessen (Abbildung 3.3). Auch T-Zellen von Patienten mit stark fortgeschrittenem Prostatakarzinom wiesen nach Behandlung mit dem CTLA-4-blockierenden mAK Ipilimumab eine abnehmende CD69-Expression auf, während diejenigen mit geringerer Tumorlast eine CD69-Zunahme zeigten (Fong et al. 2009).

### **4.3 VERBESSERTE TUMORKONTROLLE DURCH $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-INDUZIERTE SENESZENZ IN LYMPHOMZELLEN**

Trotz der wiederhergestellten T-Zell-Funktion nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung entwickelten die meisten  $\lambda$ -MYC-Mäuse, wenn auch stark verzögert, Lymphome (Abbildung 3.2). Die Untersuchung der CD19<sup>+</sup> B-Lymphomzellen in  $\lambda$ -MYC-Mäusen zeigte zudem, dass diese nicht durch reaktivierte T-Effektorzellen eliminiert worden waren (Abbildung 3.6). Da die Behandlung mit Kontrollpunkt-Inhibitoren auch in der Klinik selten zu einer Zerstörung des Tumors, sondern eher zu einer stabilen Erkrankung führt (Lipson et al. 2013; Topalian et al. 2014; Schadendorf et al. 2015; Wolchok et al. 2013), scheinen neben der Tumoreliminierung durch reaktivierte T-Lymphozyten auch andere Mechanismen für die Tumorkontrolle durch Immuntherapien verantwortlich zu sein.

In vielen Tumoren findet man eine erhöhte Fraktion seneszenter Zellen, die sich anhand ihrer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bei pH 6 entweder mikroskopisch oder mit der FACS-basierten C<sub>12</sub>FDG-Methode identifizieren lassen (Debacq-Chainiaux et al. 2009; Dimri et al. 1995; Ernst et al. 2015; Gary & Kindell 2005). Seneszenz beschreibt eine permanente Zellzyklus-Arretierung und kann durch DNA-Schäden (DDR, *DNA Damage Response*) oder aktivierte Onkogene wie *MYC* induziert werden (Serrano et al. 1997; Zhu et al. 1998). Auch in Milzzellen kranker  $\lambda$ -MYC-Tiere waren nach mikroskopischer und durchflusszytometrischer Analyse (Abbildung 3.7) im Vergleich zu wt-Mäusen signifikant mehr seneszente Zellen nachweisbar, was als *MYC*-Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) gewertet wurde. Obwohl *MYC* als wichtiges Apoptose-Gen in Tumorzellen auch Apoptose induzieren kann (Evan et al. 1992; Shi et al. 1992), zeigte die Analyse der Lymphomzellen mittels Annexin V eine Abnahme der apoptotischen Milzzellen kranker  $\lambda$ -MYC-Mäuse im Vergleich zu wt-Tieren (Abbildung 3.10A), während die Seneszenz signifikant zugenommen hatte (Abbildung 3.7).

Seneszenz wird oft als Sicherungskopie der Apoptose betrachtet und könnte in Krebszellen wichtig sein, die während der Tumorgenese eine Apoptoseresistenz entwickeln (Hanahan & Weinberg 2000; Schmitt et al. 2002).

Die Induktion der Seneszenz kann über zwei Signalwege (Abbildung 1.2) erfolgen. Während der Tumorsuppressor p16 zu einer direkten Inhibierung Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK, *Cyclin-dependent Kinase*) führt, wird p21 erst nach Aktivierung durch p53 ein CDK-Inhibitor (van Deursen 2014). Durch Hemmung der CDK wird der hypophosphorylierte Zustand des Tumorsuppressors Rb aufrechterhalten, der folglich den Zellzyklus irreversibel stoppt. (Collado et al. 2007; Kim et al. 2006; Kulman et al. 2010). Daher werden auch p16 und p21 als Seneszenzmarker verwendet (Collado & Serrano 2010). Die biologische Funktion der Seneszenz als Barriere gegen die Tumorgenese wurde erstmals 2005 gezeigt (Braig et al.; Chen et al.; Collado et al.; Michaloglou et al.). Wird dieser Verteidigungsmechanismus gestört, können sich maligne Tumoren entwickeln.

#### **4.3.1 Einsatz pro-seneszenter Therapien zur Verbesserung der Tumorkontrolle**

Man ging lange davon aus, dass entartete Zellen durch die Chemo- oder Radiotherapie-induzierten DNA-Schäden selbst eliminiert werden. Heute ist bekannt, dass durch diese Therapieverfahren auch Tumorsuppressoren wie p53 aktiviert werden (Lowe et al. 1993; Schmitt et al. 1999) und durch die Stimulierung nachfolgender Mechanismen, etwa Apoptose oder Seneszenz (Bunz et al. 1998; Suzuki et al. 2001), die Zerstörung der Zelle ausgelöst wird (Chang et al. 1999; Johnstone et al. 2002). Im murinen  $\mu$ -MYC-Modell, welches dem klinischen Bild der humanen CLL (Chronisch Lymphatische Leukämie) entspricht, wurde die Bedeutung einer Chemotherapie-induzierten Seneszenz (TIS) von Schmitt und Kollegen (2002) untersucht.  $\mu$ -MYC-Mäuse sprachen durch eine p53- und p16-gesteuerte Seneszenzinduktion auf die Behandlung an. Mäuse hingegen, bei denen durch genetische Deletion von p16, p53 oder p21 (Chang et al. 1999; Schmitt et al. 1999) Seneszenzdefekte verursacht wurden, hatten eine schlechtere Prognose nach der Chemotherapie.

Erstmals beobachteten Braumüller und Kollegen (2013) in Tumorzellen eine durch IFN- $\gamma$ - und TNF-sezernierende Th1-Zellen extrinsisch induzierte Seneszenz, der keine Onkogenaktivierung oder DDR vorausgegangen war. Da im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie T-Zellen mehr IFN- $\gamma$  und TNF produzierten (Abbildung 3.4), wurde die Seneszenz in  $\lambda$ -MYC-Tumorzellen näher untersucht. Dabei zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil seneszenten Lymphomzellen (Abbildung 3.8) nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung im Vergleich zu untherapierten Kontrollen.

Eine permanente Wachstumsarretierung der seneszenten Zellen konnte nicht überprüft werden, da die zur Seneszenzermittlung verwendete  $C_{12}$ FDG-Methode keine Gegenfärbung des intrazellulären Proliferationsmarkers Ki-67 erlaubt. Nach durchflusszytometrischer Analyse von Ki-67 wurde beobachtet, dass die Gesamtpopulation lebender  $CD19^+$  Lymphomzellen nach der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen keine reduzierte Proliferation aufwies (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Proliferationsabnahme der Tumorzellen trotz Seneszenzinduktion könnte dadurch begründet werden, dass die Tumorzellen vor der Therapie bereits proliferierten und die Ki-67-Expression in den Zellen auch nach Auslösung der TIS nachweisbar blieb. Die Bedeutung der Seneszenzinduktion für den Behandlungserfolg der Kontrollpunkt-Inhibitoren wurde *in vivo* mithilfe p21-defizienter  $\lambda$ -MYC-Mäuse bestätigt, deren Überleben trotz der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie im Vergleich zu untherapierten Kontrollen geringfügig, jedoch nicht signifikant verlängert wurde (Abbildung 3.9). Die im  $\lambda$ -MYC-Modell beobachtete TIS in Tumorzellen, die nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe ausgelöst wurde, zeigt somit einen neuen Wirkmechanismus der Kontrollpunkt-Inhibitoren und könnte für deren Therapieerfolg eine entscheidende Rolle spielen.

Da Seneszenz in Krebszellen wie eine Barriere gegen die Tumorgenese wirkt, könnten zielgerichtete Therapien, die selektiv Seneszenz in Tumorzellen erhöhen, ein wichtiger Bestandteil der Tumorbehandlung werden (Calcinotto & Alimonti 2017). Eine Vielzahl pro-seneszenter Therapien wird aktuell getestet. Der 2015 zugelassene Wirkstoff Palbociclib (Dhillon 2015) erzielte ein hohes Ansprechen bei  $ER^+Her2^-$  Brustkrebs-Patientinnen. Er gehört zu der Gruppe der CDK4/6-Inhibitoren, welche als p16-Mimetika wirken und derzeit die vielversprechendsten pro-seneszenten Wirkstoffe sind (Dickson et al. 2016; O'Leary et al. 2016; Thangayel et al. 2011). Der MDM-2-Inhibitor Nutlin-3a hingegen kann durch die Hemmung der p53-Degradierung zu einer Seneszenzinduktion in Tumorzellen beitragen (Barone et al. 2014; Purvis et al. 2012) und wurde bereits in hämatologischen und soliden Tumoren untersucht (Peng et al. 2013; Wade et al. 2013). Auch der Kinase-Hemmer Dasatinib (Dos Santos et al. 2013) und der Telomerase-Inhibitor Imetelstat (Tefferi et al. 2015) werden mit einer Seneszenzinduktion assoziiert. Im Modell des murinen Mammakarzinoms konnte durch Hemmung der Tyrosin-Phosphatase SHP-2 Seneszenz in Tumorzellen induziert und die Tumorentwicklung aufgehalten werden (Lan et al. 2015). SHP-2 spielt auch eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung einer hohen  $\lambda$ -MYC-Expression (Aceto et al. 2012). Da ihre Hemmung zudem die Anergie von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und den inhibierenden Effekt von PD-1 auf T-Zellen hemmt (Wang et al. 2011), ist eine pharmakologische SHP-2-Blockade im  $\lambda$ -MYC-Modell in Betracht zu ziehen.

### 4.3.2 Seneszenzinduktion als therapeutische Strategie - ein doppelschneidiges Schwert

Neben einem irreversiblen Zellzyklus-Stopp und den oben genannten Biomarkern werden seneszente Zellen durch einen Seneszenz-assoziierten Sekretorischen Phänotyp (SASP; Coppé et al. 2008) charakterisiert.

Neben der Sekretion immunstimulierender Zytokine wie IL-6 und IL-8 werden auch Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle produziert und so ein inflammatorisches Milieu geschaffen (Acosta et al. 2008; Campisi et al. 2013; Coppé et al. 2010; Kuilman et al. 2008; Munos-Espin & Serrano 2014). Der SASP kann in Nachbarzellen durch parakrine Signale eine „Bystander-Seneszenz“ auslösen (Acosta et al. 2013) und Immunzellen der angeborenen und adaptiven Immunität, etwa Neutrophile, Makrophagen, NK-Zellen und Th1-Zellen rekrutieren und aktivieren. Diese Immuninfiltrate können die Tumorprogression hemmen, indem sie die Entfernung der seneszenten Zellen aus dem Tumor durch Phagozytose oder Zytotoxizität im Sinne einer „Seneszenz-Überwachung“ (Childs et al. 2014) steuern und zusätzlich Seneszenz durch Zytokin-Produktion im Tumor induzieren (Braumüller et al. 2013; Chuprin et al. 2013; Gabilovich et al. 2012; Kang et al. 2011; Krizhanovsky et al. 2008). Gleichzeitig kann der SASP autokrine Signale hervorrufen, um den Seneszenzstatus der Zelle aufrechtzuerhalten (Coppé et al. 2008). Seneszente Zellen regulieren auch Liganden hoch, die nicht auf normalen Zellen exprimiert sind und werden auf diese Weise immunogen. Durch die Induktion des NKG2D-Liganden auf seneszenten Zellen können NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> CTL diese spezifisch erkennen und eliminieren (Calcinotto & Alimonti 2017).

Die Seneszenz wird inzwischen als dynamischer Prozess gesehen (Ivanov et al. 2013), der in eine frühe und eine vertiefende Phase eingeteilt werden kann. Physiologisch werden „akut seneszente Zellen“ (Childs et al. 2014) von Immunzellen entfernt. Unter pathologischen Bedingungen oder durch ein alterndes Immunsystem (Burton 2009; Solana et al. 2012) kann es zu einer ineffizienten Eliminierung „chronisch seneszenten Zellen“ (Childs et al. 2014) kommen, die folglich akkumulieren (Burton & Faragher 2015). Werden seneszente Zellen jedoch nicht durch eine Immunantwort aus dem Tumor entfernt, kann die dauerhafte Sekretion von SASP-Komponenten die Zellproliferation und Angiogenese im Tumor fördern und damit paradoxerweise die Tumorgenese stimulieren (Coppé et al. 2010). Dies sollte beim Einsatz Seneszenz-induzierender Therapien bedacht werden (Sun et al. 2012). Eine Kombination mit Therapeutika, die seneszente Zellen aus dem Tumor entfernen und so eine Tumorprogression durch SASP vermeiden, könnte die Effizienz pro-seneszenten Behandlungen verbessern (Calcinotto & Alimonti 2017).

Da die Antitumor-Wirkung der zellulären Seneszenz insbesondere durch SASP-Faktoren und Tumor-Immunantworten gesteuert wird, könnte die Kombination pro-seneszenter Wirkstoffe mit Immuntherapeutika ein effizienter Ansatz sein (Calcinotto & Alimonti 2017). Dieser konnte präklinisch in einem Melanommodell durch Vilgelm und Kollegen (2016) bereits bestätigt werden. Sie zeigten, dass die Therapie mit dem Seneszenz-induzierenden Kinase-Inhibitor AURKAi die CCL5-Sekretion der Melanomzellen erhöhte, was wiederum eine verstärkte Rekrutierung von tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten zur Folge hatte. Die behandelten Mäuse sprachen daraufhin besser auf eine immuntherapeutische T-Zell-Stimulation mit dem agonistischen  $\alpha$ CD137-Antikörper an, was sich in einer abnehmenden TumorgroÙe äußerte. Ähnliches ist auch für die verbesserte Tumorkontrolle in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie (Abbildung 3.2) denkbar, wobei in diesem Fall die Kontrollpunkt-Inhibitoren selbst als Seneszenzinduktoren (Abbildung 3.8) wirkten und zusätzlich T-Zellen reaktivierten (Abbildungen 3.3 - 3.5).

### **4.3.3 Seneszenz und Apoptose: konkurrierende Verteidigungsmechanismen der Tumorgenese**

Apoptose ist ebenso wie die Seneszenz ein genetisch regulierter Prozess und stellt die wichtigste Form des Zelltodes dar. Sowohl extrinsische Signale wie TNF oder Fas-Ligand als auch intrinsische Stress-Stimuli können Apoptose induzieren (Abbildung 1.3), die anschließend durch anti- und pro-apoptotische Moleküle aus der Bcl-2-Familie gesteuert wird (Adams & Cory 2007; Reed et al. 1988; Tsujimoto & Croce 1986). Die Apoptose führt zu einer schnellen Eliminierung dysfunktionaler Zellen durch Phagozytose, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen (Erwig & Henson 2008; Fuchs & Steller 2011; Reed 2000) und sollte demnach die Tumorentwicklung eher verhindern als Seneszenz.

Inzwischen wird eine Reihe zielgerichteter Therapien in der Klinik eingesetzt, die pro-apoptotische Proteine induzieren, etwa die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib und Idelalisib (Brusa et al. 2005; Chen et al. 2016; Falkenhorst et al. 2016) oder anti-apoptotische Signalwege hemmen, beispielsweise der Bcl-2-Inhibitor Navitoclax (Shi et al. 2011). Auch die Behandlung der  $\lambda$ -MYC-Mäuse mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörper konnte - wenn auch nur geringfügig - Apoptose in Lymphomzellen induzieren (Abbildung 3.10B), wohingegen die Seneszenzinduktion nach der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie signifikant war (Abbildung 3.8). Obwohl Apoptose die wichtigste Form des Zelltodes ist, wird manchmal die Seneszenz vorgezogen, da möglicherweise die Gewebshomöostase durch zu viel Zellverlust gestört wäre (Burton & Krizhanovsky 2014) und seneszente Zellen im

Gegenteil zu apoptotischen Zellen ihre Entfernung mit einem gewebereparierenden Prozess verbinden (Burton & Faragher 2015). Zudem sind seneszente Zellen metabolisch aktiv und können Nachbarzellen durch SASP-Faktoren beeinflussen (Childs et al. 2014).

Seneszenz und Apoptose können auch simultan ablaufen. Manchmal wird Apoptose durch starken Stress, beispielsweise eine hohe Dosierung der Chemotherapeutika Doxorubicin (Song et al. 2005) und Etoposid (Probin et al. 2006) induziert, während Seneszenz durch geringere Dosen ausgelöst wird (Vousden & Lane 2007). Einige Wirkstoffe wie Busulfan induzieren hingegen dosisunabhängig nur Seneszenz. Die Entscheidung für Seneszenz oder Apoptose scheint von der Art des DNA-Schadens, seiner Schwere und dem Zelltyp abhängig zu sein (Childs et al. 2014). Entgegen der früheren Annahme, dass seneszente Zellen Apoptose-resistent sind (Wang 1995), wurde inzwischen gezeigt, dass sie mit Zunahme der Passagen apoptotisch werden (Hampel et al. 2004; Wang et al. 2004). Zudem wurde beobachtet, dass seneszente Zellen die Fas-Expression auf Tumorzellen induzieren können, wodurch diese anfälliger für Fas-induzierte Apoptose waren (Crescenzi et al. 2011).

Derzeit zielen die meisten Tumorthapeutika auf die Reaktivierung apoptotischer Mechanismen in Krebszellen zur Tumoreliminierung. Allerdings erlangt die TIS, welche auf einen stabilen Wachstumsstopp der Tumorzellen ausgerichtet ist, zunehmende Bedeutung. Auch der erfolgreiche Einsatz von Kontrollpunkt-Inhibitoren ist weniger einer Tumordestruktion, sondern eher der Auslösung einer verzögerten, aber langanhaltenden Immunantwort und damit stabilen Erkrankung geschuldet.

#### **4.4 ABHÄNGIGKEIT DER $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-INDUZIERTEN SENESZENZ UND TUMORKONTROLLE VON IFN- $\gamma$ UND TNF**

Eine Verstärkung der IFN- $\gamma$ -Signalweg-Komponenten nach Therapie mit Kontrollpunkt-Inhibitoren wurde von verschiedenen Gruppen beobachtet (Chen et al. 2016; Das et al. 2015; Hugo et al. 2016; Van Allen et al. 2015) und korreliert mit einem positiven Ansprechen in der Klinik (Hamid et al. 2011; Ji et al. 2012). Es wurde ebenso gezeigt, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF für die Induktion einer Antitumor-Antwort wichtig sind (Braumüller et al. 2013; Müller-Hermelink et al. 2008). Daher wurde *in vivo* die Bedeutung von IFN- $\gamma$  und TNF für die Tumorkontrolle im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell nach Behandlung mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern untersucht. Zum einen nahm in  $\lambda$ -MYC-Mäusen, die zusätzlich zur  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie mit dem IFN- $\gamma$ -depletierenden

Antikörper XMG1.2 behandelt wurden, die absolute T-Effektorzellzahl (Abbildung 3.15) ab. Zum anderen hatte sowohl eine Neutralisierung von IFN- $\gamma$  (Abbildung 3.12) als auch die Depletion von TNF (Abbildung 3.16B) *in vivo* während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung das Überleben der  $\lambda$ -MYC-Tiere signifikant verkürzt. Demnach waren IFN- $\gamma$  und auch TNF für die Tumorkontrolle in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade essenziell.

Im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell wurde die verstärkte Produktion von TNF und IFN- $\gamma$  durch intratumorale T-Zellen (Abbildung 3.4) und eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen (Fauser, persönliche Mitteilung) nach *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade beobachtet. Die Bedeutung der T-Zellen für die Tumorsuppression nach Kontrollpunkt-Blockade wurde bereits in Abschnitt 4.2 diskutiert. NK-Zellen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle während der Immunantwort gegen Tumorzellen (Adam et al. 2005; Brenner et al. 2010; Pötzl et al. 2017) und können die Antitumor-Antwort von aktivierten CD8<sup>+</sup> CTL (Lang et al. 2012; Rabinovich et al. 2003) und von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Lu et al. 2007) regulieren. Da IFN- $\gamma$  und TNF Zytokine der T-Zell- und NK-Zell-Antwort sind, wurde die Bedeutung dieser Zellpopulationen auf die Tumorkontrolle nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe *in vivo* untersucht. Überraschenderweise zeigten Tiere nach einer pan-T-Zell-Depletion mit dem MmTC-Antikörper (Abbildung 3.17) keinen signifikanten Unterschied im Überleben verglichen mit  $\lambda$ -MYC-Mäusen, die nur die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörper erhalten hatten. Wurden während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung hingegen NK-Zellen mithilfe des polyklonalen Antikörpers  $\alpha$ Asialo-GM1 (Abbildung 3.18B) oder des mAK TM- $\beta$ 1 (Abbildung 3.18D) depletiert, wurde das Überleben der  $\lambda$ -MYC-Tieren im Vergleich zu Mäusen, die nicht NK-Zell-defizient waren, verkürzt. Die Überlebenskurven der NK-Zell-depletierten Mäuse (Abbildungen 3.18B & D) hatten sich zwar der Kurve von unbehandelten Kontrolltieren angenähert, führten im Gegensatz zu der Neutralisierung von IFN- $\gamma$  oder TNF (Abbildungen 3.12 & 3.16) jedoch nicht zu einem vollständigen Rückgang der Überlebensrate. Dies verwundert nicht, da die Tiere noch T-Effektorzellen besaßen, welche einen Teil der IFN- $\gamma$ - und TNF-Produktion steuerten.

Die Behandlung von B-Zell-Tumoren mit IFN- $\gamma$ - und TNF-produzierenden T-Zellen hatte die Induktion einer zytokinabhängigen Tumorstillstand-Arretierung gezeigt (Braumüller et al. 2013). Im vorherigen Abschnitt wurde bereits erörtert, dass die Seneszenzinduktion in Tumorzellen nach Behandlung der  $\lambda$ -MYC-Tiere mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern (Abbildung 3.8) möglicherweise zu der verzögerten Tumorstillstand-Progression beigetragen hatte. Ein direkter Zusammenhang zwischen Zytokinproduktion und Seneszenzinduktion für das  $\lambda$ -MYC-Modell wurde zunächst *in vitro* nachgewiesen, indem in der aus kranken  $\lambda$ -MYC-Mäusen generierten B-Lymphomzelllinie 291 durch Zusatz von rIFN- $\gamma$  und rTNF Seneszenz induziert wurde (Abbildung 3.11).

Eine zusätzliche Behandlung der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-therapierten  $\lambda$ -MYC-Mäuse mit IFN- $\gamma$ - (Abbildung 3.12) oder TNF- (Abbildung 3.16) depletierenden Antikörpern bestätigte die zytokinabhängige Seneszenzinduktion nach Kontrollpunkt-Inhibierung *in vivo*. Die durchflusszytometrische Analyse mittels  $C_{12}$ FDG-Methode ergab, dass eine IFN- $\gamma$ - oder TNF-Depletion in  $\lambda$ -MYC-Mäusen nicht nur die Tumorkontrolle, sondern auch die Seneszenz (Abbildungen 3.13 & 3.16C) in den Lymphomzellen reduziert hatte. Die zuvor beobachtete, leichte Apoptose-Zunahme in Tumorzellen nach der PD-1/CTLA-4-Blockade wurde durch eine *In-vivo*-IFN- $\gamma$ -Neutralisierung ebenfalls aufgehoben (Abbildung 3.14).

Dies führt zu der Hypothese, dass die zytokinabhängige Seneszenzinduktion und in geringerem Maße auch die Apoptoseinduktion in Tumorzellen für eine langanhaltende Tumorkontrolle nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie benötigt werden. Dabei scheinen NK-Zellen nach Kontrollpunkt-Blockade für die Bereitstellung von IFN- $\gamma$  zu genügen (Abbildung 3.18). Eine T-Zell-Depletion hatte keine Auswirkung auf die Tumorkontrolle nach  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Gabe (Abbildung 3.17), allerdings gab es in der Gruppe der T-Zell-depletierten Tiere keine Langzeitüberleber. Da die Tumorerstörung als Konsequenz der T-Effektorzell-Aktivierung bereits beobachtet wurde (Egeter et al. 2000; Mocikat et al. 2003; Quezada et al. 2010), könnten tumorspezifische T-Zellen weniger für die Tumorkontrolle, sondern eher für die Kompletteradikation des Tumors benötigt werden.

## 4.5 REGULATORISCHE T-ZELLEN IM $\lambda$ -MYC-MODELL

### 4.5.1 Die Bedeutung der Treg für die Immunsuppression im $\lambda$ -MYC-Modell

Neben einer funktionellen Erschöpfung der T-Zellen (Apetoh et al. 2015; Crespo et al. 2013) entwickeln Tumoren weitere Immunevasions-Strategien, um einer Antitumor-Antwort zu entgehen. Oft ist der Anteil der suppressiven Treg-Population im Tumor stark erhöht, wodurch die Inhibierung der Immunantwort verstärkt wird (Zou et al. 2006; Nizar et al. 2009; Valzasina et al. 2006). Auch im  $\lambda$ -MYC-Tumor hatte der Anteil Foxp3<sup>+</sup> Treg an der Gesamtpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant zugenommen (Abschnitt 3.4.1). Um den Beitrag der Treg zur Immunsuppression in  $\lambda$ -MYC-Tieren zu überprüfen, wurden diese mit DEREK-Mäusen gekreuzt (Abschnitt 2.1.5).



In den  $\lambda$ -MYC/DEREG-Mäusen wurden Foxp3<sup>+</sup> Treg durch Diphtherietoxin-Gabe spezifisch *in vivo* depletiert (Lahl & Sparwasser 2011), wodurch die Tumorprogression verzögert und eine suppressive Rolle der Treg im  $\lambda$ -MYC-Tumor belegt werden konnte (Riedel 2013). Deren suppressive Kapazität wurde in einem standardisierten *In-vitro*-Suppressions-Assay (Abbildung 3.19; Flessner 2015) überprüft. Dieser zeigte eine dosisabhängige Inhibierung der Proliferation von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T-Effektorzellen durch CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg und bestätigte damit die Ergebnisse anderer Gruppen (Collison & Vignali et al. 2011; Curiel et al. 2004; Okoye et al. 2014; Scurr et al. 2014). Zudem unterschieden sich Treg aus kranken  $\lambda$ -MYC- und wt-Mäusen auf Einzelzellebene nicht hinsichtlich ihrer suppressiven Kapazität (Daten nicht gezeigt). Da im  $\lambda$ -MYC-Modell eine erhöhte intratumorale Treg-Fraktion gefunden wurde (Abschnitt 3.4.1), könnte eine verstärkte Suppression im  $\lambda$ -MYC-Lymphom alleine darauf zurückzuführen sein.

Ein zunehmendes Verhältnis von Treg zu T-Effektorzellen korreliert in den meisten Tumorarten mit einer schlechteren Prognose (Oleinika et al. 2013). Daher versuchen viele therapeutische Ansätze, das Verhältnis durch Treg-Eliminierung wieder in Richtung der T-Effektorzellen zu verschieben. Mögliche Angriffspunkte sind insbesondere auf Treg hochexprimierte Moleküle wie CD25 (Shimizu et al. 1999), CCR4 (Tanaka & Sakaguchi 2017) sowie CTLA-4 (Scaffidi & Misteli 2006).

Während die regulatorischen Moleküle PD-1 und CTLA-4 in T-Effektorzellen einen Erschöpfungszustand anzeigen, können sie bei Treg als stimulatorische Rezeptoren wirken (O'Garra & Vieira 2004; von Boehmer 2005) und eine effektive Immunantwort zusätzlich erschweren. Im  $\lambda$ -MYC-Modell hatten Treg innerhalb der T-Zell-Population zudem die höchste PD-1- und CTLA-4-Expression (Abbildung 3.1), was auch im einem B16-Melanommodell beobachtet wurde (Curran et al. 2010). Daher wird der neuen Antikörperklasse der Kontrollpunkt-Inhibitoren neben der Reaktivierung von T-Effektorzellen auch eine Hemmung der suppressiven Kapazität von Treg zugeschrieben (Bulliard et al. 2013; Qezada et al. 2006; Selby et al. 2013). Mkrtichyan und Kollegen (2011) untersuchten *in vitro* die suppressive Fähigkeit von Treg aus dem murinen TC-1-Zervixkarzinommodell. Die Treg inhibierten nicht nur die Proliferation von CD8<sup>+</sup> CTL und CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen, sondern auch deren IFN- $\gamma$ -Produktion. Durch Zugabe von  $\alpha$ PD1 zur *In-vitro*-Kultur wurde die suppressive Kapazität der Treg jedoch aufgehoben und die T-Effektorzell-Proliferation gesteigert. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der *In-vivo*-PD-1/CTLA-4-Blockade in  $\lambda$ -MYC-Mäusen, die ebenfalls die Proliferation der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 3.5) steigerte. Jedoch nahmen dabei auch Absolutzellzahl und Proliferation (Abbildung 3.5) der Treg sowie deren Aktivierung (Abbildung 3.3) zu.

Akhmetzyanova und Kollegen (2016), die Mäuse mit transplantierten FBL-3- oder MTEC-Tumoren mit dem agonistischen Antikörper  $\alpha$ CD137 therapiert hatten, beobachteten ebenfalls eine erhöhte Treg-Zahl nach Therapie. Die dennoch stattfindende Antitumor-Antwort wurde auf die Induktion eines zytotoxischen Treg-Effektortyps, der unter anderem Granzym B exprimiert, durch die  $\alpha$ CD137-Gabe zurückgeführt. Dergleichen ist auch für die Therapie der  $\lambda$ -MYC-Mäuse mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern denkbar.

#### 4.5.2 Die Rolle der nTreg und iTreg für die Immunsuppression

Bei den oben beschriebenen zytotoxischen Treg handelte es sich um „natürliche“ nTreg. Diese Treg-Subpopulation, die konstitutiv Foxp3 exprimiert und im Thymus entsteht, ist wichtig für die Toleranz gegen Selbst- und tumorassoziierte Antigene (TAA). Die heterogene Gruppe der iTreg steuert hingegen die Immunantwort gegen Fremd-Antigene und wird peripher aus  $CD4^+Foxp3^-$  T-Zellen induziert (Adeegbe & Nishikawa 2013). Eine Unterscheidung der beiden Untergruppen erfolgt meist durch den nTreg-Marker Helios, einen Transkriptionsfaktor aus der Ikaros-Familie (Thornton et al. 2010).  $CD4^+Foxp3^-$  T-Zellen, die *in vitro* mittels TGF- $\beta$  zu  $CD4^+Foxp3^+$  Treg konvertieren, exprimieren hingegen kein Helios (Shevach & Thornton 2014).

Bei den meisten tumorinfiltrierenden Treg handelt es sich um  $Helios^+$  nTreg (Abbildung 3.21A; Fialova et al. 2013; Hindley et al. 2011; Scurr et al. 2014). Im Vergleich zu  $Helios^-$  iTreg exprimieren nTreg mehr CTLA-4, dessen Genexpression vom Transkriptionsfaktor Foxp3 kontrolliert und mit der suppressiven Aktivität der nTreg assoziiert wird (Sakaguchi 2004; Wing et al. 2008; Yamaguchi et al. 2013). Im Tumormilieu gibt es zudem eine verstärkte Produktion immuninhibierender Zytokine wie IL-10 (Abbildungen 21A & B), welches Antigen-spezifische T-Zell-Antworten hemmen kann (Curiel et al. 2004; O' Garra et al. 2008; Shevach et al. 2009). Es wird beschrieben, dass die IL-10-Sekretion insbesondere durch die heterogene iTreg-Subpopulation gesteuert wird (Adeegbe & Nishikawa 2013; Ng et al. 2013). Dies konnte für das  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell nicht bestätigt werden, da die Produktion von IL-10 gleichermaßen auf nTreg wie auf iTreg zurückzuführen war. Im  $\lambda$ -MYC-Modell wiesen Treg aus tumortragenden Tieren im Vergleich zu wt-Mäusen neben einer erhöhten CTLA-4-Expression auch eine verstärkte IL-10-Produktion auf (Abbildung 3.20A). Zudem wurde gezeigt, dass CTLA-4-positive Treg mehr IL-10 sezernierten als CTLA-4-defiziente Treg (Abbildung 3.20B).

Intratumorale Treg, die - bedingt durch eine hohe Expression gegenregulatorischer Moleküle wie PD-1 und CTLA-4 - einen suppressiven Phänotyp aufweisen, könnten durch die vermehrte Sekretion von IL-10 die Funktion der T-Effektorzellen somit noch stärker hemmen.

Eine Therapie mit PD-1/CTLA-4-blockierenden Antikörpern könnte die Suppression durch Treg demnach aufheben. Allerdings wurde in tumorinfiltrierenden Lymphozyten von Melanompatienten beobachtet, dass eine PD-1-Blockade neben der Induktion tumorspezifischer CTL auch die IL-10R-Expression derselben verstärkt hatte, weshalb eine Doppelblockade von IL-10 und PD-1 als Therapie vorgeschlagen wurde (Sun et al. 2015).

Oft wird den nTreg eine dominante Rolle bei der Tumorprogression zugeschrieben (Hansen 2013; Oleinika et al. 2013). Dies wurde auch in einem murinen Colitis-Modell mithilfe eines Transferversuches verdeutlicht (Huang et al. 2014). Wurden nTreg und iTreg zusammen in Lymphozyten-defiziente Empfängermäuse transferiert, dominierten unabhängig vom applizierten Verhältnis stets nTreg das Treg-Zell-Kompartiment. Auch andere Transferexperimente lassen vermuten, dass die Induktion der iTreg aus Foxp3<sup>-</sup> Teff im Tumor nicht effizient ist (Wang et al. 2012). Einige Autoren gehen davon aus, dass *in situ* proliferierende Helios<sup>+</sup> nTreg die Hauptpopulation im Tumor sind (Shevach & Thornton 2014; Zabransky et al. 2012), was gegen eine Konversion von iTreg im Tumor spricht und auch im  $\lambda$ -MYC-Tumor bestätigt wurde (Riedel 2013). Die Erfassung der Proliferation mittels Ki-67 unterstrich die oben genannten Studien, da nTreg sowohl in wt- als auch kranken  $\lambda$ -MYC-Tieren fast doppelt so stark proliferierten wie Helios<sup>-</sup> iTreg (Abbildungen 3.21C & D).

#### 4.6 ERKENNUNG LYMPHOMASSOZIIERTER ANTIGENE DURCH TREG

Die starke Hochregulation von CD137 auf Treg in  $\lambda$ -MYC-Lymphomzellen (Abbildung 3.3) deutet auf eine TZR-spezifische Aktivierung nach Erkennung von TAA hin. Tumorzellen sind entartete Körperzellen, die tumorassoziierte immunogene Selbst-Antigene exprimieren können (Adeegbe & Nishikawa 2013; Oleinika et al. 2013). Es wird vermutet, dass TAA von Helios<sup>+</sup> nTreg über deren TZR spezifisch erkannt werden (Darrasse-Jèze et al. 2009) und aktivierte nTreg die Antitumor-Antworten hemmen (Nishikawa et al. 2003; Vence et al. 2007). Auch im  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell entfiel der hohe CD137-Anteil fast ausschließlich auf die Helios<sup>+</sup> nTreg-Population, wohingegen Helios<sup>-</sup> iTreg kaum CD137 exprimierten (Abbildung 3.21F).

Die gesteigerte CD137-Expression und Proliferation der nTreg-Subpopulation (Abbildung 3.21D) ließ darauf schließen, dass diese TAA erkannt hatten.

Darrasse-Jèze und Kollegen (2009) hatten in transplantierten Tumormodellen eine Treg-Aktivierung nach Erkennung von TAA beobachtet, die sogar vor der Aktivierung tumorspezifischer T-Effektorzellen stattfand. Für die Präsentation der TAA gegenüber Treg schienen DZ verantwortlich sein. Einige Gruppen gehen zudem davon aus, dass Treg besser als Teff tumorassoziierte Selbst-Antigene erkennen, da ihr TZR-Repertoire selbstreaktiver ist und sie mehr Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 exprimieren (Jordan et al. 2001; Nishikawa & Sakaguchi 2014; Sakaguchi 2004). Chen und Kollegen (2017) konnten die Interaktion zwischen Treg und DZ experimentell belegen. Das LFA-1 auf Treg hatte eine starke Bindung zu DZ, wodurch deren Fähigkeit, mit Antigen-spezifischen T-Effektorzellen zu interagieren, limitiert wurde. Diese Bindung ist reversibel und womöglich ein Kontrollmechanismus der T-Zell-Aktivierung (Yan et al. 2017). Im Hinblick auf das  $\lambda$ -MYC-Modell konnte im *In-vitro*-Tumor-Spezifitäts-Versuch (Abbildung 3.22) tatsächlich gezeigt werden, dass  $\text{Foxp3}^+$  Treg - nicht jedoch  $\text{Foxp3}^-$  Teff - nach Erkennung lymphomassoziiertes Antigens auf autologen 291-Zellen verstärkt proliferierten (Abbildung 3.22D).

Zudem beobachtete die Gruppe um Darrasse-Jèze (2009), dass Treg nach ihrem Transfer in  $\text{MHCII}^{+/+}$ , nicht aber in  $\text{MHCII}$ -defizienten tumortragenden Mäusen, expandierten. Damit belegten sie, dass die alleinige Sekretion von Zytokinen nicht ausreicht, um Treg zum Tumor zu rekrutieren, sondern vielmehr eine Antigen-gesteuerte Proliferation unerlässlich ist. Die Überprüfung einer spezifischen Peptid-T-Zell-Interaktion wurde im *In-vitro*-Tumor-Spezifitäts-Versuch (Abbildung 3.23) durch Zugabe eines MHC-II-blockierenden Antikörpers untersucht. Die dadurch reduzierte Proliferation der 291-lymphomspezifischen Treg (Abbildung 3.23) bestätigte die Notwendigkeit einer Antigen-gelenkten Treg-Proliferation.

Dies könnte zudem ein weiterer Hinweis auf die untergeordnete Rolle der iTreg für die Tumorentstehung sein, da diese erst peripher aus naiven  $\text{Foxp3}^-$  Teff induziert werden. Sie sind zwar wichtig für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz, aber da die Tumorentstehung früh entschieden wird, haben iTreg vermutlich keinen entscheidenden Einfluss in den meisten Tumoren (Darrasse-Jèze & Podsypanina 2013). Da auch Treg Tumorantigen-spezifisch aktiviert werden können, wird für die Optimierung von Immuntherapien eine zusätzliche Treg-Depletion vorgeschlagen (Pastille et al. 2014; Mrktichyan et al. 2011; Nishikawa & Sakaguchi 2014).

## 4.7 AUSBLICK

Gegen CTLA-4 und PD-1 gerichtete Antikörper erzielen nicht nur in präklinischen Modellen vielversprechende Resultate, sondern werden auch in der Klinik erfolgreich in der Tumorthapie eingesetzt und können langanhaltende Antitumor-Immunantworten induzieren (Ansell et al. 2015; Larkin et al. 2015; Schadendorf et al. 2015). Die Wirksamkeit einer kombinatorischen Behandlung mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern im endogenen  $\lambda$ -MYC-Lymphommodell wurde gezeigt und einige zugrundeliegende Mechanismen vorgestellt. Dennoch bleiben viele Fragen hinsichtlich der Wirkweise dieser neuartigen Antikörper und ihrem Einfluss auf die unterschiedlichen Immunzellen im  $\lambda$ -MYC-Modell offen:

- Lässt sich der Überlebensvorteil einer Kontrollpunkt-Blockade durch Kombination mit dem agonistischen  $\alpha$ CD137-Antikörper verstärken?

Die T-Zell-Bremse könnte durch PD-1- und/oder CTLA-4-Blockade gelöst werden. Gleichzeitig könnte eine T-Zell-aktivierende  $\alpha$ CD137-Therapie auf das immunologische „Gaspedal“ drücken.

- Wird die Seneszenz in Lymphomzellen durch die Depletion von T-Zellen oder NK-Zellen reduziert?
- Wie beeinflusst die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie Seneszenz und Wachstum transferierter Tumorzellen?

Dazu könnten zunächst Lymphomzellen aus unbehandelten  $p21^{KO}$  /  $\lambda$ -MYC-Mäusen oder aus  $\lambda$ -MYC-Mäusen in wt-Tiere transferiert werden. Diese sollten im gleichen Maß anwachsen. Durch Behandlung dieser Mäuse mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern könnten Unterschiede in der Tumorkontrolle und Seneszenzinduktion in den Tumorzellen identifiziert werden.

- Kann eine Treg-Depletion in Kombination mit der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Behandlung die Tumorentstehung zusätzlich verzögern und was passiert dabei mit anderen Immunzellen?

Um die Bedeutung der Treg für den therapeutischen Effekt der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörper zu analysieren, könnten Foxp3<sup>+</sup> Zellen während der Therapie in DEREK /  $\lambda$ -MYC -Mäusen spezifisch mit Diphtherietoxin depletiert werden.

- Kann die  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie das suppressive Potenzial der Treg mindern?  
Dazu sollen Treg aus DEREK /  $\lambda$ -MYC-Mäusen, die zuvor mit  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Antikörpern behandelt wurden, im etablierten *In-vitro*-Suppressions-Assay (Abschnitt 3.4.1) auf ihre suppressive Kapazität untersucht werden. Durch Analyse der Teff-Proliferation könnte man erkennen, ob die Therapie einen Effekt auf die suppressiven Fähigkeiten der Treg hat.
- Welchen Einfluss hat die PD-1-Expression auf die suppressive Kapazität der Treg?  
Mittels FACSAria™ III (Abschnitt 2.2.11.2) sollen PD-1-hochexprimierende und PD-1-negative Treg sortiert und deren suppressive Aktivität im *In-vitro*-Assay (Abschnitt 3.4.1) verglichen werden.
- Kann die Neutralisierung des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 während der  $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ CTLA-4-Therapie das Überleben verbessern?
- Welchen Effekt hat IL-10 auf die Seneszenz in Tumorzellen?
- Welche tumorspezifischen Peptide werden Antigen-spezifisch von Treg erkannt?  
Die Peptide könnten, beruhend auf der Arbeit von Dongre und Kollegen (2001), mittels Sequenzanalyse identifiziert werden. Nach *In-vitro*-Induktion von MHC-I/II-Molekülen auf 291-Lymphomzellen mit rIFN- $\gamma$  (Abschnitt 2.2.13) könnten Peptide aus den MHC-Molekülen von 291-Zellen und wt-Milzzellen eluiert und im Massenspektrometer auf Epitope untersucht werden. Für anschließende Analysen werden Peptide von Interesse sein, die exklusiv auf 291-Zellen exprimiert werden. Mit diesen Peptiden könnte unter Anwendung des *In-vitro*-Spezifität-Assays die Tumor-Antigenspezifität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert werden.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBAS, A.K. (2003) The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmunity Reviews* 2(3): 115-118.
- ABBAS, A.K., LOHR, J., KNOEHEL, B., NAGABHUSHANAM, V. (2004) T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 3(7-8): 471-475.
- ACETO, N., SAUSGRUBER, N., BRINKHAUS, H., GAIDATZIS, D., MARTINY-BARON, G., MAZZAROL, G., CONFALONIERI, S., QUARTO, M., HU, G., BALWIERZ, P.J., PACHKOV, M., ELLEDGE, S.J., VAN NIMWEGEN, E., STADLER, M.B., BENTIRES-ALJ, M. (2012) Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop. *Nature Medicine* 18(4): 529-537.
- ACOSTA, J. C., O'LOGHLEN, A., BANITO, A., GUIJARRO, M. V., AUGERT, A., RAGUZ, S., FUMAGALLI, M., DA COSTA, M., BROWN, C., POPOV, N., TAKATSU, Y., MELAMED, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F., BERNARD, D., HERNANDO, E., GIL, J. (2008) Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* 133(6): 1006-1018.
- ACOSTA, J.C., BANITO, A., WUESTEFELD, T., GEORGILIS, A., JANICH, P., MORTON, J.P., ATHINEOS, D., KANG, T.-W., LASITSCHKA, F., ANDRULIS, M., PASCUAL, G., MORRIS, K.J., KHAN, S., JIN, H., DHARMALINGAM, G., SNIJDERS, A.P., CARROLL, T., CAPPER, D., PRITCHARD, C., INMAN, G.J., LONGERICH, T., SANSOM, O.J., BENITAH, S.A., ZENDER, L., GIL, J. (2013) A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology* 15(8): 978-990.
- ADA, G. (1994) Twenty years into the saga of MHC-restriction. *Immunology and Cell Biology* 72(6): 447-454.
- 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.
- ADAMS, J. M., & CORY, S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26(9): 1324-1337.
- ADEEGBE, D.O. & NISHIKAWA, H. (2013) Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Frontiers in Immunology* 4(JUL): 1-14.
- AKHMETZANOVA, I., ZELINSKY, G., LITWITZ-SALOMON, E., MALYSHKINA, A., DIETZE, K.K., STREECK, H., BRANDAU, S., DITTMER, U. (2016) CD137 Agonist Therapy Can Reprogram Regulatory T Cells into Cytotoxic CD4+ T Cells with Antitumor Activity. *Journal of Immunology* 196(1): 484-492.
- ALDRICH, J.F., LOWE, D.B., SHEARER, M.H., WINN, R.E., JUMPER, C.A., KENNEDY, R.C. (2010) Vaccines and immunotherapeutics for the treatment of malignant disease. *Clinical and Developmental Immunology* 2010: 697158.
- ANSELL, S.M., LESOKHIN, A.M., BORRELLO, I., HALWANI, A., SCOTT, E.C., GUTIERREZ, M., SCHUSTER, S.J., MILLENSON, M.M., CATTRY, D., FREEMAN, G.J., RODIG, S.J., CHAPUY, B., LIGON, A.H., ZHU, L., GROSSO, J.F., KIM, S.Y., TIMMERMAN, J.M., SHIPP, M.A., ARMAND, P. (2015) PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 372(4): 311-319.

- APETOH, L., SMYTH, M.J., DRAKE, C.G., ABASTADO, J.P., APTE, R.N., AYYOUB, M., BLAY, J.Y., BONNEVILLE, M., BUTTERFIELD, L.H., CAIGNARD, A., CASTELLI, C., CAVALLO, F., CELIS, E., CHEN, L., COLOMBO, M.P., COMIN-ANDUIX, B., COUKOS, G., DHODAPKAR, M.V., DRANOFF, G., FRAZER, I.H., FRIDMAN, W.H., GABRILOVICH, D.I., GILBOA, E., GNJATIC, S., JÄGER, D., KALINSKI, P., KAUFMAN, H.L., KIESSLING, R., KIRKWOOD, J., KNUTH, A., LIBLAU, R., LOTZE, M.T., LUGLI, E., MARINCOLA, F., MELERO, I., MELIEF, C.J., MEMPEL, T.R., MITTENDORF, E.A., ODUN, K., OVERWIJK, W.W., PALUCKA, A.K., PARMIANI, G., RIBAS, A., ROMERO, P., SCHREIBER, R.D., SCHULER, G., SRIVASTAVA, P.K., TARTOUR, E., VALMORI, D., VAN DER BURG, S.H., VAN DER BRUGGEN, P., VAN DEN EYNDE, B.J., WANG, E., ZOU, W., WHITESIDE, T.L., SPEISER, D.E., PARDOLL, D.M., RESTIFO, N.P., ANDERSON, A.C. (2015) Consensus nomenclature for CD8(+) T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology* 4(4): e998538.
- ARMAND, P., NAGLER, A., WELLER, E.A., DEVINE, S.M., AVIGAN, D.E., CHEN, Y.B., KAMINSKI, M.S., HOLLAND, H.K., WINTER, J.N., MASON, J.R., FAY, J.W., RIZZIERI, D.A., HOSING, C.M., BALL, E.D., UBERTI, J.P., LAZARUS, H.M., MAPARA, M.Y., GREGORY, S.A., TIMMERMAN, J.M., ANDORSKY, D., OR, R., WALLER, E.K., ROTEM-YEHUDAR, R., GORDON, L.I. (2013) Disabling Immune Tolerance by Programmed Death-1 Blockade With Pidilizumab After Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results of an International Phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology* 31(33): 4199-4206.
- AR-RUSHDI, A., NISHIKURA, K., ERIKSON, J., WATT, R., ROVERA, G., CROCE, C.M. (1983) Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Science* 222(4622): 390-393.
- AWASTHI, A., AYELLO, J., VAN DE VEN, C., ELMACKEN, M., SABULSKI, A., BARTH, M.J., CZUCZMAN, M.S., ISLAM, H., KLEIN, C., CAIRO, M.S. (2015) Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibodydependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20(+) rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia (pre-B-ALL): potential targeted therapy in patients with poor risk CD20(+) BL and pre-B-ALL. *British Journal of Haematology* 171(5): 763-775.
- BARONE, G., TWEDDLE, D.A., SHOHET, J.M., CHESLER, L., MORENO, L., PEARSON, A.D.J., VAN MAERKEN, T. (2014) MDM2-p53 interaction in paediatric solid tumours: preclinical rationale, biomarkers and resistance. *Current Drug Targets* 15(1): 114-123.
- BAUMEISTER, S. H., FREEMAN, G. J., DRANOFF, G., & SHARPE, A. H. (2016) Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annual Review of Immunology* 34(1): 539-573.
- BLACKBURN, E.H. & GALL, J.G. (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *Journal of Molecular Biology* 120(1): 33-53.
- BLANK, C., GAJEWSKI, T.F. & MACKENSEN, A. (2005) Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: Implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 54(4): 307-314.
- BODNAR, A.G., OUELLETTE, M., FROLKIS, M., HOLT, S.E., CHIU, C.P., MORIN, G.B., HARLEY, C.B., SHAY, J.W., LICHTSTEINER, S., WRIGHT, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279(5349): 349-352.
- BRAHMER, J., RECKAMP, K.L., BAAS, P., CRINÒ, L., EBERHARDT, W.E.E., PODDUBSKAYA, E., ANTONIA, S., PLUZANSKI, A., VOKES, E.E., HOLGADO, E., WATERHOUSE, D., READY, N., GAINOR, J., ARÉN FRONTERA, O., HAVEL, L., STEINS, M., GARASSINO, M.C., AERTS, J.G., DOMINE, M., PAZ-ARES, L., RECK, M., BAUDELET, C., HARBISON, C.T., LESTINI, B., SPIGEL, D.R. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 373(2): 123-135.



- BRAIG, M., LEE, S., LODDENKEMPER, C., RUDOLPH, C., PETERS, A.H., SCHLEGELBERGER, B., STEIN, H., DORKEN, B., JENUWEIN, T., SCHMITT, C.A. (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436(7051): 660-665.
- BRAUMÜLLER, H., WIEDER, T., BRENNER, E., AßMANN, S., HAHN, M., ALKHALED, M., SCHILBACH, K., ESSMANN, F., KNEILLING, M., GRIESSINGER, C., RANTA, F., ULLRICH, S., MOCIKAT, R., BRAUNGART, K., MEHRA, T., FEHRENBACHER, B., BERDEL, J., NIESSNER, H., MEIER, F., VAN DEN BROEK, M. HÄRING, H.-U., HANDGRETINGER, R., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., FEND, F., PESIC, M., BAUER, J., ZENDER, L., SCHALLER, M., SCHULZE-OSTHOFF, K., RÖCKEN, M. (2013) T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 494(7437): 361-365.
- BRENNER, C. (2010): Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell. Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie
- 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.
- BRUGAROLAS, J., CHANDRASEKARAN, C., GORDON, J.I., BEACH, D., JACKS, T., HANNON, G.J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377(6549): 552-557.
- BRUNET, J.F., DENIZOT, F., LUCIANI, M.F., ROUX-DOSSETO, M., SUZAN, M., MATTEI, M.G., GOLSTEIN, P. (1987) A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328(6127): 267-270.
- BRUSA, G., MANCINI, M., CAMPANINI, F., CALABRÒ, A., ZUFFA, E., BARBIERI, E., SANTUCCI, M.A. (2005) Tyrosine kinase inhibitor STI571 (Imatinib) cooperates with wild-type p53 on K562 cell line to enhance its proapoptotic effects. *Acta Haematologica* 114(3): 150-154.
- BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., WINDMAN, M., RUE, S.M., ETTEBERG, S., KNEE, D.A., WILSON, N.S., DRANOFF, G., BROGDON, J.L. (2013) Activating Fc  $\gamma$  receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *The Journal of Experimental Medicine* 210(9): 1685-1693.
- BUNZ, F., DUTRIAX, A., LENGAUER, C., WALDMAN, T., ZHOU, S., BROWN, J.P., SEDIVY, J.M., KINZLER, K.W., AND VOGELSTEIN, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282(5393): 1497-1501.
- BURKITT, D. (1958) A sarcoma involving the jaws in African children. *British Journal of Surgery* 46(197):218-23.
- BURNET, M. (1957) Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *British Medical Journal* 1 (5023): 841-847.
- BURTON, D.G. (2009) Cellular senescence, ageing and disease. *Age* 31(1): 1-9
- BURTON, D.G.A., & FARAGHER, R.G.A. (2015) Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion. *Age* 37(2): 1-19
- BURTON, D.G.A. & KRIZHANOVSKY, V. (2014) Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(22): 4373-4386.
- BUROCCHI, A, COLOMBO, M.P. & PICONESE, S. (2013) Convergences and divergences of thymus- and peripherally derived regulatory T cells in cancer. *Frontiers in Immunology* 4(AUG):247.
- CALLAHAN, M.K., POSTOW, M.A. & WOLCHOK, J.D. (2015) CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Frontiers in Oncology* 4(Jan): 385.
- CALCINOTTO, A. & ALIMONTI, A. (2017) Aging tumour cells to cure cancer: "pro-senescence" therapy for cancer. *Swiss Medical Weekly* 147: w14367

- CAMPISI, J. (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual Review of Physiology* 75: 685 – 705
- CHANG, B.D., BROUDE, E.V., DOKMANOVIC, M., ZHU, H., RUTH, A., XUAN, Y., KANDEL, E.S., LAUSCH, E., CHRISTOV, K., AND RONINSON, I.B. (1999) A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Research* 59(15):3761-3767.
- CHEN, J., GANGULY, A., MUCSI, A.D., MENG, J., YAN, J., DETAMPEL, P., MUNRO, F., ZHANG, Z., WU, M., HARI, A., STENNER, M.D., ZHENG, W., KUBES, P., XIA, T., AMREIN, M.W., QI, H., SHI, Y. (2017) Strong adhesion by regulatory T cells induces dendritic cell cytoskeletal polarization and contact-dependent lethargy. *The Journal of Experimental Medicine* 214(2): 327-338.
- CHEN, P.L., ROH, W., REUBEN, A., COOPER, Z.A., SPENCER, C.N., PRIETO, P.A., MILLER, J.P., BASSETT, R.L., GOPALAKRISHNAN, V., WANI, K., DE MACEDO, M.P., AUSTIN-BRENEMAN, J.L., JIANG, H., CHANG, Q., REDDY, S.M., CHEN, W.S., TETZLAFF, M.T., BROADDUS, R.J., DAVIES, M.A., GERSHENWALD, J.E., HAYDU, L., LAZAR, A.J., PATEL, S.P., HWU, P., HWU, W.J., DIAB, A., GLITZA, I.C., WOODMAN, S.E., VENCE, L.M., WISTUBA, I.I., AMARIA, R.N., KWONG, L.N., PRIETO, V., DAVIS, R.E., MA, W., OVERWIJK, W.W., SHARPE, A.H., HU, J., FUTREAL, P.A., BLANDO, J., SHARMA, P., ALLISON, J.P., CHIN, L., WARGO, J.A. (2016) Analysis of immune signatures in longitudinal tumor samples yields insight into biomarkers of response and mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade. *Cancer Discovery* 6(8): 827-837.
- CHEN, W., JIN, W., HARDEGEN, N., LEI, K., MARINOS, N., MCGRADY, G., WAHL, S.M. (2003) Conversion of peripheral CD4+ CD25- naive T cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine* 198(12): 1875-1886.
- CHEN, Y., ZHOU, Q., ZHANG, L., WANG, R., JIN, M., QIU, Y., KONG, D. (2016) Idelalisib induces G1 arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Oncology Reports* 36(6): 3643-3650.
- CHEN, Z., TROTMAN, L.C., SHAFFER, D., LIN, H.-K., DOTAN, Z.A., NIKI, M., KOUTCHER, J.A., SCHER, H.I., LUDWIG, T., GERALD, W., CORDON-CARDO, C., PANDOLFI, P.P. (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436(7051): 725-730.
- CHENG, T., RODRIGUES, N., SHEN, H., YANG, Y.-G., DOMBKOWSKI, D., SYKES, M., SCADDEN, D.T. (2000) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287(5459): 1804-1808.
- CHICAS, A., WANG, X., ZHANG, C., MCCURRACH, M., ZHAO, Z., MERT, O., DICKINS, R.A., NARITA, M., ZHANG, M., LOWE, S. W. (2010) Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence. *Cancer Cell* 17(4): 376-387.
- CHILDS, B.G., BAKER, D.J., KIRKLAND, J.L., CAMPISI, J., VAN DEURSEN, J.M. (2014) Senescence and apoptosis : dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports* 15(11): 1139-1154.
- CHUPRIN, A., GAL, H., BIRON-SHENTAL, T., BIRAN, A., AMIEL, A., ROZENBLATT, S., KRIZHANOVSKY, V. (2013) Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes & Development* 27(21): 2356-2366
- COLLADO, M., GIL, J., EFEYAN, A., GUERRA, C., SCHUHMACHER, A.J., BARRADAS, M., BENGURIA, A., ZABALLOS, A., FLORES, J.M., BARBACID, M., BEACH, D., SERRANO, M. (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436(7051): 642.
- COLLADO, M., BLASCO, M. A., & SERRANO, M. (2007) Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130(2): 223-233.
- COLLADO, M., & SERRANO, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer* 10(1): 51-57.

- COLLISON, L.W. & VIGNALI, D.A.A. (2011) In vitro Treg suppression assays. *Methods in Molecular Biology* 8(7): 523-532.
- COPE, A., LE FRIEC, G., CARDONE, J. UND KEMPER, C. (2011) The Th1 life cycle: molecular control of IFN- $\gamma$  to IL-10 switching. *Trends in Immunology* 32(6): 278-286.
- COPPÉ, J.P., PATIL, C.K., RODIER, F., KRTOLICA, A., BEAUSÉJOUR, C.M., PARRINELLO, S., HODGSON, J.G., CHIN, K., DESPREZ, P.Y., CAMPISI, J. (2010) A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* 5(2): e9188.
- COPPÉ, J.-P., PATIL, C.K., RODIER, F., SUN, Y., MUÑOZ, D.P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P.S., DESPREZ, P.-Y., CAMPISI, J. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology* 6(12): 2853-2868.
- COUZIN-FRANKEL, J. (2013) Cancer immunotherapy. *Science* 342(6165): 1432-1433.
- CREE, I.A., CHARLTON, P. (2017) Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BioMed Central Cancer* 17(1): 10.
- CRESCENZI, E., PACIFICO, F., LAVORGNA, A., DE PALMA, R., D'AIUTO, E., PALUMBO, G., FORMISANO, S., LEONARDI, A. (2011) NF- $\kappa$ B-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. *Oncogene* 30(24): 2707-2717.
- 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.
- CURIEL, T.J., COUKOS, G., ZOU, L., ALVAREZ, X., CHENG, P., MOTTRAM, P., EVDEMON-HOGAN, M., CONEJO-GARCIA, J.R., ZHANG, L., BUROW, M., ZHU, Y., WEI, S., KRYCZEK, I., DANIEL, B., GORDON, A., MYERS, L., LACKNER, A., DISIS, M.L., KNUTSON, K.L., CHEN, L., ZOU, W. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 10(9): 942-949.
- 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., YIP, Y.Y., HELLSTROM, I., HELLSTROM, K.E. (2015) Curing mice with large tumors by locally delivering combinations of immunomodulatory antibodies. *Clinical Cancer Research* 21(5): 1127-1138.
- DARRASSE-JÈZE, G., BERGOT, A.S., DURGEAU, A., BILLIARD, F., SALOMON, B.L., COHEN, J.L., BELLIER, B., PODSYPANINA, K., KLATZMANN, D. (2009) Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *Journal of Clinical Investigation* 119(9): 2648-2662.
- DARRASSE-JÈZE, G. & PODSYPANINA, K. (2013) How numbers, nature, and immune status of Foxp3+ regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development. *Frontiers in Immunology* 4(SEP): 292.
- DAS, R., VERMA, R., SZNOL, M., BODDUPALLI, C.S., GETTINGER, S.N., KLUGER, H., CALLAHAN, M., WOLCHOK, J.D., HALABAN, R., DHODAPKAR, M.V., DHODAPKAR, K.M. (2015) Combination Therapy with Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Leads to Distinct Immunologic Changes In Vivo. *Journal of Immunology* 194(3): 950-959.
- DOS SANTOS, C., MCDONALD, T., HO, Y.W., LIU, H., LIN, A., FORMAN, S.J., KUO, Y.H., BHATIA, R. (2013) The Src and c-Kit kinase inhibitor dasatinib enhances p53-mediated targeting of human acute myeloid leukemia stem cells by chemotherapeutic agents. *Blood* 122(11): 1900-1913.

- DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J.D., CAMPISI, J., & TOUSSAINT, O. (2009) Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols* 4(12): 1798-1806.
- DEPPISCH, N.F. (2015): Trifunktionale Antikörper in der Tumortherapie: Bedeutung gegenregulatorischer Mechanismen für die Antitumor-Antwort und ihre therapeutische Beeinflussung. Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- DHILLON, S. (2015) Palbociclib: First global approval. *Drugs* 75(5): 543-551.
- DICKSON, M.A., SCHWARTZ, G.K., KEOHAN, M.L., D'ANGELO, S.P., GOUNDER, M.M., CHI, P., ANTONESCU, C.R., LANDA, J., QIN, L.-X., CRAGO, A.M., SINGER, S., KOFF, A., TAP, W.D. (2016) Progression-Free Survival Among Patients With Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma Treated With CDK4 Inhibitor Palbociclib: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncology* 2(7): 937-940.
- DI MICCO, R., SULLI, G., DOBREVA, M., LIONTOS, M., BOTRUGNO, O. A., GARGIULO, G., DAL ZUFFO, R., MATTI, V., D'ARIO, G., MONTANI, E., MERCURIO, C., HAHN, W.C., GORGOLIS, V., MINUCCI, S., D'ADDA DI FAGAGNA, F. (2011) Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature Cell Biology* 13(3): 292-302.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., PEACOCKET, M., CAMPISI, J. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92(20): 9363-9367.
- DOHERTY, P.C. & ZINKERNAGEL, R.M. (1975) A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* 1(7922): 1406-1409.
- DONGRE, A.R., KOVATS, S., DEROOS, P., MCCORMACK, A.L., NAKAGAWA, T., PAHARKOVA-VATCHKOVA, V., ENG, J., CALDWELL, H., YATES, J.R., RUDENSKY, A.Y. (2001) In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *European Journal of Immunology* 31(5): 1485-1494.
- DOZZO, M., CAROBOLANTE, F., DONISI, P.M., SCATTOLIN, A., MAINO, E., SANCETTA, R., VIERO, P., BASSAN, R. (2016) Burkitt lymphoma in adolescents and young adults: management challenges. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics* 8: 11-29.
- 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.
- DURAIWAMY, J., KALUZA, K.M., FREEMAN, G.J., COUKOS, G. (2013) Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Research* 73(12): 3591-3603.
- 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.
- ERNST, A., ANDERS, H., KAPFFHAMMER, H., ORTH, M., HENNEL, R., SEIDL, K., WINSSINGER, N., BELKA, C., UNKEL, S., LAUBER, K. (2015) HSP90 inhibition as a means of radiosensitizing resistant, aggressive soft tissue sarcomas. *Cancer Letters* 365(2): 211-222.
- ERWIG, L.-P. & HENSON, P.M. (2008) Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation* 15(2): 243-250.

- EVAN, G.I., WYLLIE, A.H., GILBERT, C.S., LITTLEWOOD, T.D., LAND, H., BROOKS, M., WATERS, C.M., PENN, L.Z., HANCOCK, D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69(1): 119-128.
- FALKENHORST, J., GRUNEWALD, S., MÜHLENBERG, T., MARINO-ENRIQUEZ, A., REIS, A.C., CORLESS, C., HEINRICH, M., TRECKMANN, J., PODLESKA, L.E., SCHULER, M., FLETCHER, J.A., BAUER, S. (2016) Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) are commonly dysregulated in GIST and can be pharmacologically targeted to enhance the pro-apoptotic activity of imatinib. *Oncotarget* 7(27): 41390-41403.
- FIALOVÁ, A., PARTLOVÁ, S., SOJKA, L., HROMÁDKOVÁ, H., BRTNICKÝ, T., FUČÍKOVÁ, J., KOCIÁN, P., ROB, L., BARTŮŇKOVÁ, J., ŠPÍŠEK, R. (2013) Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *International Journal of Cancer* 132(5): 1070-1079.
- FIDLER, I.J. (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research* 35(1): 218-224.
- FLESSNER, C. (2015): Seneszenzinduktion durch Immunkontrollpunkt-Blockade in einem murinen Lymphommodell. Masterarbeit, TU München: Fakultät für Chemie.
- FONG, L., KWEK, S.S., O'BRIEN, S., KAVANAGH, B., MCNEEL, D.G., WEINBERG, V., LIN, A.M., ROSENBERG, J., RYAN, C.J., RINI, B.I., SMALL, E.J. (2009) Potentiating endogenous antitumor immunity to prostate cancer through combination immunotherapy with CTLA4 blockade and GM-CSF. *Cancer Research* 69(2): 609-615.
- 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.
- FOURCADE, J., KUDELA, P., SUN, Z., SHEN, H., LAND, S.R., LENZNER, D., GUILLAUME, P., LUESCHER, I.F., SANDER, C., FERRONE, S., KIRKWOOD, J.M., ZAROOR, H.M. (2009) PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients. *Journal of Immunology* 182(9): 5240-5249.
- FOURCADE, J., SUN, Z., PAGLIANO, O., CHAUVIN, J.M., SANDER, C., JANJIC, B., TARHINI, A.A., TAWBI, H.A., KIRKWOOD, J.M., MOSCHOS, S., WANG, H., GUILLAUME, P., LUESCHER, I.F., KRIEG, A., ANDERSON, A.C., KUCHROO, V.K., ZAROOR, H.M. (2014) PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8+ T cells induced by melanoma vaccines. *Cancer Research* 74(4): 1045-1055.
- FRANCISCO, L.M., SAGE, P.T. und SHARPE, A.H. (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews* 236: 219-242.
- FREEMAN, G.J., LONG, A.J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., FITZ, L.J., MALENKOVICH, N., OKAZAKI, T. und BYRNE, M.C. (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027-1034.
- FUCHS, Y., & STELLER, H. (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147(4): 742-758.
- FUMAGALLI, M., ROSSIELLO, F., CLERICI, M., BAROZZI, S., CITTARO, D., KAPLUNOV, J. M., BUCCI, G., DOBREVA, M., MATTI, V., BEAUSEJOUR, C.M., HERBIG, U., LONGHESE, M., DI FAGAGNA, F. (2012) Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology* 14(4): 355-365.
- FYFE, G., FISHER, R.I., ROSENBERG, S.A., SZNOL, M., PARKINSON, D.R. LOUIE, A.C. (1995) Results of Treatment of 255 Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Who Received High-Dose. *Journal of Clinical Oncology* 13(3): 688-696.

- GABRILOVICH, D.I., OSTRAND-R., S. & BRONTE, V. (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology* 12(4): 253-268.
- GARY, R.K., & KINDELL, S.M. (2005) Quantitative assay of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Analytical Biochemistry* 343(2): 329-334.
- GERSHON, R. K., COHEN, P., HENCIN, R. UND LIEBHABER, S. A. (1972) Suppressor T Cells. *The Journal of Immunology* 108(3): 586-590.
- GETTINGER, S.N., HORN, L., GANDHI, L., SPIGEL, D.R., ANTONIA, S.J., RIZVI, N.A., POWDERLY, J.D., HEIST, R.S., CARVAJAL, R.D., JACKMAN, D.M., SEQUIST, L.V., SMITH, D.C., LEMING, P., CARBONE, D.P., PINDER-SCHENCK, M.C., TOPALIAN, S.L., HODI, F.S., SOSMAN, J.A., SZNOL, M., MCDERMOTT, D.F., PARDOLL, D.M., SANKAR, V., AHLERS, C.M., SALVATI, M., WIGGINTON, J.M., HELLMANN, M.D., KOLLIA, G.D., GUPTA, A.K., BRAHMER, J.R. (2015) Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* (18): 2004-2012.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncology*. 2015
- GODING, S.R., WILSON, K.A., XIE, Y., HARRIS, K.M., BAXI, A., AKPINARLI, A., FULTON, A., TAMADA, K., STROME, S.E., ANTONY, P.A. (2013) Restoring immune function of tumor-specific CD4+ T cells during recurrence of melanoma. *Journal of immunology* 190(9): 4899-4909.
- GORGOULIS, V.G., & HALAZONETIS, T. D. (2010) Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. *Current Opinion in Cell Biology* 22(6): 816-827.
- GOTTSCHALK, R. A, CORSE, E. & ALLISON, J.P. (2012) Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of Immunology* 188(3): 976-980.
- GREAVES, P. & GRIBBEN, J.G. (2013) The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood* 121(5): 734-744.
- GREENWALD, R.J., FREEMAN, G.J. & SHARPE, A.H. (2005) The B7 Family Revisited. *Annual Review of Immunology* 23(1): 515-548.
- GRIMALDI, A.M., SIMEONE, E., GIANNARELLI, D., MUTO, P., FALIVENE, S., BORZILLO, V., GIUGLIANO, F.M., SANDOMENICO, F., PETRILLO, A., CURVIETTO, M., ESPOSITO, A., PAONE, M., PALLA, M., PALMIERI, G., CARACÒ, C., CILIBERTO, G., MOZZILLO, N., ASCIERTO, P.A. (2014) Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy. *Oncoimmunology* 3: e28780.
- GUBIN, M.M., ZHANG, X., SCHUSTER, H., CARON, E., WARD, J.P., NOGUCHI, T., IVANOVA, Y., HUNDAL, J., ARTHUR, C.D., KREBBER, W.-J., MULDER, G.E., TOEBES, M., VESELY, M.D., LAM, S.S.K., KORMAN, A.J., ALLISON, J.P., FREEMAN, G.J., SHARPE, A.H., PEARCE, E.L., SCHUMACHER, T.N., AEBERSOLD, R., RAMMENSEE, H.-G., MELIEF, C.J.M., MARDIS, E.R., GILLANDERS, W.E., ARTYOMOV, M.N., SCHREIBER, R.D. (2014) Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515(7528): 577-581.
- HAMID, O., SCHMIDT, H., NISSAN, A., RIDOL, W.L., AAMDAL, S., HANSSON, J., GUIDA, M., HYAMS, D.M., GOMEZ, H., BASTHOLT, L., CHASALOW, S.D., BERMAN, D. (2011) A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *Journal of Translational Medicine* 9:204.
- HAMID, O., ROBERT, C. & DAUD, A. (2013) Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *New England Journal of Medicine* 369(2):134-44.

- HAMPEL, B., MALISAN, F., NIEDEREGGER, H., TESTI, R., JANSEN-DURR, P. (2004) Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Experimental Gerontology* 39(11-12): 1713-1721.
- HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- HANSEN, W. (2013) Neuropilin 1 guides regulatory T cells into VEGF-producing melanoma. *Oncoimmunology* 2(2): e23039.
- HARLEY, C.B., FUTCHER, A.B., & GREIDER, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
- HAYFLICK, L., MOORHEAD, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25: 585-621
- HINDLEY, J.P., FERREIRA, C., JONES, E., LAUDER, S.N., LADELL, K., WYNN, K.K., BETTS, G.J., SINGH, Y., PRICE, D.A., GODKIN, A.J., DYSON, J., GALLIMORE, A. (2011) Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer Research* 71(3): 736-746.
- HECHT, J.L. & ASTER, J.C. (2000) Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 18(21): 3707-3721.
- HODI, F.S. (2007) Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4. *Clinical Cancer Research* 13(18): 5238-5242.
- HODI, F.S., HWU, W.J., KEFFORD, R., WEBER, J.S., DAUD, A., HAMID, O., PATNAIK, A., RIBAS, A., ROBERT, C., GANGADHAR, T.C., JOSHUA, A.M., HERSEY, P., DRONCA, R., JOSEPH, R., HILLE, D., XUE, D., LI, X.N., KANG, S.P., EBBINGHAUS, S., PERRONE, A., WOLCHOK, J.D. (2016) Evaluation of immune-related response criteria and RECIST v1.1 in patients with advanced melanoma treated with Pembrolizumab. *Journal of Clinical Oncology* 34(13): 1510-1517.
- HODI, F.S., O'DAY, S.J., MC DERMOTT, D.F., WEBER, R.W., SOSMAN, J.A., HAANEN, J.B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J.C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A.J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J.M., LINETTE, G.P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C.H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J.I., WOLCHOK, J.D., WEBER, J.S., TIAN, J., YELLIN, M.J., NICHOL, G.M., HOOS, A. und URBA, W.J. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 363(8): 711-723.
- HODGKIN, T. (1832) On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-chirurgical Transactions* 17: 68-114.
- HOELZER, D., WALEWSKI, J., DÖHNER, H., VIARDOT, A., HIDDEMANN, W., SPIEKERMANN, K., SERVE, H., DÜHRSEN, U., HÜTTMANN, A., THIEL, E., DENGLER, J., KNEBA, M., SCHAICH, M., SCHMIDT-WOLF, I.G., BECK, J., HERTENSTEIN, B., REICHLER, A., DOMANSKA-CZYK, K., FIETKAU, R., HORST, H.A., RIEDER, H., SCHWARTZ, S., BURMEISTER, T., GÖKBUGET, N. (2014) Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood* 124(26): 3870-9.
- HOENICKE, L., & ZENDER, L. (2012) Immune surveillance of senescent cells-biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis* 33(6): 1123-1126.
- HOOS, A., WOLCHOK, J.D., HUMPHREY, R.W., HODI, F.S. (2015) CCR 20th anniversary commentary: Immune-related response criteria - Capturing clinical activity in immuno-oncology. *Clinical Cancer Research* 21(22): 4989-4991.

- HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609): 1057-61.
- HORVITZ, H.R. & SULSTON, J.E. (1990) "Joy of the worm." *Genetics* 126(2): 287-292.
- HUANG, Y.J., HAIST, V., BAUMGÄRTNER, W., FÖHSE, L., PRINZ, I., SUERBAUM, S., FLOESS, S., HUEHN, J. (2014) Induced and thymus-derived Foxp3+ regulatory T cells share a common niche. *European Journal of Immunology* 44(2): 460-468.
- HUGO, W., ZARETSKY, J.M., SUN, L., SONG, C., MORENO, B.H., HU-LIESKOVAN, S., BERENT-MAOZ, B., PANG, J., CHMIELOWSKI, B., CHERRY, G., SEJA, E., LOMELI, S., KONG, X., KELLEY, M.C., SOSMAN, J.A., JOHNSON, D.B., RIBAS, A., LO, R.S. (2016) Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* 165(1): 35-44.
- INSTITUT FÜR QUALITÄT UND WIRTSCHAFTLICHKEIT IM GESUNDHEITSWESEN (IQWiG) (2015b) Nivolumab - Nutzenbewertung gemäß §35a SGBV.
- ISHIDA, Y., AGATA, Y., SHIBAHARA, K., HONJO, T. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal* 11(11): 3887-3895.
- IVANOV, A., PAWLIKOWSKI, J., MANOHARAN, I., VAN TUYN, J., NELSON, D.M., RAI, T.S., SHAH, P.P., HEWITT, G., KOROLCHUK, V.I., PASSOS, J.F., WU, H., BERGER, S.L., ADAMS, P.D. (2013) Lysosome-mediated processing of chromatin in senescent cells. *The Journal of Cell Biology* 202(1): 129-143.
- JAFFE, E.S. (2009) The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology, the Education Program of the American Society of Hematology* 523-531.
- Jl, R.R., CHASALOW, S.D., WANG, L., HAMID, O., SCHMIDT, H., COGSWELL, J., ALAPARTHY, S., BERMAN, D., JURE-KUNKEL, M., SIEMERS, N.O., JACKSON, J.R., SHAHABI, V. (2012) An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61(7): 1019-1031.
- JOHNSTONE, R.W., RUEFLI, A.A., AND LOWE, S.W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108(2): 153-164.
- JORDAN, M.S., BOESTEANU, A., REED, A.J., PETRONE, A.L., HOLENBECK, A.E., LERMAN, M.A., NAJI, A., CATON, A.J. (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology* 2(4): 301-306.
- 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.
- JOYCE, J.A. & FEARON, D.T. (2015) T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 348(6230): 74-80.
- KANG, T.W., YEWSA, T., WOLLER, N., HOENICKE, L., WUESTEFELD, T., DAUCH, D., HOHMEYER, A., GEREKE, M., RUDALSKA, R., POTAPOVA, A., IKEN, M., VUCUR, M., WEISS, S., HEIKENWALDER, M., KHAN, S., GIL, J., BRUDER, D., MANNS, M., SCHIRMACHER, P., TACKE, F., OTT, M., LUEDDE, T., LONGERICH, T., KUBICKA, S., ZENDER, L. (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479(7374): 547-551.
- KARNAD, A.B., JAFFAR, A. & LANDS, R.H. (1992) Spontaneous regression of acquired immune deficiency syndrome-related, high-grade, extranodal non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 69(7): 1856-1857.
- KEIR, M. E., BUTTE, M. J., FREEMAN, G. J., & SHARPE, A. H. (2008) PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology* 26(1): 677-704.



- KHIR, M.E., FREEMAN, G.J. & SHARPE, A.H. (2007) PD-1 Regulates Self-Reactive CD8+ T Cell Responses to Antigen in Lymph Nodes and Tissues. *The Journal of Immunology* 179(8): 5064-5070.
- KENT, P., O'DONOGHUE, J. M., O'HANLON, D. M., KERIN, M. J., MAHER, D. J., & GIVEN, H. F. (1995) Linkage analysis and the susceptibility gene (BRCA-1) in familial breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology* 21(3): 240-241
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4): 239-57.
- KHATTRI, R., COX, T., YASAYKO, S.-A., RAMSDELL, F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunology* 4(4): 337-342.
- KIM, H., PARK, E.S., LEE, S.H., KOO, H.H., KIM, H.S., LYU, C.J., JUN, S.E., LIM, Y.T., BAEK, H.J., KOOK, H., LEE, J.W., KANG, H.J., PARK, K.D., SHIN, H.Y., AHN, H.S. (2014) Clinical outcome of relapsed or refractory Burkitt lymphoma and mature B-cell lymphoblastic leukemia in children and adolescents. *Cancer Research and Treatment* 46(4): 358-365.
- KIM, W.Y. & SHARPLESS, N.E. (2006) The regulation of INK4/ ARF in cancer and aging. *Cell* 127(2): 265-275.
- KLAPPROTH, K. & WIRTH, T. (2010) Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *British Journal of Haematology* 149(4): 484-497.
- KOCH, M.A., THOMAS, K.R., PERDUE, N.R., SMIGIEL, K.S., SRIVASTAVA, S., CAMPBELL, D.J. (2012) T-bet+ Treg Cells Undergo Abortive Th1 Cell Differentiation due to Impaired Expression of IL-12 Receptor  $\beta$ 2. *Immunity* 37(3): 501-510.
- KOVALCHUK, A. L., QI, C.-F., TORREY, T. A., TADDESSE-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., MYSLIWIEZ, 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.
- KRIZHANOVSKY, V., YON, M., DICKINS, R.A., HEARN, S., SIMON, J., MIETHING, C., YEE, H., ZENDER, L., LOWE, S.W. (2008) Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* 134(4): 657-667.
- KUILMAN, T., MICHALOGLU, C., VREDEVELD, L.C., DOUMA, S., VAN DOORN, R., DESMET, C.J., AARDEN, L.A., MOOI, W.J., PEEPER, D.S. (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133(6): 1019-1031.
- KUILMAN, T., MICHALOGLU, C., MOOI, W.J., PEEPER, D.S. (2010) The essence of senescence. *Genes & Development* 24(22): 2463-2479.
- KURZ, D.J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J.D. (2000) Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science* 113(Pt 120): 3613-3622.
- KVISTBORG, P., PHILIPS, D., KELDERMAN, S., HAGEMAN, L., OTTENSMEIER, C., JOSEPH-PIETRAS, D., WELTERS, M.J., VAN DER BURG, S., KAPITEIJN, E., MICHELIN, O., ROMANO, E., LINNEMANN, C., SPEISER, D., BLANK, C., HAANEN, J.B. und SCHUMACHER, T.N. (2014) Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Science Translational Medicine* 6 (254): 254ra128.
- 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. & SPARWASSER, T. (2011) In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods in Molecular Biology* 707: 157-172.
- LAN, L., HOLLAND, J. & QI, J. (2015) Shp2 signaling suppresses senescence in PyMT-induced mammary gland cancer in mice. *The EMBO Journal* 34(11): 1493-1508.
- LANG, P.A., LANG, K.S., XU, H.C., GRUSDAT, M., PARISH, I.A., RECHER, M., ELFORD, A.R., DHANJI, S., SHAABANI, N., TRAN, C.W., DISSANAYAKE, D., RAHBAR, R., GHAZARIAN, M., BRÜSTLE, A., FINE, J., CHEN, P., WEAVER, C.T., KLOSE, C., DIEFENBACH, A., HÄUSSINGER, D., CARLYLE, J.R., KAECH, S.M., MAK, T.W., OHASHI, P.S. (2012) Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4): 1210-1215.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J.J., COWEY, C.L., LAO, C.D., SCHADENDORF, D., DUMMER, R., SMYLIE, M., RUTKOWSKI, P., FERRUCCI, P.F., HILL, A., WAGSTAFF, J., CARLINO, M.S., HAANEN, J.B., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., MCARTHUR, G.A., ASCIERTO, P.A., LONG, G.V., CALLAHAN, M.K., POSTOW, M.A., GROSSMANN, K., SZNOL, M., DRENO, B., BASTHOLT, L., YANG, A., ROLLIN, L.M., HORAK, C., HODI, F.S., WOLCHOK, J.D. (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 373(1): 23-34.
- LESOKHIN, A.M., CALLAHAN, M.K., POSTOW, M.A., WOLCHOK, J.D. (2015) On being less tolerant: Enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Science Translational Medicine* 7(280): 280sr1.
- LIPSON, E.J., SHARFMAN, W.H., DRAKE, C.G., WOLLNER, I., TAUBE, J.M., ANDERS, R.A., XU, H., YAO, S., PONS, A., CHEN, L., PARDOLL, D.M., BRAHMER, J.R., TOPALIAN, S.L. (2013) Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clinical Cancer Research* 19(2):462-468.
- LIU, Y. & JANEWAY, C.A. (1992) Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(9): 3845-3849.
- LÖFFLER, A., KUFER, P., LUTTERBÜSE, R., ZETTL, F., DANIEL, P.T., SCHWENKENBECHER, J.M., RIETHMÜLLER, G., DÖRKEN, B., BARGOU, R.C. (2000) A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95(6): 2098-2103.
- LOWE, S.W., RULEY, H.E., JACKS, T., HOUSMAN, D.E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74(6): 957-967.
- LU, L., IKIZAWA, K., HU, D., WERNECK, M.B.F., WUCHERPFENNIG, K.W., CANTOR, H. (2007) Regulation of Activated CD4+ T Cells by NK Cells via the Qa-1-NKG2A Inhibitory Pathway. *Immunity* 26(5): 593-604.
- MADORSKY ROWDO, F.P., BARON, A., URRUTIA, M., MORDOH, J. (2015) Immunotherapy in cancer: A combat between tumors and the immune system; you win some, you lose some. *Frontiers in Immunology* 6(MAR): 2-13.
- MAGRATH, I., ADDE, M., SHAD, A., VENZON, D., SEIBEL, N., GOOTENBERG, J., NEELY, J., ARNDT, C., NIEDER, M., JAFFE, E., WITTES, R.A., HORAK, I.D. (1996) Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *Journal of Clinical Oncology* 14(3): 925-934.
- MCDERMOTT, D.F., DRAKE, C.G., SZNOL, M., CHOUEIRI, T.K., POWDERLY, J.D., SMITH, D.C., BRAHMER, J.R., CARVAJAL, R.D., HAMMERS, H.J., PUZANOV, I., HODI, F.S., KLUGER, H.M., TOPALIAN, S.L., PARDOLL, D.M., WIGGINTON, J.M., KOLLIA, G.D., GUPTA, A., MCDONALD, D., SANKAR, V.,

- SOSMAN, J.A., ATKINS, M.B. (2015) Survival, Durable Response, and Long-Term Safety in Patients With Previously Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Receiving Nivolumab. *Journal of Clinical Oncology* 33(18): 2013-2020.
- MCLAUGHLIN, P., GRILLO-LÓPEZ, A.J., LINK, B.K., LEVY, R., CZUCZMAN, M.S., WILLIAMS, M.E., HEYMAN, M.R., BENICE-BRUCKLER, I., WHITE, C.A., CABANILLAS, F., JAIN, V., HO, A.D., LISTER, J., WEY, K., SHEN, D., DALLAIRE, B.K. (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *Journal of Clinical Oncology* 16(8): 2825-2833.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. (2000) Innate immunity. *The New England Journal of Medicine* 343(5): 338-344.
- MELERO, I., BERMAN, D.M., AZNAR, M.A., KORMAN, A.J., GRACIA, J.L.P., HAANEN, J. (2015) Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nature Reviews Cancer* 15(8): 457-472.
- MELLMAN, I., COUKOS, G. & DRANOFF, G. (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480(7378): 480-489.
- MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L.C., SOENGAS, M.S., DENOYELLE, C., KUILMAN, T., VAN DER HORST, C.M., MAJLOOR, D.M., SHAY, J.W., MOOI, W.J., PEEPER, D.S. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436(7051): 720-724
- MICHAUD, K., SOLOMON, D.A., OERMANN, E., KIM, J.S., ZHONG, W.Z., PRADOS, M. D., OZAWA, T., JAMES, C.D., WALDMAN, T. (2010) Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Research* 70(8): 3228-3238.
- MITTAL, D., GUBIN, M.M., SCHREIBER, R.D. und SMYTH, M.J. (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology* 27: 16-25.
- MKRTICHYAN, M., NAJJAR, Y.G., RAULFS, E.C., ABDALLA, M.Y., SAMARA, R., ROTEM-YEHUDAR, R., COOK, L., 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., 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.
- MORTON, L.M., WANG, S.S., DEVESA, S.S., HARTGE, P., WEISENBURGER, D.D., LINET, M.S. (2006) Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992–2001. *Blood* 107(1): 265-276.
- MOSKOWITZ, C. (2016) Novel agents and strategies in transplant-eligible patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *ASH Education Program Book* (1): 331-338.
- MÜLLER-HERMELINK, N., BRAUMÜLLER, H., PICHLER, B., WIEDER, T., MAILHAMMER, R., SCHAACK, K., GHORESCHI, K., YAZDI, A., HAUBNER, R., SANDER, C.A., MOCIKAT, R., SCHWAIGER, M., FÖRSTER, I., HUSS, R., WEBER, W.A., KNEILLING, M., RÖCKEN, M. (2008) TNFR1 signaling and IFN- $\gamma$  signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell* 13(6): 507-518.

- MUENST, S., LÄUBLI, H., SOYSAL, S.D., ZIPPELIUS, A., TZANKOV, A., HOELLER, S. (2016) The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine* 279(6): 541-562.
- MUÑOZ-ESPÍN, D. & SERRANO, M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 15(7): 482-96.
- MURPHY, K., TRAVERS, P. UND WALPORT, M. (2009) Janeway Immunologie. 7. Auflage. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- NARDELLA, C., CLOHESSY, J.G., ALIMONTI, A., PANDOLFI, P.P. (2011) Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature Review Cancer* 11(7): 503-511
- NARITA, M., NÚÑEZ, S., HEARD, E., NARITA, M., LIN, A.W., HEARN, S. A., SPECTOR, D.L., HANNON, G.J., LOWE, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113(6): 703-716.
- NG, T.H.S., BRITTON, G.J., HILL, E.V., VERHAGEN, J., BURTON, B.R., WRAITH, D.C. (2013) Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in Immunology* 4(MAY): 1-13.
- NICOLSON, G.L., BRUNSON, K.W. und FIDLER, I.J. (1978) Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Research* 38 (11 Pt 2): 4105-4111.
- NIRSCHL, C. J., & DRAKE, C. G. (2013) Molecular pathways: Coexpression of immune checkpoint molecules: Signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 19(18): 4917-4924.
- NISHIKAWA, H., KATO, T., TANIDA, K., HIASA, A., TAWARA, I., IKEDA, H., IKARASHI, Y., WAKASUGI, H., KRONENBERG, M., NAKAYAMA, T., TANIGUCHI, M., KURIBAYASHI, K., OLD, L.J., SHIKU, H. (2003) CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(19): 10902-10906.
- NISHIKAWA, H. & SAKAGUCHI, S. (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 27(1): 1-7.
- NISHIMURA, H., NOSE, M., HIAI, H., MINATO, N., HONJO, T. (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11(2): 141-151.
- NIZAR, S., COPIER, J., MEYER, B., BODMAN-SMITH, M., GALUSTIAN, C., KUMAR, D., DALGLEISH, A. (2009) T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *British Journal of Cancer* 100(11): 1697-703.
- O'GARRA, A., BARRAT, F.J., CASTRO, A.G., VICARI, A., HAWRYLOWICZ, C. (2008) Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Reviews* 223(1): 114-131.
- O'GARRA, A. & VIEIRA, P. (2004) Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Medicine* 10(8): 801-805.
- OKOYE, I.S., COOMES, S.M., PELLY, V.S., CZIESO, S., PAPAYANNOPOULOS, V., TOLMACHOVA, T., SEABRA, M.C., WILSON, M.S. (2014) MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* 41(1): 89-103.
- O'LEARY, B., FINN, R.S., TURNER, N.C. (2016) Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 13(7): 417-430.
- OLEINIKA, K., NIBBS, R.J., GRAHAM, G.J. und FRASER, A.R. (2013) Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clinical & Experimental Immunology* 171(1): 36-45.

- PANDYA, P.H., MURRAY, M.E., POLLOK, K.E., RENBARGER, J.L. (2016) The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *Journal of Immunology Research* 2016: 4273943
- PARDOLL, D.M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12(4): 252-264.
- PARK, J.H., GEYER, M.B. & BRENTJENS, R.J. (2016) CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: Interpreting clinical outcomes to date. *Blood* 127(26): 3312-3320.
- PARKIN, J. & COHEN, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357(9270): 1777-1789.
- PASTILLE, E., BARDINI, K., FLEISSNER, D., ADAMCZYK, A., FREDE, A., WADWA, M., VON SMOLINSKI, D., KASPER, S., SPARWASSER, T., GRUBER, A.D., SCHULER, M., SAKAGUCHI, S., ROERS, A., MÜLLER, W., HANSEN, W., BUER, J., WESTENDORF, A.M. (2014) Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer Research* 74(16): 4258-4269.
- PASSOS, J.F., SIMILLION, C., HALLINAN, J., WIPAT, A., & VON ZGLINICKI, T. (2009) Cellular senescence: Unravelling complexity. *Age* 31(4): 353-363.
- PENG, X., ZHANG, M.-Q.-Z., CONSERVA, F., HOSNY, G., SELIVANOVA, G., BYKOV, V.J.N., ARNÉR, E.S.J., WIMAN, K.G. (2013) APR-246/PRIMA-1MET inhibits thioredoxin reductase 1 and converts the enzyme to a dedicated NADPH oxidase. *Cell Death & Disease* 4: e881.
- PIETSCH, E. C., SYKES, S. M., MCMAHON, S. B., & MURPHY, M. E. (2008) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27(50): 6507-6521.
- PÖTZL, J., ROSER, D., BANKEL, L., HÖMBERG, N., GEISHAUSER, A., BRENNER, C.D., WEIGAND, M., RÖCKEN, M., MOCIKAT, R. (2017) Reversal of tumor acidosis by systemic buffering reactivates NK cells to express IFN- $\gamma$  and induces NK cell-dependent lymphoma control without other immunotherapies. *International Journal of Cancer*. doi:10.1002/ijc.30646
- PORTER, D., KALOS, M., ZHENG, Z., LEVINE, B., JUNE, C. (2011) Chimeric antigen receptor therapy for B-cell malignancies. *Journal of Cancer* 2: 331-332.
- POSTOW, M.A., CHESNEY, J., PAVLICK, A.C., ROBERT, C., GROSSMANN, K., MCDERMOTT, D., LINETTE, G.P., MEYER, N., GIGUERE, J.K., AGARWALA, S.S., SHAHEEN, M., ERNSTOFF, M.S., MINOR, D., SALAMA, A.K., TAYLOR, M., OTT, P.A., ROLLIN, L.M., HORAK, C., GAGNIER, P., WOLCHOK, J.D., HODI, F.S. (2015) Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 372(21): 2006-2017.
- POSTOW, M.A., CALLAHAN, M.K., BARKER, C.A., YAMADA, Y., YUAN, J., KITANO, S., MU, Z., RASALAN, T., ADAMOW, M., RITTER, E., SEDRAK, C., JUNGBLUTH, A.A., CHUA, R., YANG, A.S., ROMAN, R.-A., ROSNER, S., BENSON, B., ALLISON, J.P., LESOKHIN, A.M., GNJATIC, S., WOLCHOK, J.D. (2012) Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England Journal of Medicine* 366(10): 925-931.
- PROBIN, V., WANG, Y., BAI, A., ZHOU, D. (2006) Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319(2): 551-560.
- PURVIS, J.E., KARHOHS, K.W., MOCK, C., BATCHELOR, E., LOEWER, A., LAHAV, G. (2012) p53 Dynamics Control Cell Fate. *Science* 336(6087): 1440-1444.
- QUEZADA, S.A., PEGGS, K.S., CURRAN, M.A., ALLISON, J.P. (2006) CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1935-1945.

- QUEZADA, S.A., SIMPSON, T.R., PEGGS, K.S., MERGHOUB, T., VIDER, J., FAN, X., BLASBERG, R., YAGITA, H., MURANSKI, P., ANTONY, P.A., RESTIFO, N.P., ALLISON, J.P. (2010) Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of Experimental Medicine* 207(3): 637-650.
- RABINOVICH, B.A., LI, J., SHANNON, J., HURREN, R., CHALUPNY, J., COSMAN, D., MILLER, R. G. (2003) Activated, But Not Resting, T Cells Can Be Recognized and Killed by Syngeneic NK Cells. *The Journal of Immunology* 170(7): 3572-3576.
- RADER, J., RUSSELL, M.R., HART, L.S., NAKAZAWA, M.S., BELCASTRO, L.T., MARTINEZ, D., CARPENTER, E.L., ATTIYEH, E.F., DISKIN, S.J., KIM, S., PARASURAMAN, S., CAPONIGRO, G., SCHNEPP, R.W., WOOD, A.C., PAWEL, B., COLE, K.A., MARIS, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research* 19(22): 6173-6182.
- REED, J. C., CUDDY, M., SLABIAK, T., CROCE, C. M., & NOWELL, P. C. (1988) Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature* 336(6196): 259-261.
- REED, J.C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology* 157(5): 1415-1430.
- RIBERA, J.M., GARCÍA, O., GRANDE, C., ESTEVE, J., ORIOL, A., BERGUA, J., GONZÁLEZ-CAMPOS, J., VALL-LLOVERA, F., TORMO, M., HERNÁNDEZ-RIVAS, J.M., GARCÍA, D., BRUNET, S., ALONSO, N., BARBA, P., MIRALLES, P., LLORENTE, A., MONTESINOS, P., MORENO, M.J., HERNÁNDEZ-RIVAS, J.Á., BERNAL, T. (2013) Dose-intensive chemotherapy including rituximab in Burkitt's leukemia or lymphoma regardless of human immunodeficiency virus infection status: Final results of a phase 2 study (Burkimab). *Cancer* 119(9): 1660-1668.
- RIEDEL, T. (2013) Intratumorale T-Zellen in einem Spontanlymphommodell der Maus: aktivierende und supprimierende Mechanismen. Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie.
- ROSENBERG, S.A., YANG, J.C., SHERRY, R.M., KAMMULA, U.S., HUGHES, M.S., PHAN, G.Q., CITRIN, D.E., RESTIFO, N.P., ROBBINS, P.F., WUNDERLICH, J.R., MORTON, K.E., LAURENCOT, C.M., STEINBERG, S.M., WHITE, D.E., DUDLEY, M.E. (2011) Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17(13): 4550-4557.
- ROSS, J.S., FLETCHER, J.A. (1998) The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16(6): 413-428.
- ROUS, P. (1911) Transmission of amalignant new growth by means of a cell free filtrate. *JAMA* 56: 198
- SAKAGUCHI, S. (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology* 22: 531-562.
- 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., WING, K., ONISHI, Y., PRIETO-MARTIN, P. und YAMAGUCHI, T. (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology* 21(10): 1105-1111.
- SAKAGUCHI, S., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T., ONO, M. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133(5): 775-787.
- SALAMA, R., SADAIE, M., HOARE, M., NARITA, M. (2014) Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development* 28: 99-114.

- SCAFFIDI, P. & MISTELI, T. (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312: 1059-1063.
- SCHADENDORF, D., HODI, F.S., ROBERT, C., WEBER, J.S., MARGOLIN, K., HAMID, O., PATT, D., CHEN, T.-T., BERMAN, D.M., WOLCHOK, J.D. (2015) Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 33(17): 1889-1894.
- SCHIETINGER, A. & GREENBERG, P.D. (2014) Tolerance and exhaustion: Defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends in Immunology* 35(2): 51-60.
- SCHMITT, C.A., MCCURRACH, M.E., DE STANCHINA, E., WALLACE-BRODEUR, R.R., AND LOWE, S.W. (1999) INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes & Development* 13(20): 2670-2677.
- SCHMITT, C.A., FRIDMAN, J.S., YANG, M., LEE, S., BARANOV, E., HOFFMAN, R.M., LOWE, S.W. (2002) A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109(3): 335-346.
- 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.
- SCURR, M., LADELL, K., BESNEUX, M., CHRISTIAN, A., HOCKEY, T., SMART, K., BRIDGEMAN, H., HARGEST, R., PHILLIPS, S., DAVIES, M., PRICE, D., GALLIMORE, A., GODKIN, A. (2014) Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP+ Foxp3- T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Mucosal Immunology* 7(2): 428-439.
- SELBY, M.J., ENGELHARDT, J.J., QUIGLEY, M., HENNING, K.A., CHEN, T., SRINIVASAN, M., KORMAN, A.J. (2013) Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunology Research* 1(1): 32-42.
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88(5): 593-602.
- SHIMAMOTO, Y., KIKUCHI, M., FUNAI, N., SUGA, K., MATSUZAKI, M., YAMAGUCHI, M. (1993) Spontaneous regression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer* 72(3): 735-740
- SMITH-GARVIN, J. & KORETZKY, G. (2009) T cell activation. *Annual Review of Immunology* 27: 591-619.
- SHARMA, P., WAGNER, K., WOLCHOK, J.D. und ALLISON, J.P. (2011) Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature Reviews Cancer* 11(11): 805-812.
- SHARPE, A.H. & ABBAS, A.K. (2006) T-cell costimulation-biology, therapeutic potential, and challenges. *The New England Journal of Medicine* 355(10): 973-975.
- SHARPE, A.H. & FREEMAN, G.J. (2002) the B7–Cd28 Superfamily. *Nature Reviews Immunology* 2(2): 116-126.
- SHEVACH, E.M. (2009) Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30(5): 636-645.
- SHEVACH, E.M. & THORNTON, A.M. (2014) tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological Reviews* 259: 88-102
- SHI, Y., GLYNN, J.M., GUILBERT, L.J., COTTER, T.G., BISSONNETTE, R.P., GREEN, D.R. (1992) Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257(5067):212-214.

- SHI, J., ZHOU, Y., HUANG, H.C., MITCHISON, T.J. (2011) Navitoclax (ABT-263) accelerates apoptosis during drug-induced mitotic arrest by antagonizing Bcl-xL. *Cancer Research* 71(13): 4518-4526.
- SHIELS, M.S., PFEIFFER, R.M., HALL, H.I., LI, J., GOEDERT, J.J., MORTON, L.M., HARTGE, P., ENGELS, E.A. (2011) Proportions of Kaposi sarcoma, selected non-Hodgkin lymphomas, and cervical cancer in the United States occurring in persons with AIDS, 1980-2007. *JAMA* 305(14): 1450-1459.
- SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S. & SAKAGUCHI, S. (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of Immunology* 163(10): 5211-5218.
- SIMPSON, T.R., LI, F., MONTALVO-ORTIZ, W., SEPULVEDA, M.A., BERGERHOFF, K., ARCE, F., RODDIE, C., HENRY, J.Y., YAGITA, H., WOLCHOK, J.D., PEGGS, K.S., RAVETCH, J.V., ALLISON, J.P. und QUEZADA, S.A. (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *The Journal of Experimental Medicine* 210(9): 1695-1710.
- SNOOK, A.E. & WALDMAN, S.A. (2013) Advances in Cancer Immunotherapy. *Discovery Medicine* 15(81): 120-125.
- SOLANA, R., TARAZONA, R., GAYOSO, I., LESUR, O., DUPUIS, G., FULOP, T. (2012) Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Seminars in Immunology* 24(5): 331-341.
- SONG, Y.S., LEE, B.Y. & HWANG, E.S. (2005) Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development* 126(5): 580-590.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (Destatis) Fachserie 12, Reihe 4, 2015 © Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2017
- STRAUSS, L., BERGMANN, C., SZCZEPANSKI, M., GOODING, W., JOHNSON, J.T., WHITESIDE, T.L. (2007) A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ 1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research* 13(15): 4345-4354.
- SUN, Y., CAMPISI, J., HIGANO, C., BEER, T.M., PORTER, P., COLEMAN, I., TRUE, L., NELSON, P.S. (2012) Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nature Medicine* 18(9): 1359-1368.
- SUN, Z., FOURCADE, J., PAGLIANO, O., CHAUVIN, J.M., SANDER, C., KIRKWOOD, J.M., ZAROOR, H.M. (2015) IL10 and PD-1 cooperate to limit the activity of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Research* 75(8): 1635-1644.
- SUN, P., YOSHIZUKA, N., NEW, L., MOSER, B. A., LI, Y., LIAO, R., XIE, CHANGCHUAN, C., J., DENG, Q., YAMOUT, M., DONG, M.Q., FRANGOU, C.G., YATES, J.R., WRIGHT, P.E., HAN, J. (2007) PRAK Is Essential for ras-Induced Senescence and Tumor Suppression. *Cell* 128(2): 295-308.
- SUZUKI, K., MORI, I., NAKAYAMA, Y., MIYAKODA, M., KODAMA, S., WATANABE, M. (2001). Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiation Research* 155(1 Pt 2): 248-253.
- SWERDLOW, S.H., CAMPO, E., HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., PILERI, S.A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J.W. (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4th). Lyon, France: IARC Press
- TANAKA, A. & SAKAGUCHI, S. (2017) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research* 27(1): 109-118.



- TEFFERI, A., LASHO, T.L., BEGNA, K.H., PATNAIK, M.M., ZBLEWSKI, D.L., FINKE, C.M., LABORDE, R.R., WASSIE, E., SCHIMEK, L., HANSON, C.A., GANGAT, N., WANG, X., PARDANANI, A. (2015) A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine* 373(10): 908-919.
- THANGAVEL, C., DEAN, J.L., ERTEL, A., KNUDSEN, K.E., ALDAZ, C.M., WITKIEWICZ, A.K., CLARKE, R.K., E. S. (2011) Therapeutically activating RB: Reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 18(3): 333-345.
- 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
- 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.
- TOMASETTI, C. & VOGELSTEIN, B. (2015) Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347(6217): 78-81.
- 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.
- TOPALIAN, S.L., SZNOL, M., MCDERMOTT, D.F., KLUGER, H.M., CARVAJAL, R.D., SHARFMAN, W.H., BRAHMER, J.R., LAWRENCE, D.P., ATKINS, M.B., POWDERLY, J.D., LEMING, P.D., LIPSON, E.J., PUZANOV, I., SMITH, D.C., TAUBE, J.M., WIGGINTON, J.M., KOLLIA, G.D., GUPTA, A., PARDOLL, D.M., SOSMAN, J.A., HODI, F.S. (2014) Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of Clinical Oncology* 32(10): 1020-1030.
- TSUJIMOTO, Y. & CROCE, C.M. (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(14): 5214-5218.
- TURNIS, M. E., ANDREWS, L. P., & VIGNALI, D. A. A. (2015) Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology* 45(7): 1892-1905.
- VALZASINA, B., PICONESE, S., GUIDUCCI, C., COLOMBO, M.P. (2006) Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Research* 66(8): 4488-4495.
- VAN ALLEN, E.M., MIAO, D., SCHILLING, B., SHUKLA, S.A., BLANK, C., ZIMMER, L., SUCKER, A., HILLEN, U., GEUKES FOPPEN, M.H., GOLDINGER, S.M., UTIKAL, J., HASSEL, J.C., WEIDE, B., KAEHLER, K.C., LOQUAI, C., MOHR, P., GUTZMER, R., DUMMER, R., GABRIEL, S., WU, C.J., SCHADENDORF, D., GARRAWAY, L.A. (2015) Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 350(6257): 207-211.
- VAN DEN BOORN, J.G. & HARTMANN, G. (2013) Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system. *Immunity* 39(1): 27-37.
- VAN DEURSEN, J.M. (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509(7501): 439-446.
- VELU, V., TITANJI, K., ZHU, B., HUSAIN, S., PLADEVGA, A., LAI, L., VANDERFORD, T.H., CHENNAREDDI, L., SILVESTRI, G., FREEMAN, G.J., AHMED, R., AMARA, R.R. (2009) Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458(7235): 206-210.
- VENCE, L., PALUCKA, A.K., FAY, J.W., ITO, T., LIU, Y.-J., BANCHEREAU, J., UENO, H. (2007) Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(52): 20884-20889.

- VENTURA, A., KIRSCH, D.G., MCLAUGHLIN, M.E., TUVESON, D.A., GRIMM, J., LINTAULT, L., NEWMAN, J., RECZEK, E.E., WEISSLEDER, R., JACKS, T. (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445(7128): 661-665.
- 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.
- VILGELM, A.E., JOHNSON, C.A., PRASAD, N., YANG, J., CHEN, S.C., AYERS, G.D., PAWLIKOWSKI, J.S., RAMAN, D., SOSMAN, J.A., KELLEY, M., ECSEDY, J.A., SHYR, Y., LEVY, S.E., RICHMOND, A. (2016) Connecting the Dots: Therapy-Induced Senescence and a Tumor-Suppressive Immune Microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* 108(6).
- VOLLMAR, A., ZÜNDORF, I. UND DINGERMANN, T. (2012) Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe. 2. Auflage. Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*
- VON BOEHMER, H. (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology* 6(4): 338-344.
- VOUSDEN, K.H. & LANE, D.P. (2007) p53 in health and disease. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 8(4): 275-283.
- WADE, M., LI, Y.C., WAHL, G.M. (2013) MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Review Cancer* 13(2): 83-96.
- WALUNAS, T.L., LENSCHOW, D.J., BAKKER, C.Y., LINSLEY, P.S., FREEMAN, G.J., GREEN, J.M., THOMPSON, C.B. und BLUESTONE, J.A. (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1(5): 405-413.
- WANG, E. (1995) Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Research* 55(11): 2284-2292
- WANG, X., BRÉGÈGÈRE, F., SOROKA, Y., KAYAT, A., REDZINIAK, G., MILNER, Y. (2004) Enhancement of Fas-mediated apoptosis in ageing human keratinocytes. *Mechanisms of Ageing and Development* 125(3): 237-249.
- WANG, S.F., FOUQUET, S., CHAPON, M., SALMON, H., REGNIER, F., LABROQUÈRE, K., BADOUAL, C., DAMOTTE, D., VALIDIRE, P., MAUBEC, E., DELONGCHAMPS, N.B., CAZES, A., GIBAULT, L., GARCETTE, M., DIEU-NOSJEAN, M.C., ZERBIB, M., AVRIL, M.F., PRÉVOST-BLONDEL, A., RANDRIAMAMPITA, C., TRAUTMANN, A., BERCOVICI, N. (2011) Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors. *PLoS ONE* 6(3):e17621.
- WANG, C., LEE, J.H., KIM, C.H. (2012) Optimal population of FoxP3 + t cells in tumors requires an antigen priming-dependent trafficking receptor switch. *PLoS ONE* 7(1): e30793.
- WHERRY, E.J. (2011) T cell exhaustion. *Nature Immunology* 12(6): 492-499.
- WHERRY, E.J. & KURACHI, M. (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology* 15(8): 486-499.
- WHITESIDE, T.L., DEMARIA, S., RODRIGUEZ-RUIZ, M.E., ZAROOUR, H.M., MELERO, I. (2016) Emerging Opportunities and Challenges in Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 22(8): 1845-1855.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, STEWART, B.W. & WILD, C.P. (2014) *World Cancer Report 2014*
- WEINBERG, R. A. (1983) Alteration of the genomes of tumor cells. *Cancer* 51(11): 1971-1975.
- WING, K., ONISHI, Y., PRIETO-MARTIN, P., YAMAGUCHI, T., MIYARA, M., FEHERVARI, Z., NOMURA, T. und SAKAGUCHI, S. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322(5899): 271-275.

- WOLCHOK, J.D., HOOS, A., O'DAY, S., WEBER, J.S., HAMID, O., LEBBÉ, C., MAIO, M., BINDER, M., BOHNSACK, O., NICHOL, G., HUMPHREY, R., HODI, F.S. (2009) Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: Immune-related response criteria. *Clinical Cancer Research* 15(23): 7412-7420.
- 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., SZNOL, M. (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England Journal of Medicine* 369(2): 122-133.
- WOLCHOK, J.D., WEBER, J.S., MAIO, M., NEYNS, B., HARMANKAYA, K., CHIN, K., CYKOWSKI, L., DE PRIL, V., HUMPHREY, R., LEBBÉ, C. (2013) Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Annals of oncology : official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24(8): 2174-2180.
- XUE, W., ZENDER, L., MIETHING, C., DICKINS, R.A., HERNANDO, E., KRIZHANOVSKY, V., CORDON-CARDO, C., LOWE, S.W. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445(7128): 656-660.
- YAMAGUCHI, T., KISHI, A., OSAKI, M., MORIKAWA, H., PRIETO-MARTIN, P., WING, K., SAITO, T., SAKAGUCHI, S. (2013) Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(23): E2116-2125.
- YAN, J., LIU, B., SHI, Y., QI, H. (2017) Class II MHC-independent suppressive adhesion of dendritic cells by regulatory T cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 214(2): 319-326.
- YONISH-ROUACH, E., RESNITZKY, D., LOTEM, J., SACHS, L., KIMCHI, A., OREN, M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352(6333): 345-347.
- ZABRANSKY, D.J., NIRSCHE, C.J., DURHAM, N.M., PARK, B.V., CECCATO, C.M., ET AL. (2012) Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS ONE* 7(3): e34547.
- ZHANG, R., POUSTOVOITOV, M. V., YE, X., SANTOS, H. A., CHEN, W., DAGANZO, S. M., ERZBERGER, J.P., SEREBRIISKII, I.G., CANUTESCU, A.A., DUNBRACK, R.L., PEHRSON, J.R., BERGER, J.M., KAUFMAN, P.D., ADAMS, P. D. (2005) Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Developmental Cell* 8(1): 19-30.
- ZHENG, S.G., WANG, J.H., GRAY, J.D., SOUCIER, H., HORWITZ, D.A. (2004) Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25- Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- $\beta$ , and IL-10. *The Journal of Immunology* 172(9): 5213-5221
- ZHU, J., WOODS, D., MCMAHON, M., BISHOP, J.M. (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes & Development* 12(19): 2997-3007.
- ZOU, W. (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 6(4): 295-307.

## 6 ANHANG

### 6.1 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht.

#### 6.1.1 Fachpublikation

Ellen Brenner\*, Barbara F. Schörg\*, Fatima Ahmetlić\*, ... ,Ralph Mocikat, Manfred Kneilling & Martin Röcken (2016) Senescence induction is required for cancer control by immune-checkpoint inhibitors. *Zur Veröffentlichung eingereicht.*

\* geteilte Erstautorenschaft

#### 6.1.2 Poster und Vorträge

Fatima Ahmetlić, Tanja Riedel, Martin Röcken, Ralph Mocikat. Suppression of T-cell-mediated immune responses in an endogenously growing murine B-cell lymphoma model. *44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Bonn, 17.-20. September 2014.*

Fatima Ahmetlić, Tanja Riedel, Tim Sparwasser, Martin Röcken, Ralph Mocikat. The role of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in a murine model of spontaneously developing B-cell lymphoma. *13<sup>th</sup> CIMT Annual Meeting, Mainz, 11.-13. Mai 2015.*

Fatima Ahmetlić, Tanja Riedel, Carolin Flessner, Heidi Braumüller, Tim Sparwasser, Martin Röcken, Ralph Mocikat. Suppression of T-cell-mediated immune responses and the role of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in a murine model of spontaneously arising B-cell lymphoma. *4. Europäischer Kongress für Immunologie, Wien, 6.-9. September 2015.*

Fatima Ahmetlić, Heidi Braumüller, Birgit Fehrenbacher, Carolin Flessner, Tanja Riedel, Martin Röcken, Ralph Mocikat. Senescence induction by IFN- $\gamma$  is necessary for suppression of mouse lymphoma by immune-checkpoint inhibitors. *46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hamburg, 27.-30. September 2016.*

## 6.2 DANKSAGUNG

Ganz besonders danken möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Ralph Mocikat, der mir mit seinem Wissen und seiner Erfahrung während der letzten drei Jahre eine große Stütze war. Bei der Durchführung meiner Doktorarbeit stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite und investierte viel Zeit in die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Auf seine konstruktiven Vorschläge für anfallende Probleme jeglicher Art konnte ich immer zählen und in den zahlreichen aufbauenden Gesprächen sehr viel lernen.

Mein herzlichster Dank gilt der AG Mocikat. Nadine, Albert, Nina, Tanja, Caro, Josia und David haben meine Dissertationsphase zu einem sehr fröhlichen Lebensabschnitt gemacht. Das freundschaftliche Arbeitsklima, die gegenseitige Unterstützung und die hilfreichen fachlichen Gespräche waren während der gesamten Doktorarbeitszeit tolle Motivationsfaktoren. Auch allen anderen Kollegen am Institut danke ich für die schöne Zeit und die entspannte Arbeitsatmosphäre. Nicht nur die Stunden im Labor, auch die vielen gemeinsamen Freizeitaktivitäten werden mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Desweiteren danke ich der Deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung der Arbeit. Im Besonderen danke ich auch Prof. Martin Röcken und seinen Mitarbeiterinnen Dr. Heidi Braumüller, Ellen Brenner und Birgit Fehrenbacher für viele produktive Ideen und eine freundliche Zusammenarbeit. Gerne möchte ich mich auch beim Tierstall-Team des Hämatologikums für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit bedanken. Ein herzlicher Dank gilt Dr. Josef Mysliwietz für seine große Unterstützung bei der Zellsortierung und die vielen netten Gespräche währenddessen. Ein großes Dankeschön auch an die „Plattform Monoklonale Antikörper“ und insbesondere an Andrew für die Bereitstellung von Antikörpern.

Zuletzt möchte ich mich vor allem bei meinen lieben Freunden und meiner Familie für ihren jahrelangen Rückhalt bedanken. Ich konnte mich stets darauf verlassen, von meinen Freunden die nötige Ablenkung und Unterstützung während der Dissertationszeit zu bekommen. Auf das Verständnis meiner Eltern und meines Bruders konnte ich während all der Höhen und Tiefen der letzten Jahre immer bauen. Ich bin so froh, dass es euch gibt.