

DISSERTATION

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

NK-Zell-vermittelte Mechanismen der Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren in einem murinen Spontanlymphommodell

Josia Fauser

aus
Landshut

2020

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

**NK-Zell-vermittelte Mechanismen der Therapie mit
Immunkontrollpunkt-Inhibitoren in einem murinen
Spontanlymphommodell**

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

vorgelegt von
Josia Fauser
aus
Landshut

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling
Prof. Dr. Petro. E. Petrides
Prof. Dr. Ralf Schmidmaier

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2020

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Fauser, Josia

Name, Vorname

ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„NK-Zell-vermittelte Mechanismen der Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren in einem murinen Spontanlymphommodell“

selbständig verfasst, mich außer der 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.

Innsbruck, 01.05.2020

Ort, Datum

Josia Fauser

Doktorand

*„Groß sind die Werke des Herrn; wer sie erforscht,
der hat Freude daran.“*

Psalm 111,2

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von Therapien gegen Krebserkrankungen spielt derzeit eine große Rolle in der Forschung, in welcher insbesondere die Immuntherapie eine vielversprechende Behandlungsoption zu sein scheint. Diese Bestrebungen mündeten in die Entwicklung monoklonaler Antikörper, die gegen die Kontrollpunkte PD-1 und CTLA-4 gerichtet sind und heute in der Therapie von verschiedenen Tumorentitäten, wie dem malignen Melanom oder Bronchial-Karzinom, Anwendung finden. Für den Behandlungserfolg werden bisher vor allem die T-Zellen verantwortlich gemacht.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der Behandlung mit Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Antikörpern in einem endogenen Lymphommodell, in welchem die Mäuse durch die Aktivität eines transgenen *c-MYC*-Onkogens nach 7-9 Lebenswochen B-Zell-Lymphome entwickeln, erforscht. Dabei wurden den *c-MYC*-Mäusen am Tag 60 und 70 sowohl Anti-PD-1- als auch Anti-CTLA-4-Ak i.p. injiziert. Im Anschluss daran wurden sie abgetötet und Milz sowie Lymphknoten, Manifestationsorte des Lymphoms, entnommen. Bei den folgenden Untersuchungen der intratumoralen NK-Zellen fiel auf, dass deren Anzahl in der behandelten Gruppe deutlich höher war als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Als mögliche Ursache kam eine verstärkte Proliferation in Betracht, die jedoch nur gering erhöht war. Darüber hinaus wiesen die NK-Zellen der therapierten *c-MYC*-Mäuse eine signifikant erhöhte IFN- γ -Expression auf. In der Folge ergaben sich weitere Hinweise für eine erhöhte Zytotoxizität dieser NK-Zellen, denn es waren intrazellulär größere Mengen an Granzym B und Perforin sowie an der Zelloberfläche eine höhere Expression von CD107a, einem Degranulationsmarker, festzustellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Therapie mit Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Ak einen positiven Einfluss auf den Antitumoreffekt der NK-Zellen hat. Daher wurde anschließend die Expression von PD-1 und CTLA-4 auf NK-Zellen von gesunden und kranken *c-MYC*-Mäusen gemessen. Es zeigte sich, dass insbesondere PD-1 auf NK-Zellen der kranken *c-MYC*-Mäuse überexprimiert ist. Aufgrund der Tatsache, dass einerseits PD-1 auf NK-Zellen kranker Mäuse hochreguliert wird, andererseits die Blockade von PD-1 in vivo eine erhöhte IFN- γ -Expression zur Folge hat, war es entscheidend zu wissen, ob dieser

Effekt durch die direkte Blockade von PD-1 auf NK-Zellen oder indirekt durch eine verminderte Suppression des Immunsystems durch die regulatorischen Zellen und einer damit einhergehenden Aktivierung der NK-Zellen bewirkt wird. Dabei stellte sich heraus, dass die IFN- γ -Expression der magnetisch separierten NK-Zellen, deren PD-1 in vitro blockiert wurde, signifikant erhöht war gegenüber der Gruppe, die keinen oder nur den Anti-CTLA-4-Ak erhalten hatten. So lag die Vermutung nahe, dass die Steigerung der IFN- γ -Expression durch die direkte Blockade von PD-1 vermittelt wird.

Das von den NK-Zellen vermehrt exprimierte IFN- γ könnte allerdings durch Förderung der Migration nicht nur ursächlich für die erhöhte intratumorale NK-Zellzahl sein, sondern auch das immunsuppressive Milieu verringern und u.a. Th1-Zellen in ihrer Antitumoraktivität unterstützen.

Mit dem Ziel, die Immunkontrollpunkt-Inhibitoren mit einem Th1-Zell-Transfer zu kombinieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll etabliert, mit dem es möglich ist, Th1-Zellen zu generieren, die spezifisch gegen 291-Zellen - Lymphomzellen, die aus dem Tumor einer *c-MYC*-Maus generiert wurden - gerichtet sind, ohne ein tumorspezifisches Antigen zu kennen. Nach dem erfolgreichen Nachweis der Tumorspezifität der Th1-Zellen, wurden diese in einem Überlebensversuch *c-MYC*-Mäusen viermal im Abstand von einer Woche i.v. injiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Therapiegruppe ein verlängertes Gesamtüberleben, ein erhöhtes medianes Überleben und auch Langzeitüberleber aufwies.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass NK-Zellen nicht nur Anteil am Therapieerfolg durch Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Ak haben, sondern dass durch ihre gesteigerte IFN- γ -Expression auch eine Verringerung des immunsuppressiven Milieus und eine vermehrte Th1-Zell-Polarisierung möglich erscheinen, sodass eine Kombination der Kontrollpunktinhibition mit dem adoptiven Th1-Zell-Transfer eine zu erforschende Therapieoption darstellt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	10
1.1. Das Immunsystem	10
1.1.1. Das angeborene Immunsystem	10
1.1.2. Das adaptive Immunsystem	11
1.2. Tumorimmunologie	12
1.2.1. Die Rolle der NK-Zellen.....	12
1.2.2. Die Rolle der Th1-Zellen	14
1.2.3. Immunsuppression durch Tumorzellen	15
1.3. Modell des spontanen B-Zell-Lymphoms	16
1.4. Fragestellung	17
2. MATERIAL & METHODEN	19
2.1. Material	19
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2. Reagenzien, Chemikalien, Zytokine	20
2.1.3. Medien und Puffer	21
2.1.4. Kits	22
2.1.5. Antikörper	22
2.1.5. Mäuse	23
2.1.6. Software	24
2.2. Methoden	25
2.2.1. Zelllinien und Zellkulturbedingungen	25
2.2.2. Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen	25
2.2.3. Durchflusszytometrie	26
2.2.4. CD107a-Degranulierungs-Versuch	27
2.2.5. MACS-Zell-Separation	28
2.2.6. In-vitro-Stimulation mit anti-PD-1-/anti-CTLA-4-AK	28
2.2.7. Generieren von 291-spezifischen Th1-Zellen.....	29
2.2.8. T-Zell-Stimulation	31
2.2.9. Quantifizierung von Zytokinen	31

2.2.10.	Therapieversuche	32
2.2.11.	Statistische Auswertung.....	33
3.	ERGEBNISSE.....	34
3.1.	Einfluss der Kontrollpunktblockade auf die NK-Zellen	34
3.1.1.	NK-Zell-Zahl in Milz und LK.....	34
3.1.2.	IFN- γ -Expression in NK-Zellen	36
3.1.3.	Zytotoxizitätsparameter.....	37
3.2.	Analyse der Rolle von Immunkontrollpunkten auf NK-Zellen	41
3.2.1.	Expression von Immunkontrollpunkten auf NK-Zellen	41
3.2.2.	Untersuchung des Effekts von Immunkontrollpunkt-Inhibitoren auf IFN- γ in vitro	43
3.3.	Tumorzell-spezifische Th1-Zellen: Generierung und Therapieansatz	46
3.3.1.	Etablierung eines Protokolls zur Generierung 291-spezifischer Th1-Zellen	46
3.3.2.	Nachweis der Tumorspezifität der Th1-Zellen.....	50
3.3.3.	Therapieversuch mit 291-spezifischen Th1-Zellen.....	51
4.	DISKUSSION.....	53
4.1.	Erörterung der Wirksamkeit der Blockade von PD-1 und CTLA-4	53
4.2.	Adoptiver Th1-Zell-Transfer als Therapiemöglichkeit von Tumoren	55
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	58
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
7.	ANHANG.....	69

1. EINLEITUNG

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe den menschlichen Körper vor Infektionen durch eindringende Mikroorganismen zu schützen. Im Rahmen einer Immunantwort müssen die Krankheitserreger zunächst als körperfremd erkannt werden, bevor sie durch humorale und zelluläre Mechanismen eliminiert werden können. Damit körpereigene Zellen und Gewebe dabei nicht zu großen Schaden nehmen, bedarf es einer strengen Regulation der Immunantwort. Grundsätzlich lassen sich zwei Gruppen des Immunsystems unterscheiden. Während das angeborene Immunsystem schnell und unspezifisch auf eine Pathogenexposition reagiert und zu einer schnellen Eliminierung der Erreger führt, benötigt das adaptive Immunsystem mehr Zeit, um eine spezifische Antwort zu generieren und ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln. Die komplexe Interaktion dieser beiden Gruppen gewährleistet einen schnellen und dauerhaften Schutz des Körpers vor Infektionen. (Murphy et al., 2009; Chaplin, 2010; Parkin & Cohen, 2001)

1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem umfasst auf der einen Seite physikalische, chemische sowie antimikrobielle Barrieren, auf der anderen Seite auch humorale, z.B. das Komplementsystem, und zelluläre Bestandteile, zu denen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DZ) gehören. Gelangt ein Erreger in den menschlichen Organismus, so wird er von Makrophagen phagozytiert, was deren Aktivierung nach sich zieht. Diese Aktivierung erfolgt im Rahmen einer Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Dadurch kommt es zu einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und unreifen DZ. Dies führt zu einer vermehrten Eliminierung der Mikroorganismen, die von den Immunzellen durch das Erkennen körperfremder Strukturen mittels Mustererkennungsrezeptoren (PRR = „Pattern Recognition Receptors“) detektiert werden. Zu diesen PRR gehören unter anderem die „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR), von denen manche Untergruppen bakterielle, andere virale

Oberflächen- und Nukleinsäurestrukturen erkennen können. (Parkin & Cohen, 2001; Rassow et al., 2012; Chaplin, 2010)

1.1.2. Das adaptive Immunsystem

Ein Teil des angeborenen Immunsystems - dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen - ist durch die Präsentation von Antigenen über MHC-II-Komplexe an der Zelloberfläche in die Initiierung der adaptiven, antigenspezifischen Immunantwort involviert. Erkennt eine CD4⁺-T-Zelle mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TZR) den MHC-II-Antigen-Komplex, wird diese aktiviert und differenziert sich zu einer T-Helferzelle. Daraufhin kommt es unter anderem zu einer T-Helferzell-abhängigen Aktivierung von B-Lymphozyten, die ihrerseits zu Plasmazellen differenzieren und antigenspezifische Antikörper produzieren. Dieser humorale Bestandteil des adaptiven Immunsystems bewirkt eine indirekte Elimination der Erreger durch Opsonisierung derselben oder eine Aktivierung des Komplementsystems (Parkin & Cohen, 2001; Rassow et al., 2012).

Sind körpereigene Zellen von Mikroorganismen befallen, präsentieren sie Antigene der Erreger über zellmembranständige MHC-I-Komplexe. Wird ein MHC-I-Antigen-Komplex von CD8⁺-T-Zellen mithilfe ihres TZR erkannt, differenzieren sich diese zu zytotoxischen T-Zellen, die die befallenen Zellen abtöten. Bei beiden MHC-Aktivierungswegen bedarf es immer noch eines zusätzlichen kostimulatorischen Signales, z.B. der Interaktion von CD28 der T-Zelle mit dem B7-Rezeptor der antigenpräsentierenden Zelle (Rassow et al., 2012; Chaplin, 2010).

Während der primären adaptiven Immunantwort differenzieren einige der T- und B-Lymphozyten zu Gedächtniszellen, die durch eine lange Lebenszeit gekennzeichnet sind. Bei einem erneuten Kontakt mit dem Erreger werden diese allein durch die Antigenbindung reaktiviert. Somit kann eine wesentlich schnellere Immunantwort gewährleistet werden (Parkin & Cohen, 2001; Murphy et al., 2009).

1.2. Tumormmunologie

Das Immunsystem hat nicht nur die Beseitigung von Krankheitserregern zur Aufgabe, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Überwachung von Tumoren (Ehrlich, 1909). Besitzen Menschen ein geschwächtes Immunsystem, z.B. aufgrund einer immunsuppressiven Therapie nach einer Organtransplantation, haben diese ein höheres Risiko, an Tumoren, insbesondere an virusinduzierten, zu erkranken (Penn, et al. 1971). Bei Immunkompetenten dagegen werden viele Tumoren schon in sehr frühem Stadium beseitigt. Die Antwort des Immunsystems auf Tumorzellen bezeichnet man auch als „Immunoediting“. Dieser Begriff umfasst sowohl die Immunüberwachung als auch die Tumorentwicklung. Das Immunoediting kann in 3 Phasen unterteilt werden. Die erste Phase besteht in der Elimination der Tumorzellen (Dunn et al., 2002). Ein Tumor verursacht häufig durch sein initial progressives Wachstum Gewebeschäden, die eine Inflammation und damit auch eine Einwanderung von Immunzellen mit sich ziehen. Es kommt zur ersten Beseitigung von Tumorzellen durch Zellen des angeborenen Immunsystems, v.a. NK-Zellen und Makrophagen (Smyth, et al. 2002). Die dendritischen Zellen (DZ) nehmen Teile der toten Tumorzellen auf, wandern in Lymphknoten und präsentieren dort die Tumorantigene. Daraus resultiert die Induktion von spezifischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die wiederum in das Tumorgebiet einwandern (Dunn et al., 2002). Wenn nicht alle Tumorzellen ausgelöscht werden konnten, entwickelt sich die zweite Phase (Gleichgewichtsphase), die sich oft über Jahre erstrecken kann und in der, gemäß der Darwinschen Selektion, durch Mutationen neue Tumorvarianten, die vom Immunsystem toleriert werden, entstehen. Diese Phase des Gleichgewichts geht zu einem unbestimmten Zeitpunkt in die Phase des Entkommens über, in der es zu einem unkontrollierten, progressiven Wachstum einer neuen Tumorzellvariante kommt. In dieser dritten Phase wird der Tumor erst klinisch symptomatisch (Dunn et al., 2002; Khong & Restifo, 2002).

1.2.1. Die Rolle der NK-Zellen

Eine wichtige Rolle bei der Elimination von Tumorzellen kommt den NK-Zellen zu. NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und entwickeln sich aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Obwohl NK-Zellen morphologisch den

B- und T-Lymphozyten ähneln, besitzen sie keine antigenspezifischen Rezeptoren, um Tumorzellen zu detektieren. Die Erkennung von Tumorzellen kann über zwei verschiedene Wege erfolgen (Grzywacz et al., 2011; Parkin & Cohen, 2001).

Die NK-Zell-Effektorfunktion wird über eine Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen reguliert. Im menschlichen Körper exprimieren alle kernhaltigen Zellen den MHC-I-Komplex, über den intrazelluläre Peptide präsentiert werden (Hewitt, 2003). Als Schutzmechanismus, um nicht körpereigene Zellen zu eliminieren, werden NK-Zellen bei Bindung eines MHC-I-Komplexes an einen MHC-I-Rezeptor (z.B. KIR/Ly49) in ihrer Membran gehemmt. Kommt es aber bei einer Tumorzelle zu einer verminderten Expression von MHC-I-Molekülen, z.B. um nicht von zytotoxischen T-Lymphozyten entdeckt zu werden, fehlt diese inhibitorische Bindung, die aktivierenden Signale überwiegen, und die NK-Zelle wird aktiviert (Campbell & Purdy, 2011; Lanier, 2008; Morvan & Lanier, 2016).

Ein anderer Weg der Aktivierung der NK-Zelle erfolgt über die Bindung ihres Fc-Rezeptors (FcγRIIIA) an den Fc-Teil von Immunglobulinen, die gegen Antigene der Tumorzelle gerichtet sind. Diesen Prozess bezeichnet man auch als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC; Morvan & Lanier, 2016).

Die Eliminierung von Tumorzellen durch NK-Zellen kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. So werden bei Aktivierung Granula sezerniert, die einerseits Perforin enthalten, welches die Zellmembran perforiert, andererseits die Serinproteasen Granzyme A und B, die in der Zielzelle über Caspase-abhängige und –unabhängige Mechanismen die Apoptose einleiten (Lieberman, 2010). Des Weiteren können NK-Zellen über Liganden von sog. Todesrezeptoren (FasL, TRAIL) in den Zielzellen Caspase-abhängig die Apoptose auslösen (Ashkenazi, 2002). Neben diesen Wegen der direkten Zytotoxizität sezernieren NK-Zellen bei Aktivierung eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere IFN- γ (Smyth et al., 2002). IFN- γ hat eine Reihe von Antitumorfunktionen. Es bewirkt auf der einen Seite eine Aktivierung von Makrophagen, die unter anderem zur CXCL9-Produktion angeregt werden und dadurch eine verstärkte Migration von NK- und Th1-Zellen induzieren. Andererseits inhibiert IFN- γ sowohl das Tumorstadium als auch die Tumor-induzierte

Angiogenese. Darüber hinaus spielt IFN- γ eine wichtige Rolle bei der Förderung einer tumorantigenspezifischen CD4⁺-T-Zell-Antwort durch eine Steigerung der Expression von MHC-II-Molekülen sowie durch eine Th1-Zell-Polarisierung (Qin & Blankenstein, 2000; Schroder et al., 2004).

1.2.2. Die Rolle der Th1-Zellen

Die Th1-Zellen, die zur Gruppe der CD4⁺-T-Zellen gehören, sind Teil des adaptiven Immunsystems und wie die NK-Zellen auch an der Bekämpfung von Tumoren beteiligt. Damit sich eine Th1-Zelle entwickelt, bedarf es neben zwei Signalen noch eines Zytokinmilieus, welches diese Differenzierung fördert. So muss eine CD4⁺-T-Zelle einerseits mithilfe ihres TZR an den MHC-II-Antigen-Komplex einer APZ binden, andererseits bedarf es zusätzlich eines kostimulatorischen Signales wie der Interaktion von CD80 oder CD86 der APZ mit CD28 der CD4⁺-T-Zellen. Wenn in der näheren Umgebung eine erhöhte Konzentration an IFN- γ und IL-12 vorliegt, differenzieren diese zu Th1-Zellen, bei einem Überschuss an IL-4 und IL-10 dagegen entwickeln sie sich zu Th2-Zellen (Kennedy, 2008; Pardoll & Topalian, 1998).

Auch Th1-Effektorzellen sezernieren IFN- γ , dessen Antitumorwirkung in 1.2.1 schon beschrieben wurde. Darüber hinaus fördern Th1-Zellen durch die Produktion von IFN- γ in B-Zellen den Klassenwechsel zu IgG (Stevens et al., 1988), welche als opsonisierende Antikörper an Tumorzellen binden und damit die ADCC aktivieren können, sowie durch IL-2 das Wachstum und Überleben von CTL's (Parkin & Cohen, 2001; Schroder et al., 2004). Durch Th1-Zellen ist es außerdem möglich, eine langfristige Antitumorantwort zu generieren, da sie eine essenzielle Rolle bei der Entwicklung von CTL-Gedächtniszellen spielen (Hoyer et al., 2014).

Bei Aktivierung einer Th1-Zelle werden gegenregulatorisch inhibierende Mechanismen eingeleitet, um eine überschießende Immunreaktion und damit mögliche Schäden an körpereigenen Strukturen zu verhindern (Parkin & Cohen, 2001). Daher erfolgt sowohl autokrin als auch durch regulatorische T-Zellen eine IL-10-Sekretion (Saraiva & Garra, 2010). Eine weitere Inhibition der T-Zellen kann durch die Aktivierung inhibitorischer Rezeptoren, sogenannten Immunkontrollpunkten erfolgen. Dabei wird der Ligand, z.B.

PD-L1, häufig von APZ's exprimiert und bindet bei Zell-Zell-Interaktion an den jeweiligen inhibitorischen Rezeptor der aktivierten T-Zelle, z.B. PD-1 (Pardoll, 2012).

1.2.3. Immunsuppression durch Tumorzellen

Diese Mechanismen der Regulation werden von Tumorzellen missbraucht, um ein immunsuppressives Milieu aufzubauen. So sezernieren sie selbst IL-10, was einerseits eine Hemmung der NK-, Th1-Zellen und CTL's, andererseits auch eine Induktion von regulatorischen T-Zellen bewirkt, welche wiederum das immunsuppressive Milieu verstärken. Darüber hinaus fördert es das Tumorwachstum und die Angiogenese (Banerjee et al., 2013; Garcia-Hernandez et al., 2002). Des Weiteren zeigen Tumoren eine verstärkte Produktion immuninhibitorischer Moleküle, wie der Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) oder Arginase, die über den Abbau von Tryptophan bzw. Arginin eine T-Zell-Antwort hemmen (Munn & Mellor, 2007; Rodríguez & Ochoa 2008). Ein weiterer Weg der Tumorzellen, die T-Zell-Effektorfunktion effektiv einzuschränken, ist durch die verstärkte Rezeptor-Liganden-Interaktion an inhibitorischen Immunkontrollpunkten. Zu den bekanntesten Rezeptoren zählen CTLA-4 und PD-1 (Pardoll, 2012). Während die Bindung von CD80/CD86 an CTLA-4 der T-Helferzellen deren Aktivierung herunterreguliert, löst dieselbe Bindung bei regulatorischen T-Zellen eine Verstärkung ihrer immunsuppressiven Wirkung aus. Eine Blockade von CTLA-4 auf der Membran von regulatorischen und T-Helferzellen mithilfe von Antikörpern resultierte dagegen bei immunogenen Tumoren in einer starken Antitumorantwort (Pardoll, 2012; Peggs et al., 2009). Diese Erkenntnis führte dazu, dass mit Ipilimumab ein Anti-CTLA-4-Antikörper entwickelt wurde, der bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom ein verlängertes Gesamtüberleben hervorrief (Hodi et al., 2010). Mit PD-1 wurde ein zweiter inhibitorischer Kontrollpunkt entdeckt, dessen Blockade heute ebenfalls klinisch Anwendung findet. Durch die Interaktion der Liganden PD-L1 und PD-L2, die häufig von Tumoren überexprimiert werden, mit dem Rezeptor PD-1, wird nicht nur die Aktivität der Effektor-T-Zellen inhibiert, sondern auch die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen gefördert (Francisco et al., 2009; Parry et al., 2005). Außerdem bewirkt ein dauerhafter, chronischer Antigenkontakt, wie es bei Tumoren oder chronischen Infektionen der Fall ist, eine hohe PD-1-Expression, die die

Effektor-T-Zellen in einen erschöpften oder anergen Zustand versetzt. Diese immunsuppressiven Auswirkungen der Interaktion von PD-1 und PD-L1/PD-L2 sind durch Blockade von PD-1 teilweise reversibel (Barber et al., 2006). Dies führte dazu, dass mit Nivolumab ein PD-1 blockierender Antikörper in der Krebstherapie Fuß fassen konnte. Nachdem dieser anfangs nur bei metastasiertem malignem Melanom zugelassen war (Topalian et al., 2014), gibt es nun auch Indikationen für den therapeutischen Einsatz bei bestimmten Bronchial- und Nierenzellkarzinomen (Gettinger et al., 2015; McDermott et al., 2015).

1.3. Modell des spontanen B-Zell-Lymphoms

Aufgrund der guten Ergebnisse hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei den oben genannten Tumoren durch die Blockade der inhibitorischen Immunkontrollpunkte, werden diese nun bei weiteren Neoplasien getestet. Um die therapeutische Wirkung der Immunkontrollpunkt-Blockade noch besser zu verstehen, werden die Inhibitoren auch im präklinischen Mausmodell eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die Versuche mit *c-MYC*-transgenen-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund durchgeführt. Die Expression des humanen *c-MYC*-Onkogens steht dabei unter der Kontrolle des Verstärkers für die Ig λ -Kette (Kovalchuk et al., 2000). Aufgrund dieser genetischen Veränderung entwickeln diese Mäuse nach 7-9 Lebenswochen B-Zell-Lymphome, die sich morphologisch in einer generalisierten Lymphadenopathie sowie einer Splenomegalie manifestieren. Dieses B-Zell-Lymphom entspricht dem Burkitt-Lymphom beim Menschen, einem sehr schnell wachsenden Tumor der Non-Hodgkin-Lymphom-Gruppe (Kovalchuk et al., 2000; Herold et al., 2013)

.

1.4. Fragestellung

An diesem Mausmodell wurden Therapieversuche mit Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Ak durchgeführt, bei denen ein verlängertes Gesamtüberleben bei der Gruppe zu beobachten war, nachdem sie beide Antikörper erhalten hatten (Ahmetlic, 2018). Sowohl die Rolle von Immunkontrollpunkten auf NK-Zellen als auch die Auswirkungen der Behandlung mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren auf die NK-Zellen sind noch weitestgehend unerforscht. So konnte man zwar eine PD-1-Expression auf NK-Zellen von Patienten mit multiplem Myelom entdecken, und auch über eine CTLA-4-Expression auf intratumoralen NK-Zellen wurde berichtet (Benson et al., 2010; Stojanovic et al., 2014), aber es ist noch nicht viel bekannt darüber, welche Rolle diese bei der Tumorentwicklung spielen. Es wurde bisher viel über die Auswirkungen der Behandlung mit Kontrollpunkt-Inhibitoren auf T-Zellen geforscht, allerdings stellen sich bislang noch folgende Fragen: Exprimieren die NK-Zellen in *c-MYC*-Mäusen, ähnlich wie die T-Zellen, PD-1 und CTLA-4? Wenn dies der Fall ist, welchen Effekt hat eine Blockade dieser Rezeptoren auf die NK-Zellen und welchen Beitrag leisten sie in der Behandlung zur Verlängerung des Gesamtüberlebens?

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die Therapie mit Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Ak IFN- γ abhängig ist, sodass bei einer Depletion dieses Zytokins der therapeutische Effekt aufgehoben ist (Ahmetlic, 2018) In welchen Zellen wird das IFN- γ , das für den Therapieerfolg so essenziell ist, exprimiert? Wenn es von NK-Zellen stammen sollte, ist es die Folge einer indirekten Aktivierung durch Blockade der inhibitorischen Aktivität der regulatorischen T-Zellen oder wirkt diese Behandlung direkt auf die NK-Zellen und fördert deren IFN- γ -Expression?

Ein weiterer Ansatz in der Behandlung der Lymphome der *c-MYC*-Mäuse ist die Kombination von Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Ak mit einem adoptiven Transfer von tumorspezifischen Th1-Zellen. Dies wirft die Frage auf, ob es möglich ist, spezifische Th1-Zellen zu generieren, ohne ein für den Tumor spezifisches Antigen zu kennen. Darüber hinaus wäre es wichtig zu wissen, welchen Effekt die alleinige Therapie mit den generierten spezifischen Th1-Zellen hat und vor allem, ob die Th1-Zellen im Tumorgebiet ankommen und aktiviert werden oder ob sie z.B. in regulatorische T-Zellen umgewandelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der NK-Zellen in der Therapie mit Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Ak in einem endogenen Lymphommodell zu analysieren sowie einen Ansatz mit tumorspezifischen Th1-Zellen in der Lymphomtherapie zu erforschen.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller	
Bestrahlungsanlage HWM-D-200 (Strahlungsquelle: ¹³⁷ Caesium)	GammaCell40, Ottawa (Kanada)	
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau	
Durchflusszytometer LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg	
<i>EasySep</i> TM Magnet	STEMCELL Technologies, Köln	
Einmalpipetten 5/10/25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen	
Einmalzählkammer C-Chip	Peqlab, Erlangen	
ELISA-Lesegerät, Sunrise	Tecan, Crailsheim	
ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden	
FACS-Röhrchen, klein	Greiner bio-one, Frickenhausen	
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden	
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Heidelberg	
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	
Mehrlochplatten	Becton Dickinson, Heidelberg	
Milli-Q® - Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach	
Pipetten Eppendorf/Gilson	Zentrallager Neuherberg	Helmholtz-Zentrum,
Pipettenspitzen Gilson/Greiner	Zentrallager Neuherberg	Helmholtz-Zentrum,
Plattenzentrifuge Labofuge 400	Heraeus Instruments, Hanau	
Reaktionsgefäße 1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg	
Röhrchen 15/20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg	
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen	
Wasserbad	Memmert, Schwabach	
Zellsiebe	Becton Dickinson, Heidelberg	
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau	

2.1.2. Reagenzien, Chemikalien, Zytokine

Tabelle 2: Reagenzien, Chemikalien, Zytokine

Reagenz/Chemikalie/Zytokin	Hersteller
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt
CpG Oligonukleotide 1668	Metabion, Planegg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
FKS	Life Technologies, Frankfurt
<i>FoxP3 Staining Buffer Set</i>	eBioscience, Frankfurt
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Interleukin-2 (IL-2)	Peptotech, Hamburg
Interleukin-15 (IL-15)	Peptotech, Hamburg
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Life Technologies, Frankfurt
<i>Live/Dead® Fixable Blue-Lösung</i>	Life Technologies, Frankfurt
<i>MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)</i>	Life Technologies, Frankfurt
2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Frankfurt
Monensin	BD Biosciences Pharmingen, San Diego (USA)
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Life Technologies, Frankfurt
<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
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Life Technologies, Frankfurt
Proleukin® S (humanes IL-2)	Novartis, Nürnberg
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640) ohne L-Glutamin</i>	Life Technologies, Frankfurt
Schwefelsäure, 1M	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Life Technologies, Frankfurt

Trypsin-EDTA	Life Technologies, Frankfurt
Tween 20	ICN, Eschwege

2.1.3. Medien und Puffer

Tabelle 3: Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Basismedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 % hitzeinaktiviertes FKS 100 U/ml Penicillin-G-Natrium 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 5 ml Nicht-essenzielle Aminosäuren (100X) 50 µM 2-Mercaptoethanol
T-/NK-Zell-Medium	Basismedium mit 10 % hitzeinaktiviertes FKS
Einfriermedium	90 % hitzeinaktiviertes FKS 10 % DMSO
Easysep-Puffer	PBS 2 % hitzeinaktiviertes FKS 1 mM EDTA
FACS-Puffer	PBS 2 % hitzeinaktiviertes FKS 2 mM EDTA 1 % NaN ₃
MACS-Puffer	PBS 10 % hitzeinaktiviertes FKS 2 mM Na-EDTA
Waschpuffer (ELISA)	PBS 0,05 % Tween 20
Erythrozyten-Lysepuffer 10X	8,25 g NH ₄ Cl 1 g K ₂ HCO ₃ 37 mg Na-EDTA

ad 100 ml H₂O
pH 7,4

2.1.4. Kits

Tabelle 4: Kits

Kit	Hersteller
Mouse Th1/Th2 ELISA Ready-SET-Go! [®]	eBioscience, Frankfurt
EasySep™ Mouse CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	STEMCELL Technologies, Köln
EasySep™ Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit	STEMCELL Technologies, Köln
NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.5 Antikörper

- Unmarkierte Antikörper für *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuche

Tabelle 5: unmarkierte Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Hersteller
PD-1	J43	Armenischer Hamster, IgG	BioXCell
CTLA-4	UC10-4B9	Armenischer Hamster, IgG	BioLegend
Fc-Rezeptor (CD16, CD32)	4G8	Ratte, IgG2b	AG Kremmer
IL-4	11B11	Ratte, IgG1, κ	AG Kremmer
IFN-γ	XMG1.2	Ratte, IgG1, κ	AG Kremmer

- Fluoreszenz-markierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Fluoreszenz-markierte Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Hersteller
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
CD8a	53-6.7	Ratte IgG2a	eBioscience
CD19	1D3	Ratte IgG2a	BD Horizon
CD28	37.51	Goldener syrischer Hamster IgG	eBioscience
CD107a	1D4B	Ratte IgG2b, κ	BioLegend

CTLA-4	UC10-4B9	Armenischer Hamster IgG	BioLegend
Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
Granzym A	GzA-3G8.5	Maus, IgG2b, κ	eBioscience
Granzym B	NGZB	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
IFN- γ	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	BioLegend
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b	BD Pharmingen
Ki-67	SolA15	Ratte IgG2a, κ	eBioscience
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	BD Pharmingen
PD-1	RMP1-30	Ratte IgG2b, κ	eBioscience
PD-L1	MIH6	Ratte IgG2a	AbD Serotec
TNF	MP6-XT22	Ratte IgG1, κ	eBioscience

2.1.5. Mäuse

Die Regierung von Oberbayern hat alle Tierversuche, die in dieser Arbeit beschrieben werden, genehmigt. Die Versuche an den Mäusen wurden gemäß den entsprechenden gesetzlichen Bedingungen durchgeführt.

Für die Durchführung der Versuche wurden *c-MYC*-transgene Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund verwendet, wobei die Expression des humanen *c-MYC*-Onkogens unter der Kontrolle des Enhancers für die $Ig\lambda$ -Kette steht (Kovalchuk et al., 2000).

Diese genetische Veränderung führt dazu, dass die Mäuse nach 7-9 Wochen ein B-Zell-Lymphom entwickeln, welches dem Burkitt-Lymphom des Menschen ähnelt. Dabei manifestiert sich diese Erkrankung vor allem in der Milz sowie in den Lymphknoten.

Als Versuchskontrolle dienten hierbei C57BL/6-Mäuse, die in der fortlaufenden Arbeit als Wildtyp (wt) bezeichnet sind.

Alle Mäuse wurden in der Tierhaltung des Helmholtz-Zentrums in Großhadern unter spezifiziert Pathogen-freien Bedingungen gehalten.

2.1.6. Software

Tabelle 7: Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva™	Becton Dickinson
FlowJo	Treestar Inc., Ashland, OR (USA)
GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla, CA (USA)
Magellan™ 7.2	Tecan, Crailsheim
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, CA (USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Zelllinien und Zellkulturbedingungen

Für die Durchführung einiger Versuche war der Gebrauch verschiedener Zelllinien notwendig. Diese wurden nach dem Auftauen in Basismedium resuspendiert und in einem Brutschrank von Heraeus Instruments bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten.

Dabei wurden folgende Zelllinien verwendet:

Tabelle 8: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
291	B-Zell-Lymphomlinie aus kranken c-MYC-Mäusen	im Labor R. Mocikat generiert
YAC-I	T-Zell-Lymphomlinie mit niedriger MHC-I-Expression	[Kiessling et al., 1975; Piontek et al., 1985]
B16F0	Melanom-Zelllinie	[Fidler 1975; Nicolson et al., 1978]

Um die Zellen in einem guten Zustand zu halten, wurden diese alle 2 Tage geteilt. Da es sich bei den B16F0-Zellen um adhärent wachsende Zellen handelt, mussten diese mithilfe von Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst werden. Von den gelösten Melanomzellen wurden 90 % der Zellen verworfen und die restlichen 10 % in Basismedium aufgenommen.

2.2.2. Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen

An die Euthanasie der Mäuse durch CO₂ schloss sich direkt die Entnahme der Milz sowie der submandibulären, axillären und inguinalen Lymphknoten an. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurden die Organe durch ein Zellsieb in Medium gedrückt.

Zur weiteren Aufreinigung der Zellen wurde die Zellsuspension mit 1X Erythrozyten-Lysepuffer versetzt und nach einer kurzen Inkubation mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Einzelzählkammern bestimmt.

2.2.3. Durchflusszytometrie

Um verschiedene Oberflächenstrukturen unterschiedlicher Zellpopulationen mithilfe der Durchflusszytometrie zu untersuchen, wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen in 50 μ l PBS-Lösung, die mehrere Fluoreszenz-markierte Antikörper enthielt, resuspendiert und 30 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Es wurde dabei auch die *Live/Dead® Fixable Blue*-Lösung verwendet, welche durch Binden an freie Amine im Zellinneren tote Zellen anfärbt, sodass im Nachhinein bei der Auswertung die lebenden von den toten Zellen unterschieden werden können.

Zur Detektion intrazellulärer Zytokine (IFN- γ , TNF und IL-10) oder auch der Granzyme A und B sowie Perforin war es notwendig, die Zellen für 4 Stunden im Brutschrank mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A (Verdünnung jeweils 1:1000) in T-/NK-Zell-Medium zu stimulieren.

Im Anschluss daran wurden auch hier Oberflächenantigene gefärbt und mittels des *Foxp3 Staining Buffer Set* fixiert (mindestens 30 Minuten Inkubation bei 4 °C). Um nun die intrazellulären Zielstrukturen färben zu können, war es erforderlich, die Zellmembran zu permeabilisieren (1X *Permeabilization Buffer*) und die Zellen hierzu in 50 μ l 1X Permeabilisierungspuffer mit den dazugehörigen Fluoreszenz-markierten Antikörpern aufzunehmen. Nach der Inkubation bei 4 °C (40 Minuten) wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert.

Einen Spezialfall stellte die Färbung von Granzym A dar, denn der Fluoreszenz-markierte Antikörper ist ein Maus-Antikörper, weswegen es nötig war, die Zellen vor der intrazellulären Färbung mit einem Fc-Rezeptor-blockierenden Antikörper für 20 Minuten zu inkubieren. Dadurch wird verhindert, dass der Maus-Antikörper durch unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren der Mauszellen das Ergebnis verfälscht.

Die angefärbten Zellen wurden daraufhin am *BD LSR II Flow Cytometer* durchflusszytometrisch gemessen. Die dadurch erhaltenen Daten wurden mit der FlowJo-Software analysiert.

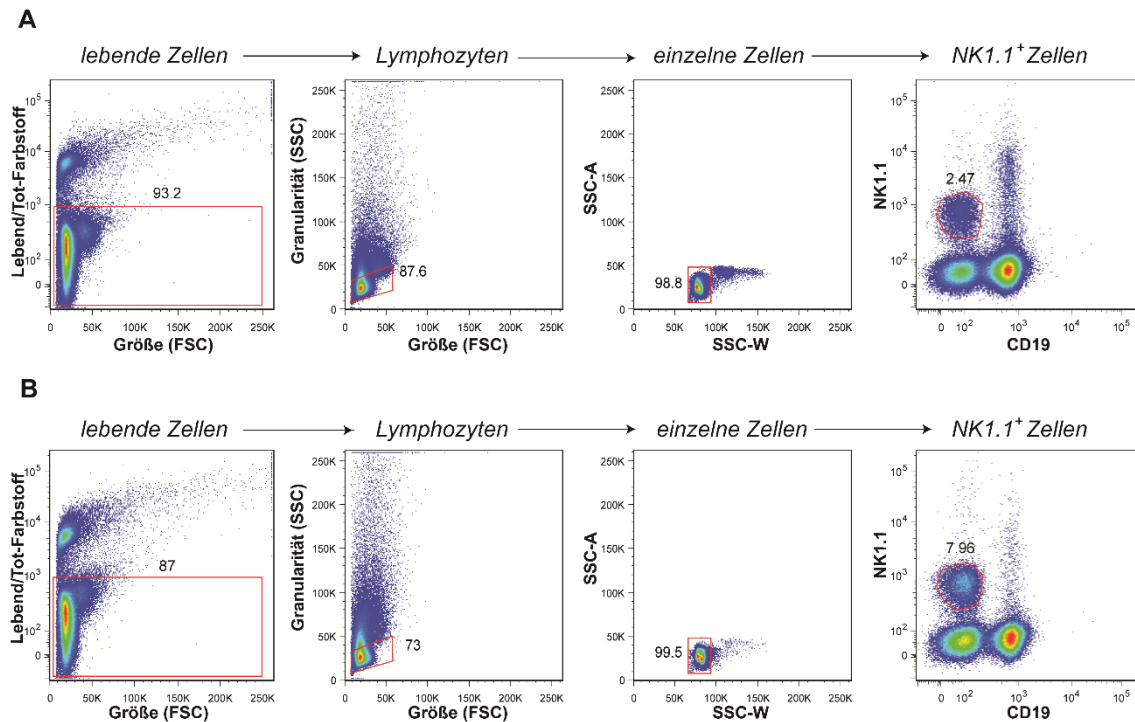


Abbildung 1: Repräsentatives Beispiel der Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellen aus der Milz einer wt-Maus (A) und der einer *c-MYC*-Maus, die mit Kontrollpunkt-Inhibitoren behandelt wurde und noch klinisch gesund war (B). Es erfolgte immer zuerst die Analyse der wt-Proben; die Gates wurden daraufhin auf die anderen Daten übertragen.

2.2.4. CD107a-Degranulierungs-Versuch

In einem weiteren Versuch wurde die Fähigkeit der NK-Zellen zur Degranulation untersucht. Das Vorgehen erfolgte nach etablierten Protokollen. Dabei wurden 1×10^6 Milzzellen mit 1×10^6 YAC-I-Zellen, IL-15 (25 ng/ml), Brefeldin A und Monensin (jeweils 1:500 verdünnt) in T-/NK-Zell-Medium für 5 Stunden im Brutschrank koinkubiert. Zusätzlich wurde schon zu Beginn der CD107a-spezifische, FITC-markierte Antikörper hinzugegeben.

Als Kontrolle diente dabei immer ein Ansatz, der zwar das Stimulationsmedium, aber keine YAC-I-Zellen enthielt.

Anschließend wurde die Oberfläche gefärbt (30 Minuten Inkubation bei 4 °C) und mit 4% Formaldehyd fixiert (30 Minuten Inkubation bei 4 °C). Danach wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen.

2.2.5. MACS-Zell-Separation

Die Isolierung der NK-Zellen aus wt-Milzen erfolgte magnetisch per Negativselektion mithilfe des *NK Cell Isolation Kit* (siehe 2.1.4). Die Splenozyten wurden zuerst mit biotinylierten Antikörpern gegen Antigene der unerwünschten Zellpopulationen, dann mit *Anti-Biotin-Microbeads* koinkubiert. Anschließend erfolgte die magnetische Separation.

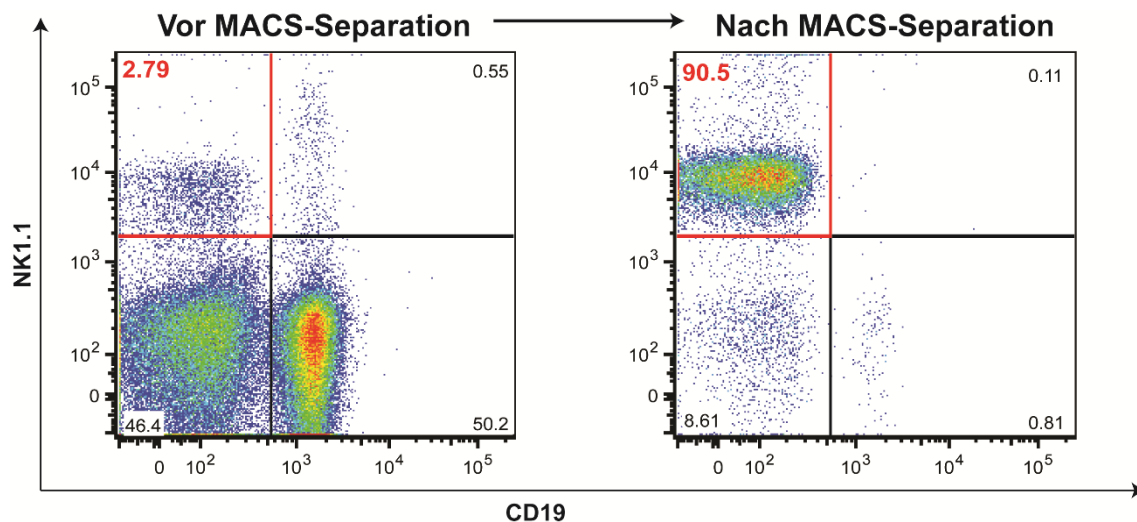


Abbildung 2: Reinheit der NK-Zellen nach magnetischer Separierung mithilfe des *NK Cell Isolation Kits*. Der Anteil der NK-Zellen an der Gesamtzellzahl stieg in diesem Fall von 2,79 % auf über 90 % an. In der Regel konnte eine Reinheit zwischen 85-95 % erreicht werden.

2.2.6. In-vitro-Stimulation mit anti-PD-1-/anti-CTLA-4-AK

Es sollte untersucht werden, ob die Therapie mit den beiden Kontrollpunkt-Inhibitoren Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-AK einen direkten Effekt auf die NK-Zell-Zytotoxizität hat.

Dafür wurden 2×10^5 magnetisch separierte NK-Zellen mit 2×10^5 YAC-I-Zellen, 25 ng/ml IL-15 (Verdünnung 1:500), Brefeldin A (Verdünnung 1:500) und den blockierenden Antikörpern Anti-PD-1/ Anti-CTLA-4 (jeweils 10 µg/ml) in einer 96-Loch-Rundbodenplatte stimuliert. Dabei wurden 5 verschiedene Ansätze parallel

durchgeführt; im ersten Ansatz erfolgte eine Kontrollpunktblockade durch PD-1 und CTLA-4, während in den anderen entweder nur einer der beiden Antikörper oder gar keiner verwendet wurde. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne YAC-I-Zellen, die normalerweise als NK-Zell-spezifischer Stimulus fungieren.

Die Stimulation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ über 3, 25 und 45 Stunden. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, auf Oberflächenantigene gefärbt, mit dem *Foxp3 Staining Buffer Set* fixiert, permeabilisiert und intrazellulär auf IFN- γ gefärbt (siehe 2.2.3). Im Anschluss wurden die Ansätze im Durchflusszytometer vermessen und mithilfe der FlowJo-Software ausgewertet.

2.2.7. Generieren von 291-spezifischen Th1-Zellen

***EasySep*-Zell-Separation**

Die CD4⁺CD25⁻ T-Zellen für die Th1-Kultur wurden aus Milzen von WT-Mäusen gewonnen. Nach der Erythrozytenlyse wurde zur Isolierung der CD4⁺ T-Zellen das *EasySep™ Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit* (siehe 2.2.4) verwendet, welches die CD4⁺ T-Zellen durch Negativselektion von den restlichen Zellen trennt. Die Isolierung erfolgte dabei gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Um zu vermeiden, dass regulatorische T-Zellen mit in die Kultur aufgenommen werden, wurden diese durch das *EasySep™ Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit* (siehe 2.1.4) per Positivselektion herausgefiltert. CD25 ist auch bekannt als die α -Kette des IL-2-Rezeptors und wird auf aktivierten T-Lymphozyten sowie konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen exprimiert. Auch hier erfolgte die Separation gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Dabei konnte eine Reinheit der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von über 90 % erreicht werden.

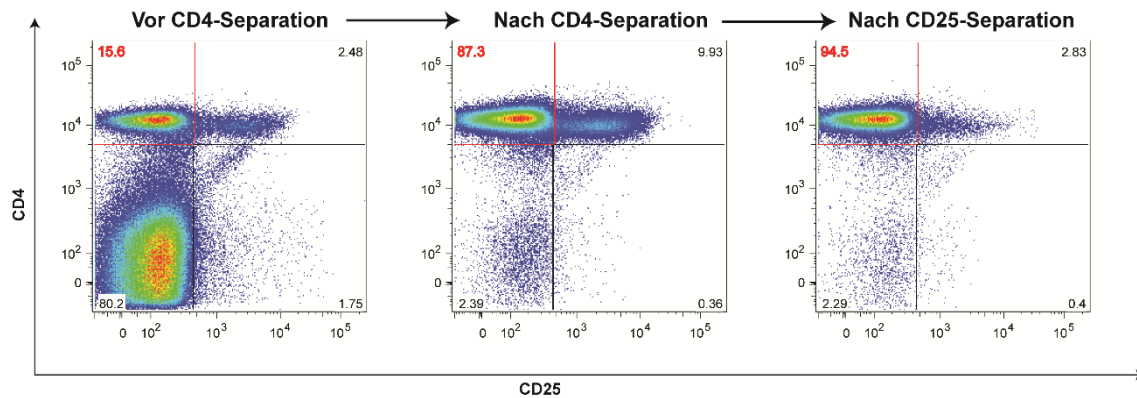


Abbildung 3: Repräsentative Darstellung der Reinheit der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. Während der Anteil der CD4⁺ T-Zellen vor Separation nur 18 % betrug, war er nach der Negativselektion der CD4⁺ T-Zellen bei über 95 %. Allerdings war dabei auch der Anteil der CD25⁺ Zellen recht hoch, was sich aber durch die Verwendung des *EasySep™ Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit* beheben ließ, sodass sich am Schluss eine Reinheit der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von 94,5 % ergab.

Th1-Zell-Kultur

Mit dem Ziel, 291-spezifische Th1-Zellen zu generieren, wurden am Tag -1 291-Zellen, die stetig im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert wurden, in T-Zell-Medium resuspendiert und mit 100 Gray bestrahlt. Parallel dazu wurde die Milz einer WT-Maus entnommen, um daraus antigenpräsentierende Zellen (APZ) zu gewinnen. Diese sollten später in der Kokultur die Antigene der 291-Zellen erkennen und präsentieren, aber selbst nicht mehr proliferieren können. Aus diesem Grund wurden diese, ebenfalls in T-Zell-Medium resuspendiert, mit 30 Gray bestrahlt.

Anschließend wurden in einer 24-Loch-Platte pro Kavität 1 x 10⁶ APZ und 3 x 10⁵ 291-Zellen in insgesamt 1,5 ml T-Zell-Medium kokultiviert. Die Brutschrankbedingungen waren dabei stets dieselben (37 °C, 5 % CO₂).

Um jetzt schon die Entwicklung der am nächsten Tag hinzukommenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in eine Th1-Richtung zu lenken, wurden zusätzlich noch 10 µg/ml Anti-IL-4-Ak - zur Suppression einer Th2-Zell-Entwicklung - sowie 0,3 µM CpG-Oligonukleotide 1668, TLR-9-Agonisten, in jede Kavität hinzugegeben.

Die Kokultur wurde am Tag 0 noch durch die magnetisch separierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ergänzt, von denen 2 x 10⁵ (in jeweils 500 µl T-Zell-Medium) pro Kavität hinzugefügt wurden. Zusätzlich wurden 5 U/ml IL-2 dazugegeben.

Am Tag 3 wurden dann jeweils 2 Kavitäten der 24-Loch-Platte zu einer Kavität einer 6-Loch-Platte vereint. Dabei wurde jede Kavität mit 1 ml T-Zell-Medium gespült, um keine Zellen zu verlieren, sodass letztendlich in jeder Vertiefung die Zellen in 6 ml T-Zell-Medium kokultiviert wurden. Anschließend wurden noch 50 U/ml IL-2 sowie 0,3 μ M CpG-Oligonukleotide 1668 hinzugegeben.

Nach weiteren 3 Tagen in Kultur wurden die Zellen an Tag 6 geerntet und gezählt. Des Weiteren wurde der Kulturüberstand entnommen, eingefroren und später auf IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 untersucht.

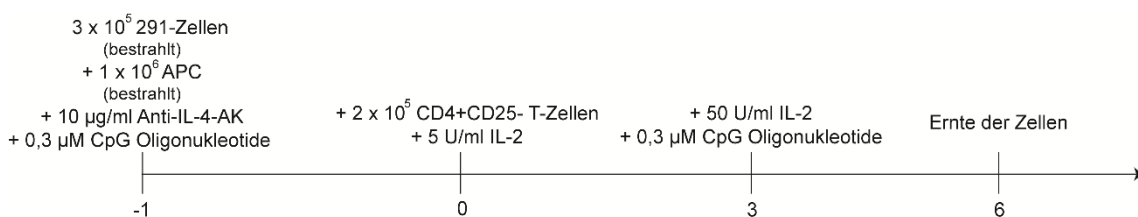


Abbildung 4: Etabliertes Protokoll zur Generierung 291-spezifischer Th1-Zellen

2.2.8. T-Zell-Stimulation

Um zu zeigen, dass die Th1-Zellen, die durch die Kultur generiert wurden, 291-spezifisch sind, wurden sie an Tag 6 restimuliert. Hierzu wurden 2×10^5 Th1-Zellen aus der Kultur mit 1×10^6 bestrahlten APZ (30 Gray) und 3×10^5 bestrahlten 291-Zellen (100 Gray) für 24 Stunden in T-Zell-Medium in 96 Well-Rundbodenplatten kokubiert. Als Kontrolle für die Tumorspezifität diente ein Ansatz, in dem die Th1-Zellen, anstatt mit 291-Zellen, mit B16F0-Zellen kokubiert wurden. Im Anschluss an die 24 Stunden wurden die Überstände der jeweiligen Ansätze abgenommen und auf IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 untersucht.

2.2.9. Quantifizierung von Zytokinen

Die Quantifizierung von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 in Kulturüberständen (siehe Abschnitt 2.2.7) oder Überständen von T-Zell-Stimulationen (siehe Abschnitt 2.2.8) erfolgte mittels des *Mouse Th1/Th2 ELISA Ready-SET-Go!*[®]- ELISA-Kits. Das Vorgehen richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.10. Therapieversuche

Injektion von Kontrollpunkt-Inhibitoren

Um den therapeutischen Erfolg der Kontrollpunkt-Inhibitoren zu überprüfen, wurden klinisch noch gesunden *c-MYC*-Mäusen an den Tagen 60, 70, 80 und 90 jeweils 100 µg anti-PD-1- und anti-CTLA-4-Antikörper intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend wurde dann die Entwicklung der Tumoren beobachtet. Bei Anzeichen von Symptomen der Tumorerkrankung wurden die Tiere gemäß den Tierschutzrichtlinien abgetötet.

Zur Analyse der Auswirkung der Therapie auf die NK-Zellen in der Frühphase der Erkrankung wurden *c-MYC*-Mäuse zweimalig an den Tagen 60 und 70 mit den blockierenden Antikörpern anti-PD-1 und anti-CTLA-4 (jeweils 100 µg) behandelt. Auch hier erfolgte die Applikation intraperitoneal. An Tag 73 wurden die Mäuse abgetötet, Milz und LK wurden entnommen und zusammen mit den Organen unbehandelter *c-MYC*-Mäuse, die in den Versuchen als Vergleichsgruppe dienten, auf unterschiedliche Parameter (z.B. Zellzahl) untersucht.

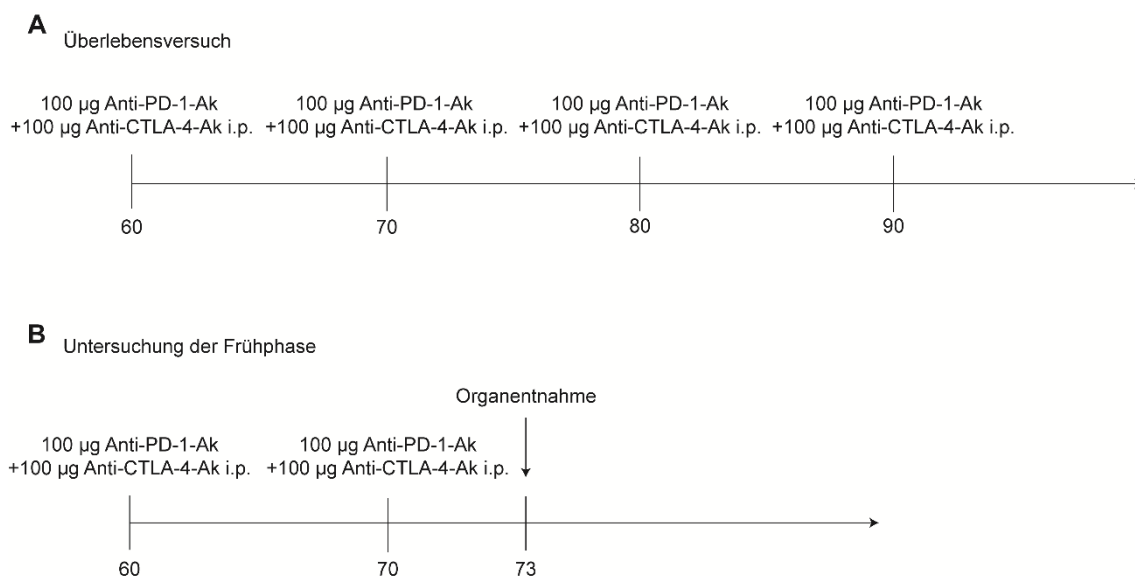


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Behandlungsversuche im Rahmen der Untersuchung des Überlebens (A) sowie der Analyse der NK-Zellen während der Frühphase der Therapie (B).

Injektion von 291-spezifischen Th1-Zellen

Klinisch noch gesunden *c-MYC*-Mäusen wurden jeweils 1×10^6 291-spezifische Th1-Zellen intravenös (i.v.) sowie 24×10^3 Internationale Einheiten (IU) Proleukin

intraperitoneal (i.p.) an den Tagen 40, 47, 54 und 61 appliziert. Der ersten Injektion an Tag 40 folgten 4 weitere Injektionen mit 24×10^3 IU Proleukin (i.p.) an den Tagen 41, 42, 43 und 44.

Im Anschluss daran wurde auch hier der Verlauf der Erkrankung beobachtet. Sobald eine Maus Lymphome entwickelte, wurde sie, den Tierschutzlinien entsprechend, abgetötet.

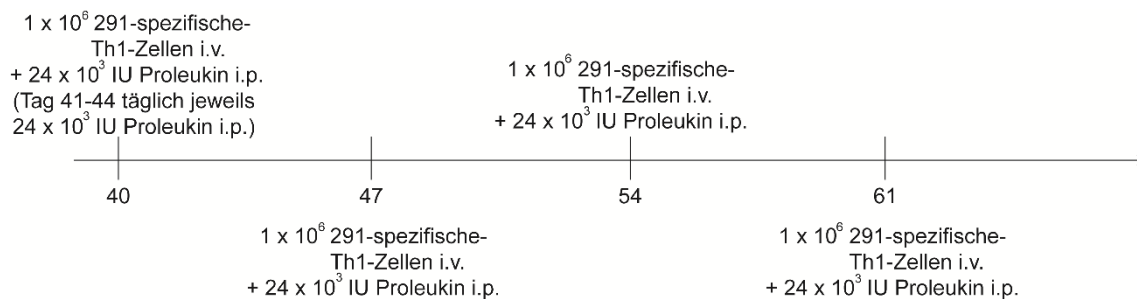


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Behandlung mit Th1-Zellen und Proleukin.

2.2.11. Statistische Auswertung

Um die erhobenen Daten statistisch zu analysieren, wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Dabei erfolgte die Darstellung der berechneten Signifikanzwerte durch ein ($p < 0,05$), zwei ($p < 0,01$) oder drei Sternchen ($p < 0,001$). Unterschieden sich die zu vergleichenden Daten nicht signifikant, so wurde dies entweder als „ns“ gekennzeichnet oder nicht extra markiert.

Statistische Ausreißer innerhalb einer Stichprobe wurden mithilfe des Ausreißertests nach Grubbs detektiert. Durch den Student's t-Test wurden zwei unabhängige Gruppen miteinander verglichen. Wenn beide Gruppen nicht die gleiche Varianz (F-Test) aufwiesen, wurde dies durch die Welch-Korrektur ausgeglichen. Bei allen Testverfahren wurde von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen. Der Erfolg der Therapieveruche wurde am Überleben der Mäuse gemessen, dabei wurde der Log-Rank-Test angewendet, welcher Unterschiede zwischen den Kaplan-Meier-Überlebenskurven berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Einfluss der Kontrollpunktblockade auf die NK-Zellen

Für die Untersuchung der NK-Zellen während der Frühphase der Erkrankung unter der Therapie mit Kontrollpunkt-Inhibitoren wurden *c-MYC*-Mäusen zweimal jeweils 100 µg anti-PD-1- und 100 µg anti-CTLA-4-Antikörper intraperitoneal injiziert (Tag 60 und 70 nach Geburt). Im Anschluss daran wurden die Mäuse in noch klinisch inapparentem Zustand an Tag 73 abgetötet. Milz und LK, Manifestationsorte des B-Zell-Lymphoms, wurden entnommen, eine Einzelzellsuspension hergestellt und die darin enthaltenen NK-Zellen auf verschiedene Parameter untersucht.

3.1.1. NK-Zell-Zahl in Milz und LK

Es ist bekannt, dass eine erhöhte Anzahl intratumoraler NK-Zellen bei einer Vielzahl von Tumoren mit einer günstigeren Prognose einhergeht. So wurde dieser Zusammenhang beim humanen Colon- (Coca et al., 1997) und Lungenkarzinom (Villegas et al., 2002) festgestellt.

Aus diesem Grund wurde die NK-Zell-Zahl in Milz und LK behandelter klinisch inapparenter (behandelte *c-MYC_{ina}*), unbehandelter klinisch inapparenter (unbehandelte *c-MYC_{ina}*) sowie klinisch apparenter *c-MYC*-Mäuse (*c-MYC_a*) und von wt-Mäusen bestimmt. Dabei war die unbehandelte gesunde Kontrollgruppe in demselben Alter wie die behandelte Gruppe.

In der Milz behandelter *c-MYC*-Mäuse kam es zu einem relativen und absoluten Anstieg der NK-Zellen im Vergleich zur unbehandelten gesunden Kontrolle (Abb. 7A). Der relative Anteil stieg im Schnitt von 4,8 % in der Kontrollgruppe auf 6,0 % in der Therapiegruppe. Noch deutlicher war der Unterschied gegenüber der Gruppe der kranken Mäuse (0,8 %), was auf die vermehrte Zahl der Lymphomzellen zurückzuführen ist. In den Lymphknoten ist der Anteil an NK-Zellen relativ gering, dennoch konnte auch hier ein Anstieg des relativen Anteils der NK-Zellen in der Therapiegruppe beobachtet werden (Abb. 7B; 1,0 % im Vergleich zu 0,6 % der unbehandelten Kontrollgruppe). Allerdings war keine Aussage über die absolute

Zellzahl zu treffen, da die Menge an Lymphknoten, die man bei der Organentnahme präparierte, stark variierte.

Um Hinweise auf eine gesteigerte Proliferation der NK-Zellen zu finden, wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil der Ki-67⁺-NK-Zellen bestimmt. Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, welches ausschließlich während der aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird (Scholzen & Gerdes, 2000) und daher als Proliferationsmarker dient.

Der Anteil Ki-67⁺-NK-Zellen der behandelten und der unbehandelten Gruppe unterschied sich allerdings weder in Milz noch in LK deutlich (Abb. 7C), sodass die Ursache für die gesteigerte NK-Zell-Zahl in einer vermehrten Migration der NK-Zellen in das Tumorgebiet liegen könnte.

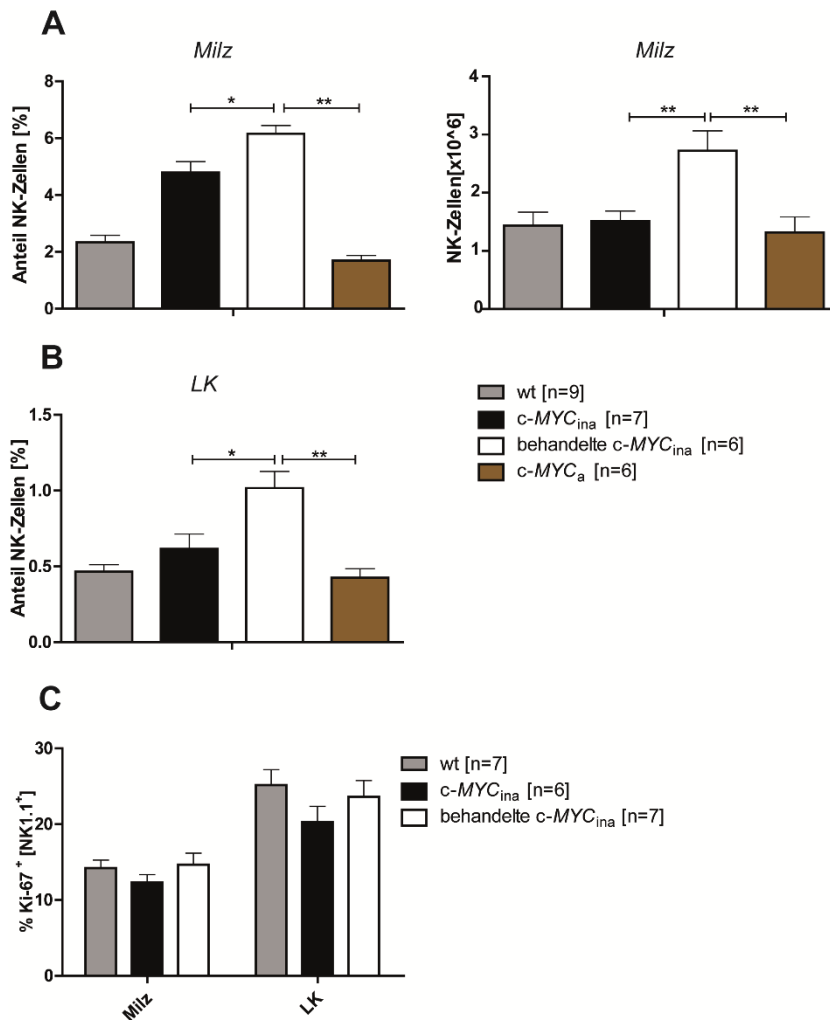


Abbildung 7: Darstellung der NK-Zell-Zahl relativ und absolut in der Milz (A), relativ in den LK (B) sowie der Anteil der Ki-67⁺-NK-Zellen in Milz und LK (C).

3.1.2. IFN- γ -Expression in NK-Zellen

IFN- γ , Effektorzytokin der NK-Zellen, spielt eine wichtige Rolle bei der NK-Zell-vermittelten Antitumorantwort. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass das IFN- γ der NK-Zellen im Zusammenspiel mit den DZ eine potente CTL-Antwort sowie eine Gedächtnisantwort induzieren kann (Adam et al., 2005).

IFN- γ hat zudem eine relevante Bedeutung hinsichtlich des Ansprechens von Tumortherapien. So konnte der Therapieerfolg, der durch Blockade von PD-1 und CTLA-4 erzielt wurde, durch IFN- γ -Depletion rückgängig gemacht werden (Ahmetlic, 2018).

Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass die Therapie eine Aktivierung des Immunsystems bewirkt, die mit einer erhöhten IFN- γ -Expression und damit einer verstärkten Tumorbekämpfung einhergeht.

Daher wurden die NK-Zellen behandelter und unbehandelter *c-MYC*-Mäuse sowie von *wt*-Mäusen auf ihre IFN- γ Expression untersucht. Um IFN- γ in NK-Zellen zu detektieren, wurden diese mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A stimuliert. Im Anschluss daran erfolgten der Reihe nach die Färbung von Oberflächenstrukturen, das Fixieren derselben, die Permeabilisierung der Zellmembran und die intrazelluläre Färbung von IFN- γ . Nach dem Vermessen am Durchflusszytometer wurden die Daten mit der FlowJo-Software ausgewertet und die NK-Zell-Population, wie in 2.2.3 abgebildet, seligiert und auf IFN- γ -Expression untersucht. Da die Stärke der Stimulation stark variierte, wurde die MFI von IFN- γ der (un)behandelten Maus immer an der MFI von IFN- γ einer *wt*-Maus normiert.

Dabei stellte sich heraus, dass die intratumoralen NK-Zellen der behandelten Mäuse (weißer Balken, Abb. 8B) eine wesentlich höhere IFN- γ -Expression aufwiesen als die der unbehandelten Mäuse (schwarzer Balken, Abb. 8B). Während dieser Effekt in den NK-Zellen der Milz deutlich und signifikant war ($p < 0,01$), konnte in den NK-Zellen der LK dagegen nur eine tendenzielle Erhöhung von IFN- γ detektiert werden, was vor allem an der hohen Streuung der IFN- γ -Expression der NK-Zellen behandelter Mäuse lag. In Abbildung 8A ist beispielhaft ein Histogramm einer FACS-Färbung dargelegt, an dem einerseits die ausgeprägte Differenz zur unstimulierten Kontrolle (grau), aber auch ein

sichtbarer Unterschied zwischen der IFN- γ -Expression der behandelten Maus (blau) und der wt-Maus (rot) festzuhalten ist.

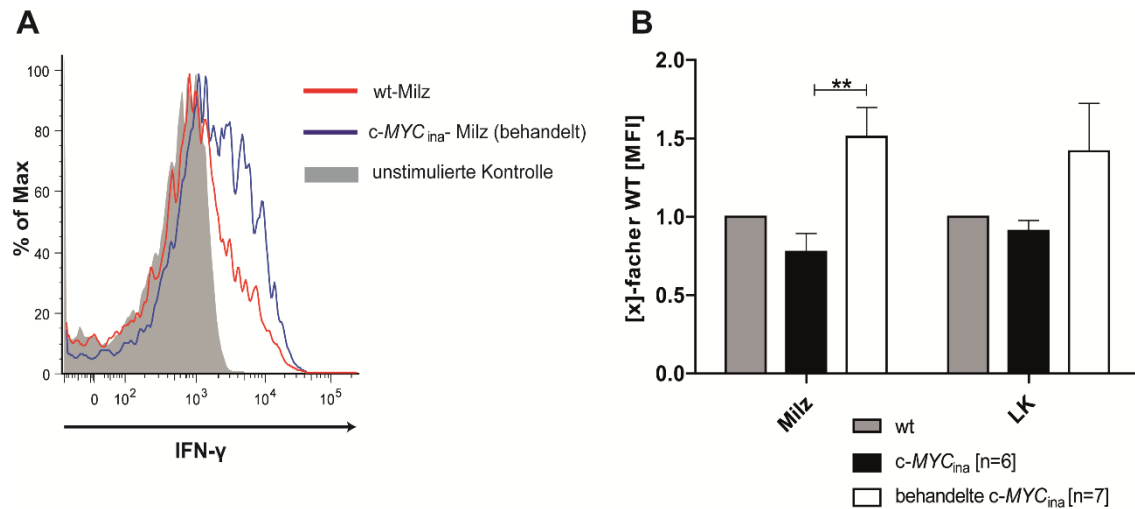


Abbildung 8: Intrazelluläre IFN- γ -Expression von NK-Zellen nach 4 Stunden Stimulation mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A: repräsentative Histogrammdarstellung; B: Vergleich der IFN- γ Expression von NK-Zellen in Milz und Lk (un)behandelter c-MYC-Mäuse; die Darstellung der Signifikanz erfolgt durch ein ($p < 0,05$), zwei ($p < 0,01$) oder drei Sternchen ($p < 0,001$).

3.1.3. Zytotoxizitätsparameter

Während von NK-Zellen produziert IFN- γ eine indirekte Verstärkung der Tumorelimination durch Aktivierung von Th1- und CTL's bewirkt, besitzen NK-Zellen auch direkte Mechanismen, um Tumorzellen abzutöten (Smyth et al., 2002).

Bei Aktivierung der NK-Zelle kommt es zu einer Entleerung von Granula, die mit Perforin und den Serinproteasen Granzym A und B angefüllt sind. Perforin bindet an die Zellmembran der Zielzelle und bildet eine Pore, die den Granzymen ermöglicht, in die Zelle einzudringen und die Apoptose einzuleiten (Voskoboinik et al., 2015).

Aus dem Wissen der Relevanz dieser NK-Zell-Effektorfunktion für die Antitumorantwort wurden die NK-Zellen (un)behandelter Mäuse sowie von wt-Mäusen nach vierstündiger Stimulation mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf ihre intrazelluläre Granzym A-, Granzym B- sowie

Perforin-Expression untersucht (Abb. 9A). Wie bei IFN- γ erfolgte dabei ebenfalls eine Normierung der MFI an den Werten der wt-Mäuse.

Während durch die Behandlung keine Erhöhung der Granzym A-Expression in den NK-Zellen zu registrieren war, was vor allem daran liegen könnte, dass Granzym A konstitutiv stark exprimiert wurde (Abb. 9B, 88,8 % Granzym A⁺ NK-Zellen aus der Milz einer wt-Maus), gab es sowohl in Milz als auch LK einen Anstieg an Granzym B. Bei den NK-Zellen aus den LK war der Unterschied in der Granzym B-Expression zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe sogar deutlich signifikant ($p < 0,001$).

Desweiteren bewirkte die Therapie mit den Immunkontrollpunkt-Inhibitoren in den NK-Zellen der Milz eine höhere Perforin-Expression ($p < 0,01$). Während die Steigerung der Granzym B-Expression durch die Behandlung sowohl in Milz als auch in LK zu beobachten war, unterschieden sich die Auswirkungen der Therapie auf die Perforin-Expression zwischen Milz und LK deutlich. So war im LK eine signifikant geringere ($p < 0,001$) Perforin-Expression in der Therapiegruppe festzustellen.

In Abbildung 9B sind die FACS-Bilder einer wt-Maus beispielhaft dargestellt. Dabei kann man auf der linken Seite jeweils den Anteil Granzym A⁺, Granzym B⁺ und Perforin⁺ NK-Zellen sehen, während auf der rechten Seite die jeweilige Kontrollfärbung, nach der das Gate gesetzt wurde, abgebildet ist. Dabei handelt es sich um eine sogenannte FMO-Kontrollfärbung („Fluorescence Minus One“). Wie oben schon kurz beschrieben, wird Granzym A in NK-Zellen wesentlich höher exprimiert als Granzym B (88,0 % vs. 25,2 %), während der Anteil Perforin⁺ NK-Zellen hier bei 49,0 % liegt.

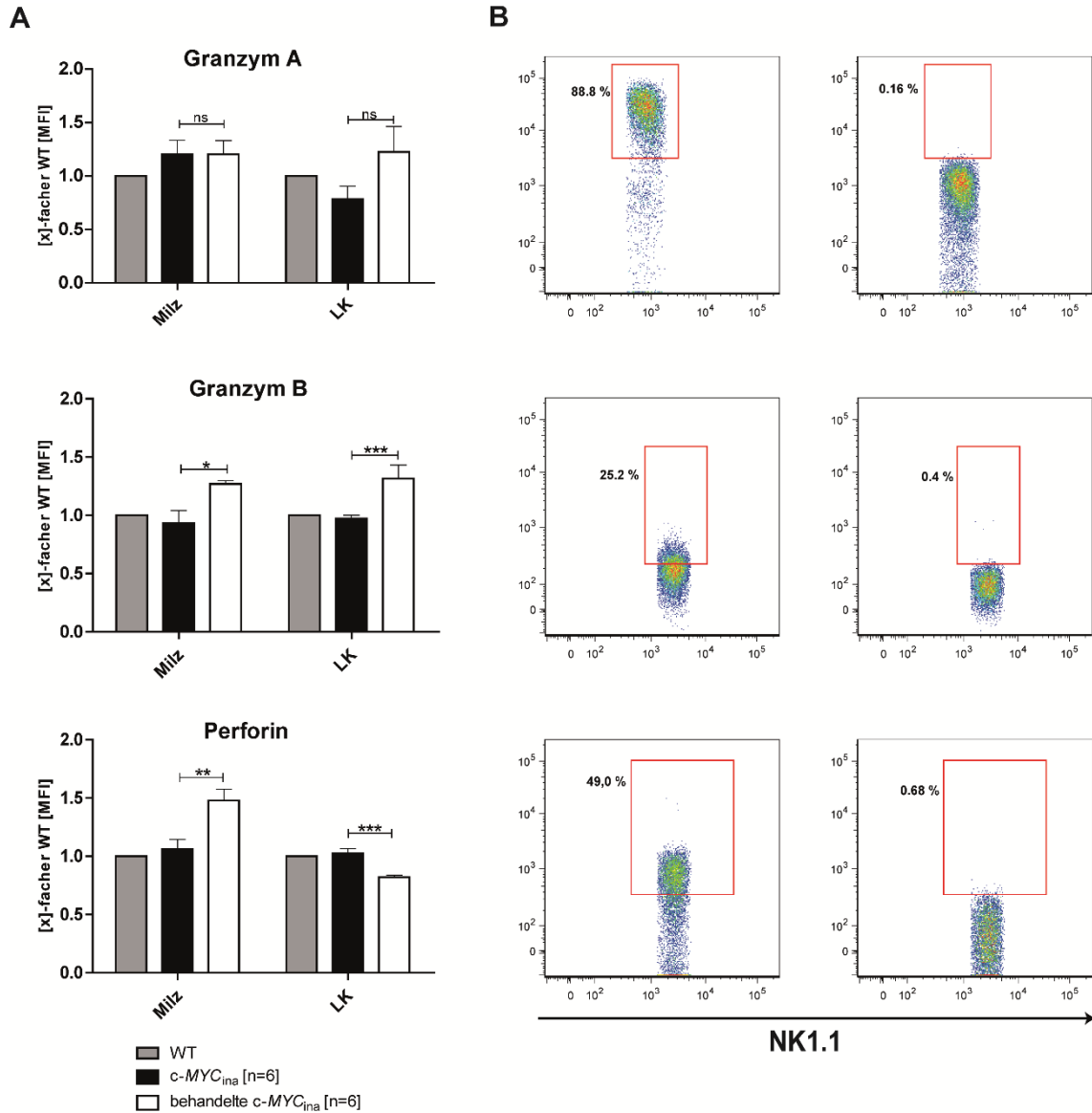


Abbildung 9: Vergleich der Granzym A-, Granzym B- und Perforin-Expression in den NK-Zellen von Milz bzw. LK behandelter und unbehandelter c-MYC-Mäuse nach 4 Stunden Stimulation mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A (A); zur Veranschaulichung Darstellung repräsentativer FACS-Bilder (einer wt-Maus) der verschiedenen Parameter inklusive der Kontrollfärbung (B, rechte Seite der Bilder)

Als ein weiteres Maß für die Zytotoxizität von NK-Zellen gilt die CD107a-Expression. Dabei ist CD107a (LAMP-1) im engeren Sinne ein Degranulationsmarker, denn dieses Protein wird bei Degranulation der mit Granzymen und Perforin angefüllten Granula in die NK-Zellmembran integriert (Alter et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Oberflächenexpression von CD107a mit einem Anstieg der Zytotoxizität einhergeht (Aktas et al., 2009).

Für die Untersuchung der CD107a-Expression wurden die Splenozyten mit YAC-I-Zellen (im Verhältnis 1:1) sowie mit IL-15, Monensin und Brefeldin A stimuliert, um eine NK-Zell-spezifische physiologische Stimulation zu erreichen. Bei den YAC-I-Zellen handelt es sich um Zellen einer T-Zell-Lymphomlinie, die MHC-I niedrig exprimiert und damit v.a. NK-Zellen aktiviert.

In Abbildung 10A sind repräsentativ FACS-Bilder der CD107a-Färbung gezeigt. Dabei sieht man links die CD107a-Expression der NK-Zellen einer unbehandelten *c-MYC*_{ina}-Maus und rechts die einer wt-Maus. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Stimulation mit YAC-I Zellen.

Die Auswertung der FACS-Färbungen ergab, dass die Anzahl CD107a⁺ NK-Zellen der behandelten Mäuse tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht war (Abbildung 10B). Ursächlich dafür ist ein relativ hoher Standardfehler bei der Gruppe der behandelten Mäuse, was an der geringen Stichprobenanzahl (n=4) liegt. Dennoch ist eine tendenzielle Erhöhung deutlich sichtbar.

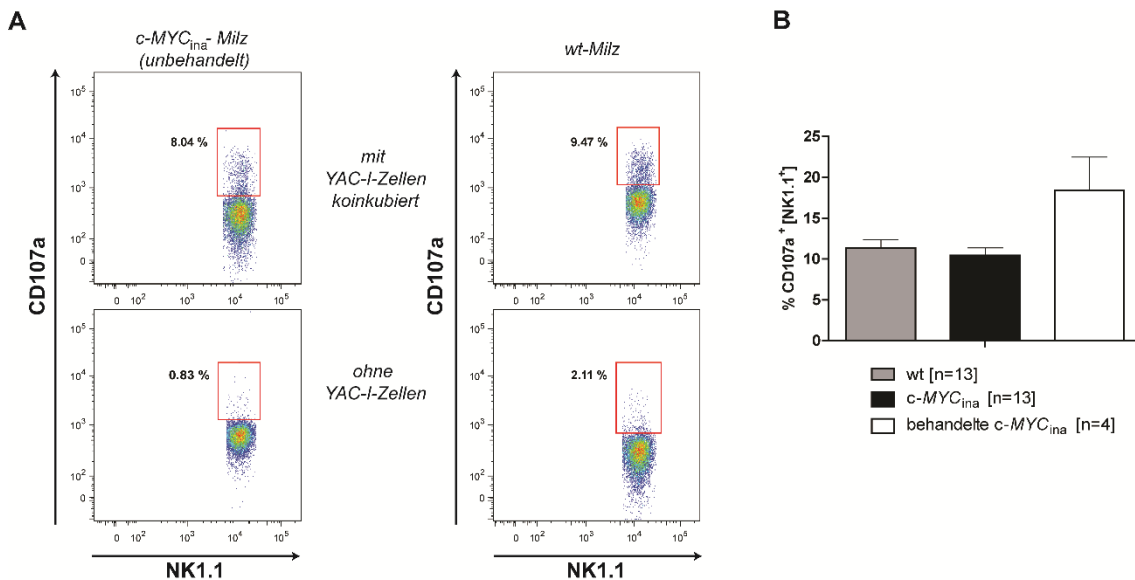


Abbildung 10: Beispielhafte FACS-Bilder zur Verdeutlichung der Gating-Strategie und der Notwendigkeit der Stimulation (A); Vergleich der Zytotoxizität von NK-Zellen aus der Milz nach Immunkontrollpunkt-Blockade anhand der CD107a-Expression (B);

3.2. Analyse der Rolle von Immunkontrollpunkten auf NK-Zellen

Nach diesen Ergebnissen war festzuhalten, dass die Therapie mit anti-PD-1- und anti-CTLA-4-Antikörper offensichtlich Auswirkungen auf die NK-Zellen hat. Um die Rolle der Immunkontrollpunkte und deren Blockade auf NK-Zellen weiter zu erörtern, war es wichtig, die NK-Zellen und ihre Expression von PD-1 und CTLA-4 in der Entwicklung der Erkrankung zu betrachten.

3.2.1. Expression von Immunkontrollpunkten auf NK-Zellen

Während man in der Vergangenheit schon zeigen konnte, dass intratumorale CD8⁺ T-Zellen PD-1 und CTLA-4 hochregulieren (Ahmadzadeh et al., 2009), was mit einer Verminderung der funktionellen Aktivität einhergeht (Shi et al., 2011), ist das Wissen über die Immunkontrollpunkte auf NK-Zellen noch relativ gering. Allerdings war bei Patienten mit multiplen Myelom eine erhöhte PD-1-Expression auf NK-Zellen genauso zu beobachten (Benson et al., 2010) wie eine gesteigerte CTLA-4-Expression auf intratumoralen NK-Zellen bei Tumoren unterschiedlichster Genese (Stojanovic et al., 2014).

Um die PD-1-Expression der intratumoralen NK-Zellen im Verlauf der Erkrankung zu prüfen, wurde PD-1 auf NK-Zellen gesunder und kranker *c-MYC*-Mäuse mittels Durchflusszytometrie untersucht, wobei für jede Messung eine *wt*-Maus als Kontrolle diente.

In Abbildung 11A ist ein repräsentatives Histogramm dargestellt, in dem man bei der kranken Maus (*c-MYC_a*) sehr deutlich zwei Populationen erkennen kann. Im Vergleich dazu zeigt die *wt*-Maus nur einen sehr geringen Anteil von PD-1⁺-NK-Zellen. Als Negativkontrolle diente auch hier wieder eine FMO-Färbung (siehe 3.1.3).

Insgesamt betrachtet war ein deutlicher Anstieg der PD-1-Expression im Verlauf der Erkrankung festzustellen (Abb. 11B). Dabei gab es in der Gruppe der kranken Mäuse zwei unterschiedliche Expressionsmuster. So exprimierte ungefähr die Hälfte der kranken Mäuse PD-1 sehr hoch (30-50 %), während die andere Hälfte eine ähnliche Expression wie die gesunde Gruppe aufwies (5-15 %). Dennoch war in der Summe der Anteil der splenalen PD-1⁺-NK-Zellen in den kranken Mäusen signifikant höher als in

den gesunden und den wt-Mäusen (jeweils $p < 0,001$). Die NK-Zellen der gesunden und der wt-Mäuse unterschieden sich dagegen kaum in ihrer PD-1-Expression.

Während in der Milz die Differenz in der PD-1-Expression sehr eindrücklich war, gab es im LK eine deutlich stärkere Streuung der Werte, sodass nur eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung der PD-1⁺ NK-Zellen zu beobachten war (Abb. 11C).

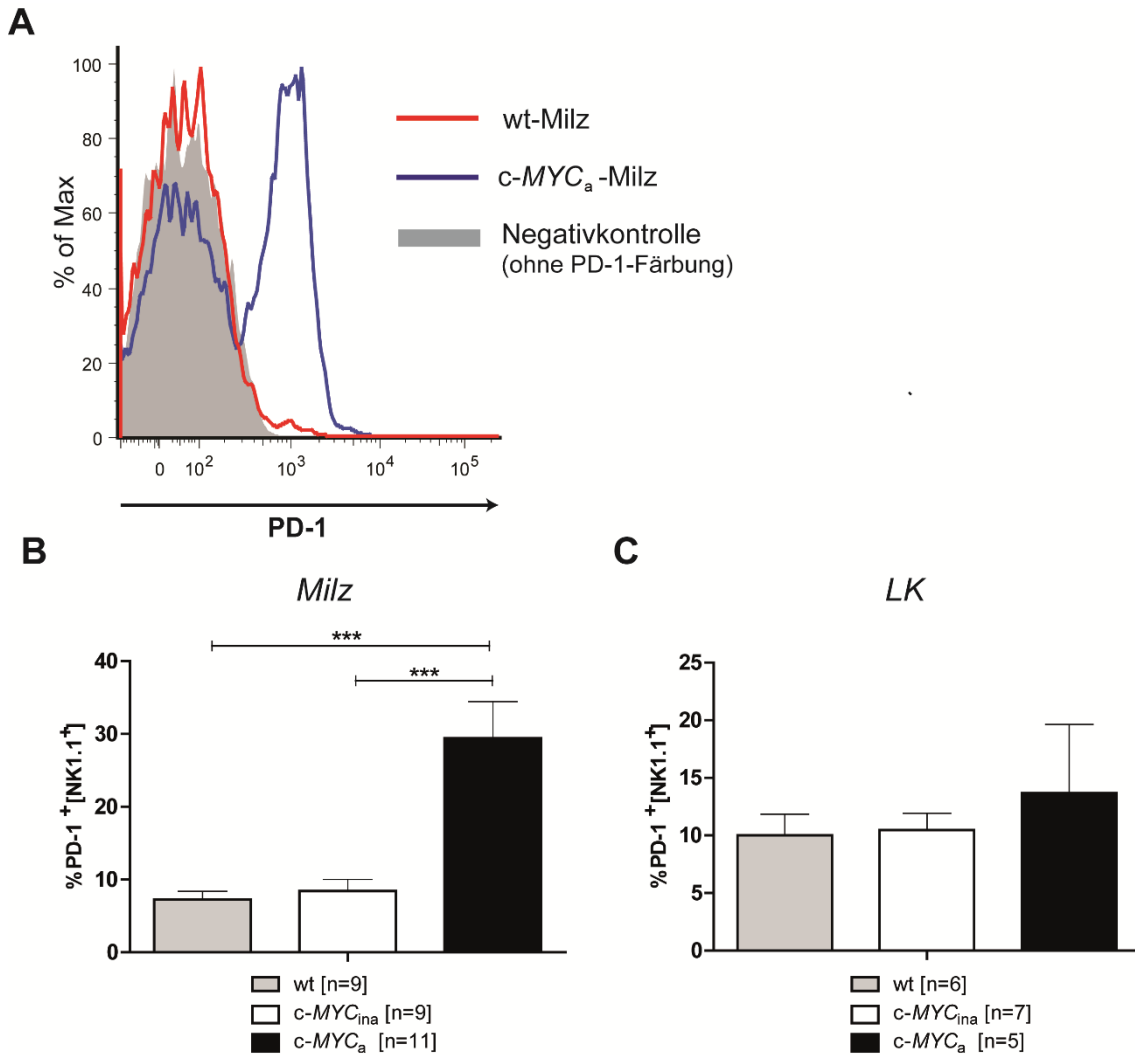


Abbildung 11: repräsentative Histogrammdarstellung der PD-1-Expression (A); Anteil PD-1⁺ NK-Zellen kranker und gesunder c-MYC-Mäuse sowie von wt-Mäusen in Milz (B) und LK (C)

Des Weiteren wurde noch die CTLA-4-Expression in NK-Zellen untersucht. Da CTLA-4 sehr schnell internalisiert wird (Chambers et al., 2001) und dadurch nur schwer an der Oberfläche zu detektieren war, erfolgte eine intrazelluläre Färbung von CTLA-4.

Dabei stellte sich heraus, dass CTLA-4 in NK-Zellen zu finden ist. In Abbildung 12A ist beispielhaft die CTLA-4-Expression in NK-Zellen einer wt-Milz sowie einer *c-MYC_a*-Milz dargelegt. Im ersten Bild ist die Negativkontrolle (FMO-Färbung) gezeigt, an Hand derer die jeweiligen Gates derselben Färbung gesetzt wurden. Wie man in Abbildung 12B und 12C sehen kann, ist jedoch nur eine tendenzielle Steigerung der CTLA-4-Expression in den NK-Zellen der kranken Mäuse zu sehen. Allerdings lässt sich im LK (Abb. 12C) keine verlässliche Aussage über die Expression von CTLA-4 machen, da die Stichprobenanzahl zu gering ist.

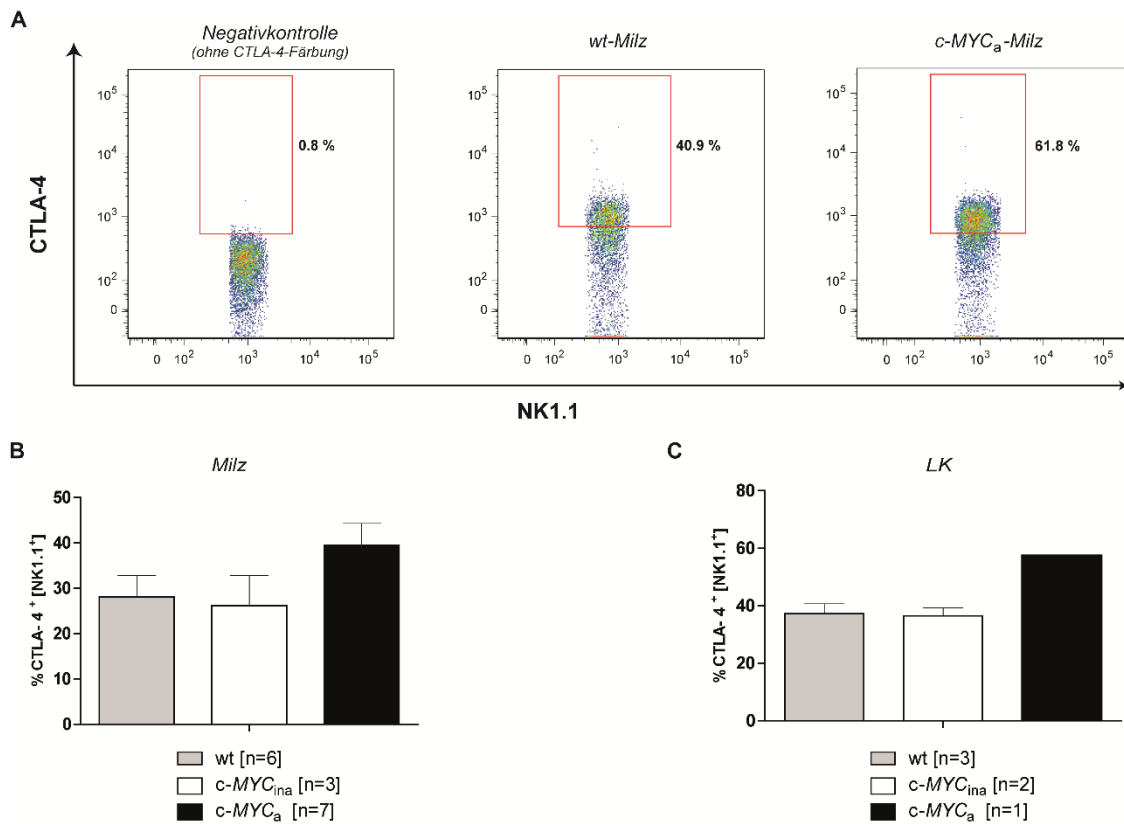


Abbildung 12: Intrazelluläre Detektion von CTLA-4 in NK-Zellen: Beispielhafte FACS-Bilder einer CTLA-4-Färbung (A) und der Vergleich der Expression in Milz (B) und LK (C) kranker und gesunder *c-MYC*-Mäuse sowie von wt-Mäusen

3.2.2. Untersuchung des Effekts von Immunkontrollpunkt-Inhibitoren auf IFN- γ in vitro

Nachdem gezeigt wurde, dass die NK-Zellen sowohl CTLA-4 als auch PD-1 exprimieren und durch die Blockade dieser beiden Immunkontrollpunkte eine Steigerung der IFN- γ -Expression der NK-Zellen erreicht werden konnte, stand die Frage im Raum, ob dieser Anstieg direkt durch die Blockade der Kontrollpunkte auf NK-Zellen oder indirekt durch

Aufheben der Hemmung des Immunsystems durch die regulatorischen Zellen und der daraus resultierenden Aktivierung der NK-Zellen zurückzuführen ist.

Um dies zu untersuchen, wurden die NK-Zellen von wt-Mäusen magnetisch separiert und mit YAC-I-Zellen, IL-15 und Brefeldin A für unterschiedlich lange Zeitabschnitte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung stimuliert. Zusätzlich wurden vier Gruppen unterschieden, die entweder mit anti-CTLA-4-Ak und anti-PD-1-Ak, nur mit jeweils einem von beiden oder mit keinem Antikörper inkubiert wurden. Zuvor war gezeigt worden, dass YAC-I-Zellen PD-L1, den Liganden von PD-1, exprimieren, d.h. diese Zellen haben theoretisch die Möglichkeit, mit PD-1 der NK-Zellen zu interagieren.

Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die intrazelluläre Färbung von IFN- γ . Sowohl bei der Gruppe, die 3 Stunden (Abb. 13A), als auch bei der, die 25 Stunden (Abb. 13B) stimuliert wurde, waren nur sehr kleine Unterschiede in der IFN- γ -Expression zu beobachten. Sehr deutlich unterschied sich der Effekt der Immunkontrollpunktblockade nach 45 Stunden Stimulation (Abb. 13C). So war der Anteil der IFN- γ ⁺ NK-Zellen bei der Gruppe, die nur den anti-PD-1-Ak erhielt, nicht nur signifikant höher als bei der, die keine Antikörper erhalten hatte ($p < 0,001$), sondern auch höher als bei den Zellen, denen der anti-CTLA-4-Ak zugegeben wurde ($p < 0,01$). Dagegen war genauso wenig ein Unterschied in der IFN- γ -Expression durch die alleinige Zugabe von anti-CTLA-4-Ak zu beobachten wie durch die Kombination beider Antikörper im Vergleich zur Stimulation, die nur den anti-PD-1-Ak enthielt.

Daher lag die Vermutung nahe, dass die Steigerung der IFN- γ -Expression der NK-Zellen durch die direkte Blockade von PD-1 vermittelt wurde.

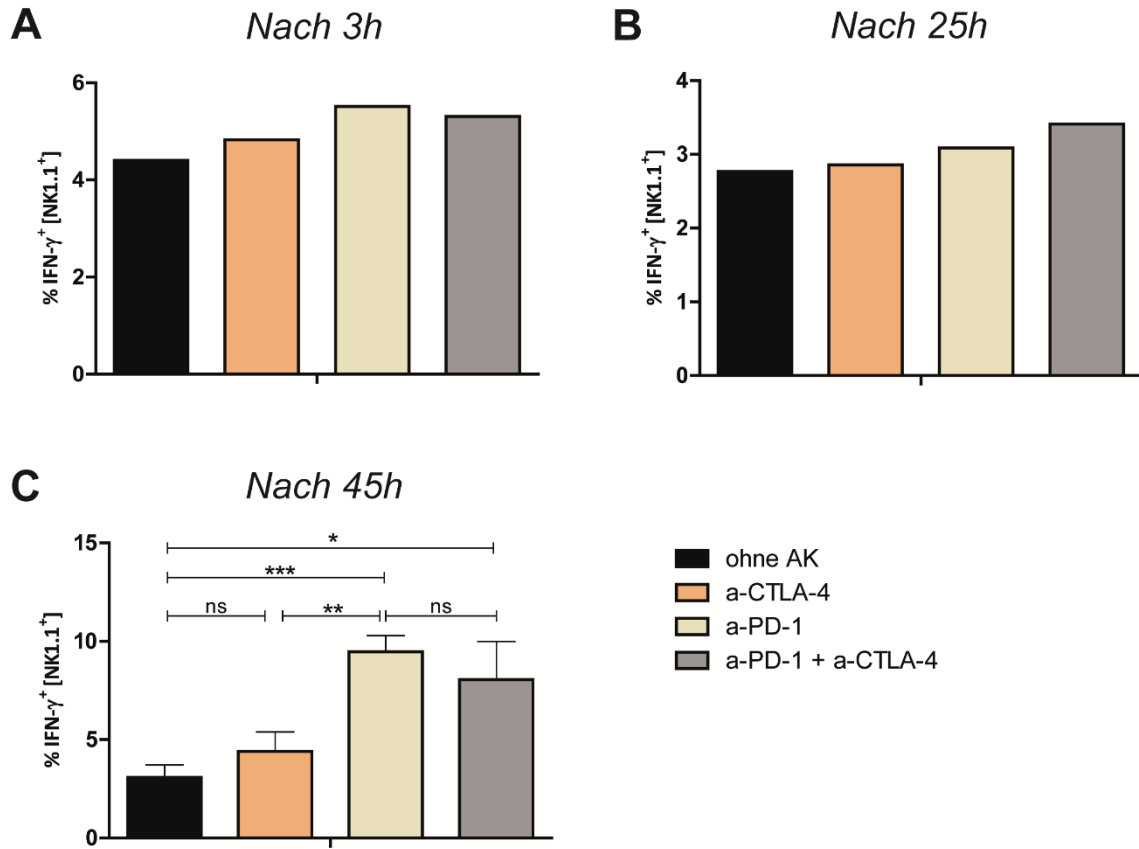


Abbildung 13: IFN- γ -Expression nach In-vitro-Stimulation von magnetisch separierten NK-Zellen mit YAC-I-Zellen, IL-15, Brefeldin A sowie anti-PD-1-/anti-CTLA-4-Ak nach 3 (A), 25 (B) und 45 Stunden (C).

3.3. Tumorzell-spezifische Th1-Zellen: Generierung und Therapieansatz

Neben dieser auf Antikörper basierenden Tumorthherapie gibt es einen alternativen Behandlungsansatz, bei dem ein Transfer von Th1-Zellen erfolgt. In der Vergangenheit wurde schon gezeigt, dass der adoptive Transfer von tumorspezifischen Th1-Zellen einen tumorprotektiven Effekt hatte (Egeter et al., 2000). Allerdings wurde dies nur bei einem transplantierbaren Mausmodell gezeigt. Es ist aber bekannt, dass ein endogener Tumor ein immunsuppressives Milieu erzeugt, in dem erschöpfte NK-Zellen (niedrige IFN- γ -Expression, stark verminderte Zytotoxizität), eine verstärkte Ansammlung von Th2-Zellen sowie eine erhöhte Konzentration von IL-10 zu finden sind (Naujoks et al., 2014). Aufgrund dieser Immunsuppression im Tumorgebiet ist es daher fraglich, ob ein adoptiver Th1-Zell-Transfer in einem endogenen Tumormodell denselben Erfolg erzielen kann wie in einem transplantierbaren.

Im ersten Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit den Immunkontrollpunkt-Inhibitoren eine Steigerung der IFN- γ -Expression der NK-Zellen bewirkt. Dieses IFN- γ hat vielfältige Funktionen, die solch ein suppressives Milieu verändern könnten. So wäre nicht nur eine verstärkte Migration von Immunzellen in das Tumorgebiet, sondern auch eine Polarisierung der Th1-Zellen denkbar (Martin-Fontecha et al., 2004).

Das Ziel ist, einen Th1-Zell-Transfer unter einer Antikörperbehandlung mit Anti-CTLA-4- und Anti-PD-1-Ak in einem endogenen Tumormodell durchzuführen, da die Steigerung der IFN- γ -Expression in NK-Zellen die T-Zell-Antwort unterstützen könnte. Dafür muss erst geklärt werden, ob es möglich ist Th1-Zellen, die spezifisch gegen die *c-MYC*-Lymphomzellen (291-Zellen, siehe 2.2.1) gerichtet sind, zu generieren.

3.3.1. Etablierung eines Protokolls zur Generierung 291-spezifischer Th1-Zellen

291-Zellen sind Zellen einer B-Zell-Lymphomlinie, die aus dem Tumor einer *c-MYC*-Maus generiert wurde (Brenner et al., 2010).

Mit dem Ziel, 291-spezifische Zellen zu generieren, ohne ein für den Tumor spezifisches Antigen zu kennen, wurde ein 7-tägiges Protokoll etabliert. Daher wurden 291-Zellen und APZ bestrahlt und zusammen mit einem Anti-IL-4-Ak, der eine Th2-Entwicklung verhindern sollte, und dem CpG-Oligonukleotid 1668 in Kultur gesetzt. Die

CpG-Oligos fungieren als TLR-9-Agonisten, was zu einer direkten Aktivierung u.a. von DZ und Makrophagen führt (Xu et al., 2010). Dadurch werden diese Zellen zur IL-12-Produktion angeregt (Segal et al., 1997), wodurch eine Th1-Entwicklung begünstigt und eine Th2-Entwicklung verhindert wird (Manetti et al., 1993). Im Anschluss daran wurden die magnetisch separierten CD4⁺ T-Zellen und IL-2 hinzugegeben. Am Tag der Ernte wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt, bei denen festgestellt wurde, dass vor allem Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen, also regulatorische T-Zellen, kultiviert wurden. Daher wurde das Protokoll nochmals angepasst, und es erfolgte zusätzlich zu einer CD4-Selektion auch noch eine CD25-Selektion, um der Kultur letztendlich nur CD4⁺CD25⁻ T-Effektorzellen (2. Ansatz) hinzuzugeben. Diese erweiterte Selektion wirkte sich deutlich auf das T_{Eff}/T_{Reg}-Verhältnis in der Kultur am Tag der Ernte aus. In Abbildung 14A ist einerseits ein Histogramm der beiden Ansätze gezeigt, in dem man den unterschiedlichen Anteil der Foxp3⁺-T-Zellen, welche den regulatorischen T-Zellen entsprechen, sehr gut erkennen kann. Die blaue Kurve, die einen deutlich höheren Anteil Foxp3⁻CD4⁺ Zellen zeigt, stellt den Ansatz mit der erweiterten Selektion dar. Als fast schon gegensätzliches Bild dazu die rote Kurve, die den ersten Ansatz repräsentiert. Im Einklang mit der Histogrammdarstellung zeigt sich auch im Balkendiagramm eine deutliche Veränderung des T_{Eff}/T_{Reg}-Verhältnisses durch die erweiterte Selektion. Während im ersten Ansatz ein ungefähr gleichwertiges Verhältnis (1:1) zwischen Effektorzellen und regulatorischen Zellen auszumachen war, konnte der Anteil der Effektorzellen im zweiten Ansatz um das 6-fache gesteigert werden.

Eine wahrscheinliche Ursache für die hohe Zahl Foxp3⁺ T-Zellen im ersten Ansatz war die gesteigerte Proliferation der Foxp3⁺CD4⁺-Zellen, die anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 detektiert werden konnte. In Abbildung 14B ist ein im Schnitt über 5-fach höherer Anteil Ki-67⁺ regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu den Ki-67⁺ Effektorzellen zu erkennen. Diese Beobachtung wird durch die Histogrammdarstellung daneben noch verstärkt.

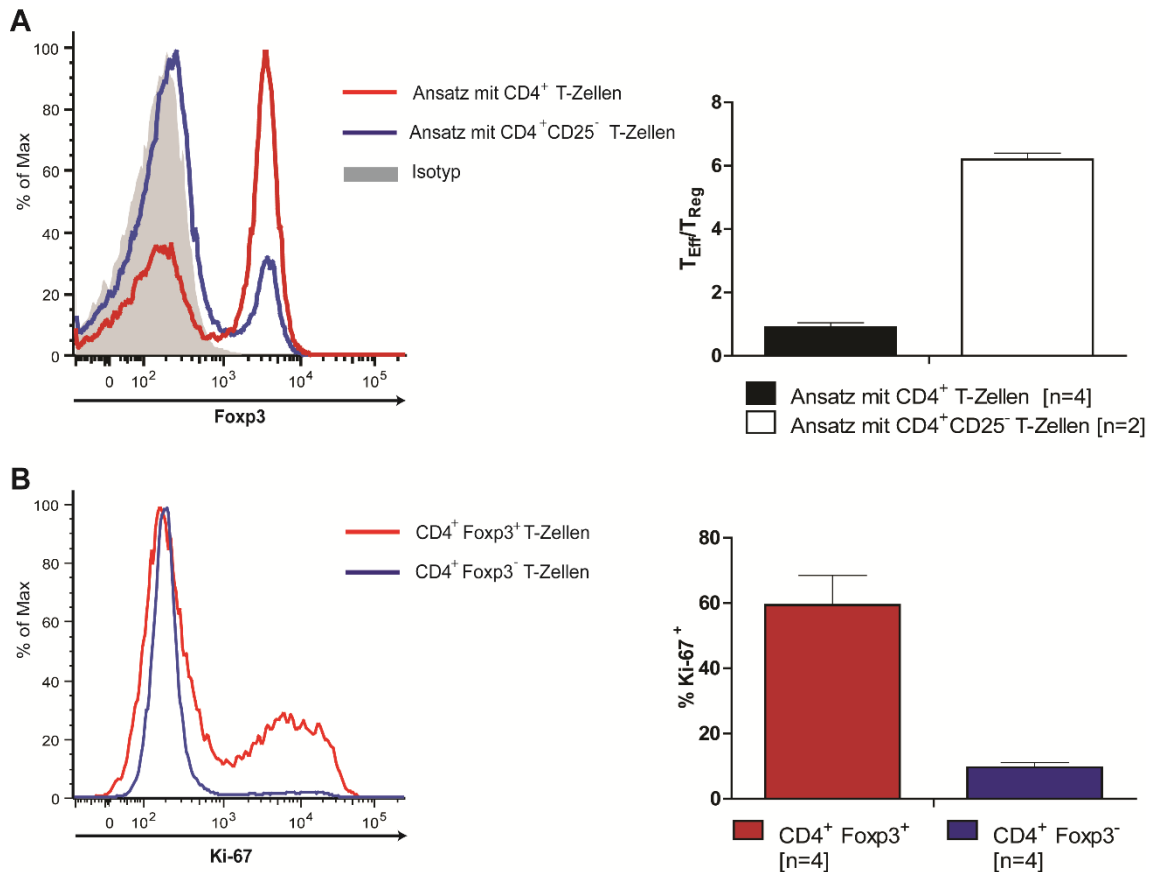


Abbildung 14: Vergleich der beiden Ansätze anhand des T_{Eff}/T_{Reg} -Verhältnisses (A) sowie der Proliferation der Foxp3⁺CD4⁺ und der Foxp3⁻CD4⁺ T-Zellen (B)

Desweiteren erfolgte eine Charakterisierung des Zytokinprofils der CD4⁺-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie, wobei der Schwerpunkt vor allem in der intrazellulären Detektion von IL-10 und IFN- γ lag. Zusätzlich wurde die IFN- γ - und IL-10-Konzentration im Kulturüberstand von Tag 6 (Tag der Ernte) mit Hilfe eines ELISA gemessen. Anhand der Abbildung 15A und 15B kann man gut erkennen, wie sich das Zytokinprofil durch die erweiterte Selektion der CD25⁺-Zellen deutlich auf die Seite der Th1-Zellen verschiebt. So wurde gezeigt, dass im ELISA die IFN- γ -Konzentration höher war als im 1. Ansatz, gleichwohl im 2. Ansatz kein IL-10 zu detektieren war. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen stimmten mit der Erkenntnis der ELISA-Untersuchung überein. Im 2. Ansatz gab es prozentual mehr IFN- γ ⁺CD4⁺ T-Zellen und weniger IL-10⁺CD4⁺ T-Zellen als im ersten Ansatz. Auch wurde der Anteil IL-4⁺CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt, um zu überprüfen, ob Th2-Zellen generiert

worden sind. Da dies in beiden Ansätzen nur sehr geringe Anteile waren, ist diese Untersuchung nicht abgebildet.

Zusammen mit den Beobachtungen des $T_{\text{Eff}}/T_{\text{Reg}}$ -Quotienten konnte bestätigt werden, dass im 2. Ansatz deutlich mehr $CD4^+$ -Effektor-T-Zellen, also Th1-Zellen, und weniger regulatorische T-Zellen generiert wurden als im 1. Ansatz.

Nun stellt sich die Frage, ob die generierten Th1-Zellen eine Spezifität gegen die 291-Zellen besitzen.

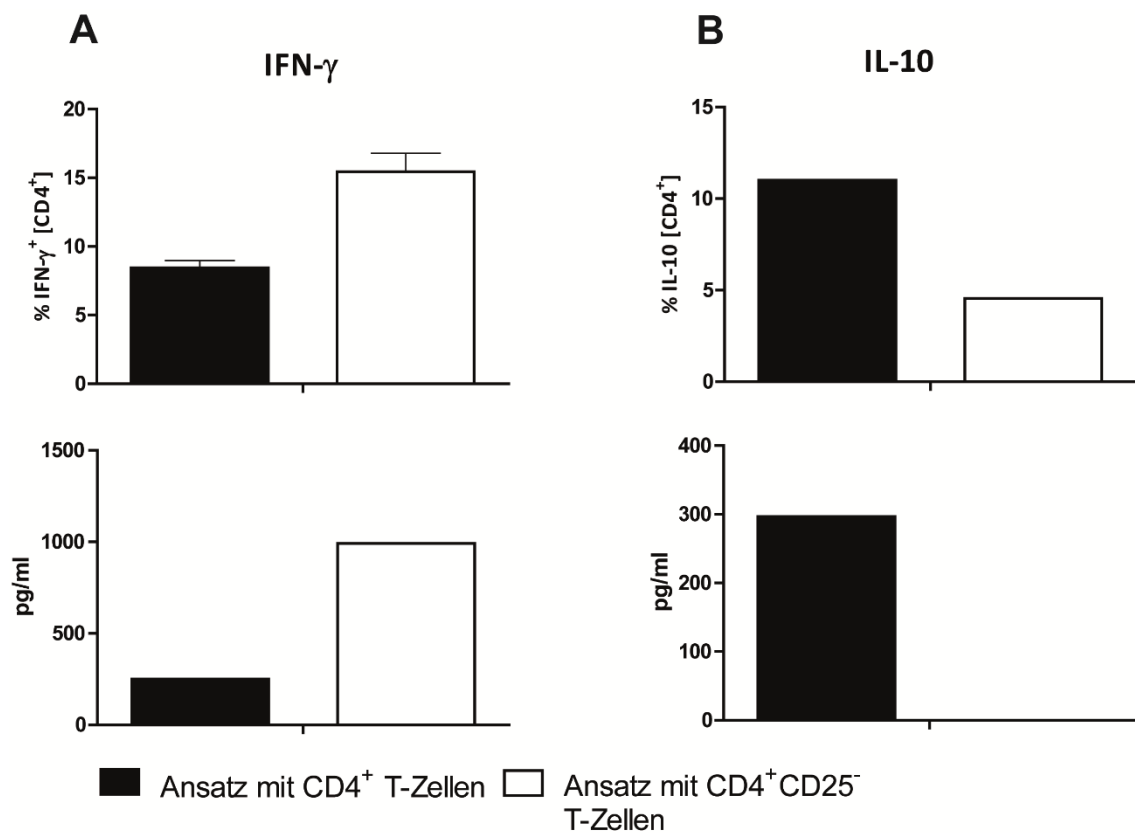


Abbildung 15: Vergleich der beiden Ansätze anhand des Zytokinprofils der $CD4^+$ -T-Zellen, IFN- γ (A) und IL-10 (B), an Tag 6 mittels Durchflusszytometrie (obere Reihe) und ELISA (untere Reihe)

3.3.2. Nachweis der Tumorspezifität der Th1-Zellen

Um die Spezifität der an Tag 6 geernteten Th1-Zellen nachzuweisen, wurden diese mit bestrahlten APZ sowie mit bestrahlten 291- oder B16F0-Zellen für 24 Stunden im Brutschrank koinkubiert (siehe 2.2.8). Anschließend wurden die Überstände dieser Kokultur entnommen und mittels ELISA auf die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 untersucht. In der Abbildung 16 sind beispielhaft die Ergebnisse eines ELISA dargestellt, allerdings wurde dieser für insgesamt jeweils drei Kokulturen durchgeführt mit vergleichbarem Ergebnis wie in dieser Abbildung.

Besonders eindrücklich war, dass die IFN- γ -Konzentration im Überstand der 291-Kokultur sehr hoch, in dem der B16F0-Kokultur dagegen nur sehr gering war (Abb. 16). Da IFN- γ das Effektorzytokin der Th1-Zellen ist (Chaplin, 2010), konnte dadurch bestätigt werden, dass die Th1-Zellen durch bestrahlte 291-Zellen aktiviert werden, diese Aktivierung dagegen bei der Stimulation mit Melanomzellen (B16F0) fehlt, was hiermit ein starker Hinweis auf die 291-Spezifität der generierten Th1-Zellen ist.

Im Einklang mit dem Ergebnis des IFN- γ -ELISA war auch das Resultat der Messung der IL-2-Konzentration in den Überständen. IL-2, das von aktivierten Th1-Zellen produziert wird, ist für diese ein wichtiger Überlebens- und Proliferationsfaktor (Gaffen & Liu, 2004). Allerdings ist das Ausmaß der Sekretion deutlich geringer als bei IFN- γ .

Desweiteren ist aus der Abbildung ersichtlich, dass in dem Überstand der 291-Kokultur eine hohe Menge an IL-10 zu detektieren war. Das könnte einerseits im Rahmen der Autoregulation der Th1-Aktivierung von aktivierten Th1-Zellen stammen, andererseits auch von regulatorischen T-Zellen, die wie Th1-Zellen ein 291-spezifisches Antigen entdeckt haben.

Zum Ergebnis des IL-4-ELISA lässt sich sagen, dass nur sehr wenige Th2-Zellen generiert wurden, da die Konzentration des IL-4 sehr gering ist. Die Zellen, die generiert wurden, scheinen aber auch 291-spezifisch zu sein.

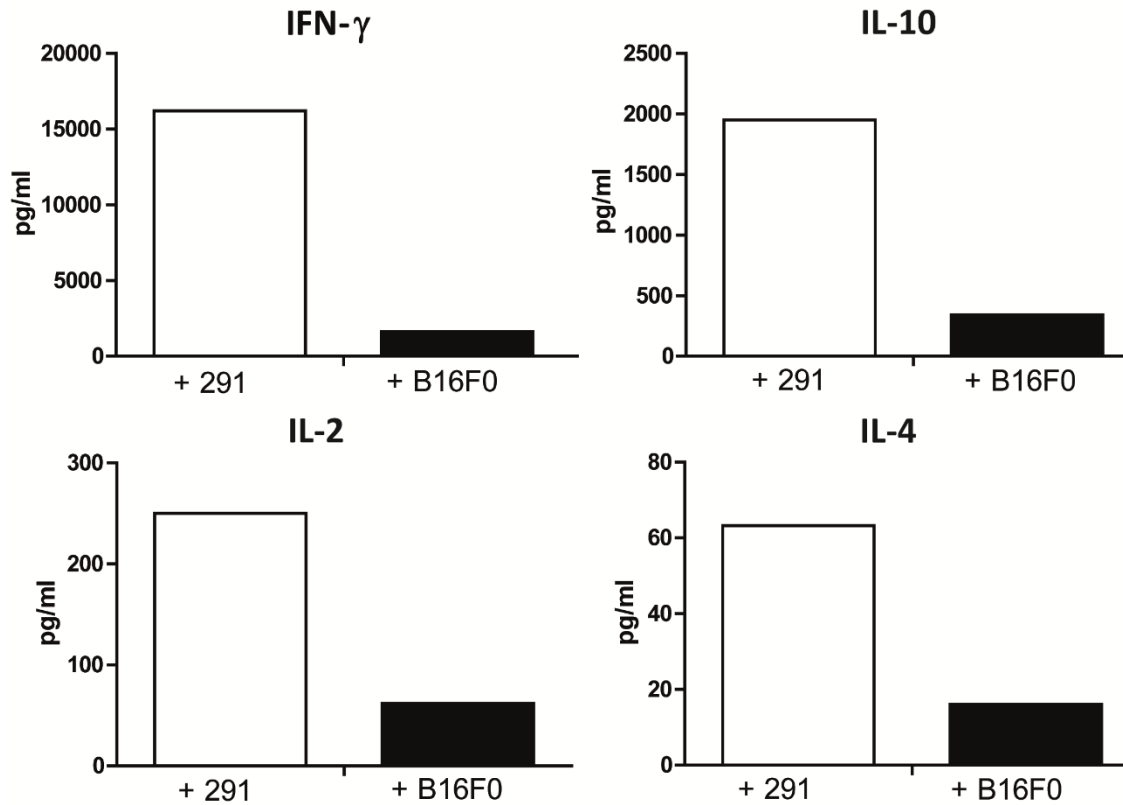


Abbildung 16: Darstellung der Zytokinkonzentrationen IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 im Überstand der Kokulturen nach Stimulation mit bestrahlten APZ und bestrahlten 291-/B16F0-Zellen über 24 Stunden

3.3.3. Therapieversuch mit 291-spezifischen Th1-Zellen

Nachdem nun gezeigt worden ist, dass die generierten Th1-Zellen 291-spezifisch sind, wurde ein Therapieversuch angesetzt. Dabei war der Plan, die Zellen in Mäuse zu injizieren, die einen endogenen Tumor entwickeln, denn in der Vergangenheit wurde schon gezeigt, dass man Mäusen mit einem transplantierbaren Tumor mit spezifischen Th1-Zellen ein langfristiges Überleben sichern konnte (Egeter et al., 2000). Allerdings entspricht ein endogen anwachsender Tumor eher der wirklichen Tumorentwicklung beim Menschen.

So wurden klinisch noch inapparenten *c-MYC*-Mäusen im Alter von 40, 47, 54 und 61 Tagen jeweils 1×10^6 291-spezifische Th1-Zellen intravenös injiziert. Zusätzlich wurden den Mäusen an diesen Tagen noch 24×10^3 internationale Einheiten (IU) Proleukin intraperitoneal appliziert. Die Applikation von Proleukin wurde nur bei der ersten Zellinjektion für vier weitere Tage fortgeführt. Da sich durch die Injektion von IL-2 viele Nebenwirkungen entwickeln können (Fachinformation zu Proleukin S, Novartis), wurde

bei den anderen Zellinjektionen nur einmal Proleukin appliziert (für weitere Informationen zur Methodik siehe 2.2.10).

Anschließend wurde das Überleben beobachtet und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und mit dem Überleben unbehandelter *c-MYC*-Mäuse verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Gruppe der *c-MYC*-Mäuse, die mit den Th1-Zellen behandelt wurden, ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben aufwies als die unbehandelte Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Des Weiteren zeigte sich in der Gruppe der behandelten Mäuse nicht nur ein verlängertes medianes Überleben (76 vs. 178 Tage), sondern auch Langzeitüberleber (Abb. 17).

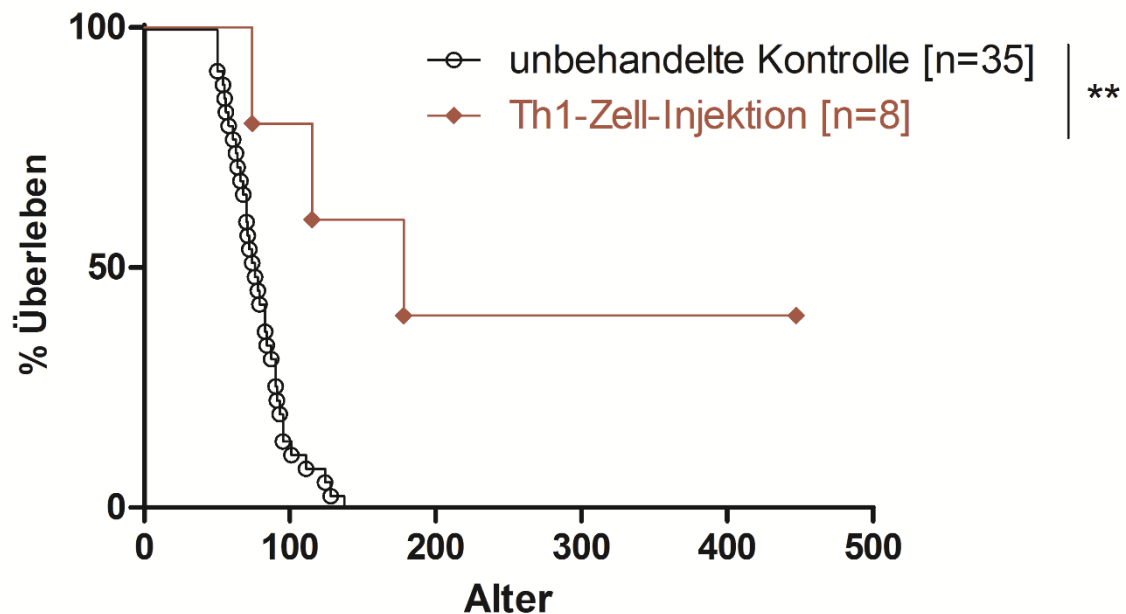


Abbildung 17: Darstellung des Gesamtüberlebens mittels Kaplan-Meier-Kurve; das mediane Überleben der mit Th1-Zellen behandelten *c-MYC*-Mäuse (rot) war mit 178 Tagen, verglichen mit der Kontrolle (76 Tage; schwarz) deutlich verlängert. Außerdem zeigte sich auch ein verlängertes Gesamtüberleben sowie Langzeitüberleber in der Therapiegruppe.

4. DISKUSSION

4.1. Erörterung der Wirksamkeit der Blockade von PD-1 und CTLA-4

Wie eingangs erwähnt, werden Inhibitoren der Kontrollpunkte CTLA-4 und PD-1 bereits klinisch eingesetzt. Nachdem der Anti-CTLA-4-Ak Ipilimumab und der Anti-PD-1-Ak Nivolumab vorerst als Monotherapie zur Behandlung von fortgeschrittenem Melanom zugelassen waren, finden sie nun auch als Kombination bei dieser Tumorentität Anwendung (Larkin et al., 2015). Für den Behandlungserfolg werden bis dato vor allem die T-Zellen verantwortlich gemacht (Tarhini, Lo, & Minor, 2010). Die Effekte der Blockade auf die verschiedenen Bereiche des Immunsystems und die am Therapieerfolg beteiligten Zellgruppen sind dagegen noch nicht vollständig geklärt. Diese Arbeit dient der Erforschung der Rolle der NK-Zellen in dem Therapieansatz mit Anti-CTLA-4 und Anti-PD-1-Ak.

Für die Beteiligung von NK-Zellen am Therapieerfolg bei der Behandlung mit Kontrollpunkt-Inhibitoren spricht, dass eine Hochregulierung von PD-1 auf NK-Zellen im Tumormilieu beobachtet und durch dessen Blockade In-vitro die NK-Zell-Aktivität gesteigert werden konnte. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit am *c-MYC*-Mausmodell beobachtet, wobei einerseits die intratumoralen NK-Zellen von Mäusen, die mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren behandelt wurden, eine gesteigerte IFN- γ -Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe aufweisen (siehe 3.1.2), andererseits eine Steigerung der IFN- γ -Expression auf NK-Zellen durch In-vitro-Blockade von PD-1 möglich ist (siehe 3.2.2). Vergleichbares wurde auch an NK-Zellen von Patienten, die an einem multiplen Myelom erkrankt waren, festgestellt. Auch hier wiesen, wie im *c-MYC*-Modell (siehe 3.2.1), intratumorale NK-Zellen eine erhöhte Expression von PD-1 auf. Die Interaktion mit dem Liganden PD-L1 auf Myelomzellen bewirkte eine Verminderung des Antitumoreffektes der NK-Zellen, welche durch In-vitro-Blockade von PD-1 rückgängig gemacht werden konnte (Benson et al., 2010). In diesem Zusammenhang stellte sich heraus, dass die In-vitro-Behandlung mit dem Anti-PD-1-Ak zudem eine vermehrte Migration der NK-Zellen in Richtung der Myelomzellen bewirkte. Dies könnte ein Ansatz zur Erklärung der erhöhten intratumoralen NK-

Zellzahl in der Gruppe der behandelten *c-MYC*-Mäuse sein, da eine erhöhte Proliferation nicht ausgemacht werden konnte (siehe. 3.1.1).

Auch bei nicht-hämatologischen Neoplasien, wie dem Glioblastom, wird die Wirksamkeit von PD-1-Inhibitoren untersucht. So stellte man fest, dass eine Therapie mit PD-1-blockierten NK-Zellen, verglichen mit normalen NK-Zellen ein langsames Wachstum des Glioblastoms und damit ein längeres Gesamtüberleben bewirkt (Huang et al., 2015).

Ein weiteres Argument für einen Anteil der NK-Zellen am Therapieerfolg ist eine Verminderung des Gesamtüberlebens unter NK-Zell-Depletion trotz Kontrollpunkt-Inhibition. Dabei wurden *c-MYC*-Mäusen neben Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Ak zusätzlich Anti-Asialo-Ak bzw. Anti-TM- β 1-Ak, welche zu einer Depletion der NK-Zellen führen, appliziert. Der Therapieerfolg war dabei nicht vollständig reversibel, dennoch lag das Gesamtüberleben deutlich unter dem der Mäuse, die nur die Kontrollpunkt-Inhibitoren erhalten hatten. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, inwiefern sich das Gesamtüberleben verändert, wenn man die T-Zellen depletiert. Hierbei konnte beobachtet werden, dass das Gesamtüberleben der behandelten *c-MYC*-Mäuse trotz einer Pan-T-Zell-Depletion mit einem Anti-MmTC-Ak gegenüber der behandelten Gruppe ohne Depletion nur geringfügig verändert war. Der einzige Unterschied bestand lediglich darin, dass es in der Gruppe der *c-MYC*-Mäuse, deren T-Zellen depletiert wurden, keine Langzeitüberleber gab (Ahmetlic, 2018).

Trotz dieser Argumente darf man die Rolle der T-Zellen in der Therapie mit Anti-CTLA-4- und Anti-PD-1-Ak nicht außer Acht lassen. Denn Untersuchungen an Mäusen, die an einem malignen Melanom erkrankt waren, haben gezeigt, dass die Blockade von CTLA-4 auf regulatorischen und T-Effektorzellen einen starken Antitumoreffekt hatte. Dabei fiel auf, dass die alleinige Blockade von CTLA-4 auf T-Effektorzellen schon eine gesteigerte Antitumorantwort bewirkte, während die spezifische Inhibition von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen keinen Effekt hatte. Wurde allerdings CTLA-4 auf beiden Zellpopulationen inhibiert, hatte dies einen maximalen Effekt auf das Überleben der Mäuse, was am ehesten auf einen synergistischen Effekt schließen lässt (Peggs et al., 2009).

Die Untersuchung von Patienten, die an einem Blasenkarzinom erkrankt waren und therapeutisch einen Anti-CTLA-4-Ak erhalten hatten, ergab ebenfalls, dass die T-Zellen bei dieser Therapie eine entscheidende Rolle spielen. So wiesen diese Patienten, verglichen mit dem Zustand vor der Therapie, eine wesentlich höhere Teff/Treg-Ratio auf (Liakou et al., 2008), was bei einigen Tumorentitäten als prognostisch günstiger Faktor bestätigt wurde, wie z.B. beim Ovarialkarzinom oder beim Non-Hodgkin-Lymphom (Curiel et al., 2004; Yang et al., 2006). Außerdem stieg mit der Therapie der Anteil tumorspezifischer CD4⁺ T-Zellen, deren IFN- γ -Expression und folgerichtig auch die IFN- γ -Konzentration sowohl im Serum als auch im Tumormilieu an (Liakou et al., 2008). Dass IFN- γ wiederum notwendig für den Therapieerfolg mit Anti-CTLA-4 und Anti-PD-1-Ak bei Lymphomen ist, konnte gezeigt werden, indem c-MYC-Mäuse neben der Therapie einen IFN- γ -depletierenden Antikörper erhielten und der Überlebensvorteil dadurch komplett reversibel war (Ahmetlic, 2018).

Ein weiterer Indikator für eine Beteiligung von T-Zellen am Therapieerfolg mit Anti-CTLA-4- und Anti-PD-1-Ak ist die Tatsache, dass PD-1 die Erschöpfung von CD8⁺ T-Zellen vermittelt, durch Blockade von PD-1 diese Erschöpfung allerdings reversibel ist (Barber et al., 2006).

Letztendlich liegt die Vermutung nahe, dass die Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren wesentlich weitreichendere Effekte auf das Immunsystem hat als, wie bisher gedacht, primär auf die T-Zellen. Es ist wahrscheinlich, dass ein Zusammenspiel der verschiedenen Bereiche des angeborenen und des adaptiven Immunsystems das beobachtete verlängerte Überleben durch die Behandlung bewirkt. Um die Mechanismen der Therapie noch besser zu verstehen, bedarf es unbedingt einer weiteren Erforschung der Immunzellen, insbesondere auch von Teilen des angeborenen Immunsystems, wie den dendritischen Zellen.

4.2 Adoptiver Th1-Zell-Transfer als Therapiemöglichkeit von Tumoren

Neben den Immunkontrollpunkt-Inhibitoren spielt momentan in der Erforschung von Immuntherapien auch der adoptive T-Zell-Transfer eine wichtige Rolle. Wie anfangs erwähnt, sind Th1-Zellen über verschiedene Mechanismen in die Antitumorantwort des Immunsystems involviert (Pardoll & Topalian, 1998). Allerdings erzeugt der Tumor

ein immunsuppressives Milieu, welches nicht nur Th1-Zellen supprimiert, sondern auch zu einer Erschöpfung der NK-Zellen, einer verstärkten Ansammlung von Th2-Zellen und einer vermehrten Produktion antiinflammatorischer Zytokine (v.a. IL-10) führt (Naujoks et al., 2014). Sowohl durch die In-vitro-als auch die In-vivo-Blockade von PD-1 und CTLA-4 konnte aber beispielsweise die IFN- γ -Expression der NK-Zellen wieder gesteigert und damit deren Erschöpfung rückgängig gemacht werden (3.1.2. und 3.2.2). Die Steigerung der IFN- γ -Expression der NK-Zellen könnte das immunsuppressive Milieu verändern und u.a. Th1-Zellen in ihrer Antitumoraktivität unterstützen.

Da man Th1-Zellen, im Gegensatz zu NK-Zellen, durch In-vitro-Stimulation spezifisch gegen Tumorzellen richten kann, bietet sich zudem der Ansatz eines therapeutischen Transfers dieser tumorspezifischen Th1-Zellen an (siehe 3.3.2). An einem transplantierbaren Mausmodell, in welchem den Mäusen A20-Lymphomzellen injiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass tumorspezifische Th1-Zellen grundsätzlich die Möglichkeit besitzen, Tumorzellen zu eradizieren sowie einen dauerhaften Schutz vor diesen zu gewährleisten (Egeter et al., 2000). Auf welche Art und Weise diese Eradikation ermöglicht wird, ist umstritten. So wird einerseits behauptet, dass CD8⁺ T-Zellen für die Elimination der Tumorzellen unbedingt notwendig sind (Nishimura et al., 1999), andererseits, dass der Therapieerfolg unabhängig von den CD8⁺ T-Zellen, aber abhängig von IFN- γ und der Interaktion von CD40 und CD40L ist (Egeter et al., 2000).

Nachdem das transplantierbare Tumormodell allerdings nicht vollständig auf die humane Situation übertragbar ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein adoptiver Transfer von tumorspezifischen Th1-Zellen an einem endogenen Lymphommodell durchgeführt. Die behandelten Mäuse wiesen ein verlängertes Gesamtüberleben auf, wobei sogar ein Teil dauerhaft tumorfrei blieb (siehe 3.3.3). Dabei gilt es noch zu erforschen, durch welche Mechanismen dieses verlängerte Gesamtüberleben bewerkstelligt wird. Als ausschlaggebende Faktoren kommen neben der Hypothese, dass die transferierten Th1-Zellen vermehrt CD8⁺ T-Zellen rekrutieren sowie deren Proliferation und Aktivierung steigern (Hoepner et al., 2013; Huang et al., 2006), auch die Vermutung in Betracht, dass der Th1-Zell-Transfer einen positiven Einfluss auf das

Th1/Th2-Verhältnis hat, welches bei einigen Tumoren zu Gunsten der Th2-Zellen verschoben ist (Ohta et al., 1997; Sharma et al., 2010).

Das beobachtete verlängerte Überleben der mit tumorspezifischen Th1-Zellen therapierten *c-MYC*-Mäuse sollte mit Vorsicht beurteilt werden, da die Injektionen der Th1-Zellen in einem sehr frühen Alter der Mäuse durchgeführt wurden, sodass es vermutlich noch kein ausgeprägtes Tumormilieu gab, welches die Immunzellen supprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass Th1-Zellen unter dem Einfluss von IL-4 zu Th2-Zellen umprogrammiert werden können (Murphy et al., 1996). Daher wäre es wichtig zu wissen, ob die injizierten Th1-Zellen bei einem fortgeschrittenen Tumorleiden ebenso einen therapeutischen Effekt haben oder aber durch ein bestehendes Tumormilieu zu Th2-Zellen umprogrammiert oder inhibiert werden.

Unterstützt wird diese kritische Sicht von der Tatsache, dass humane Tumoren trotz tumorspezifischer T-Zellen progredient sind. Dies liegt vor allem am Mikroumfeld des Tumors, in dem T-Zellen erschöpft, anerg und seneszent werden (Crespo et al., 2013; Zou, 2005). Daher ist es wahrscheinlich, dass im fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung eine Monotherapie mit tumorspezifischen Th1-Zellen keinen durchschlagenden Erfolg haben wird.

Dennoch wäre es eine Option, den adoptiven Th1-Zell-Transfer mit anderen Therapien zu kombinieren. Da die Veränderungen der T-Zellen durch das Tumormilieu partiell reversibel sind, wäre eine Möglichkeit, die Immunsuppression durch das Tumormilieu primär durch Immunkontrollpunkt-Inhibitoren zu verringern, um im Anschluss daran, tumorspezifische Th1-Zellen zur Unterstützung des eigenen Immunsystems bei der Tumorbekämpfung zu applizieren (Pauken & Wherry, 2015). Darüber hinaus bewirkt die Inhibition von PD-1 und CTLA-4 eine Hochregulierung von IFN- γ der NK-Zellen, welches eine zusätzliche Th1-Polarisierung unterstützt (Martín-Fontecha et al., 2004). Eine weitere Überlegung ist ein zusätzlicher Transfer von CD8⁺ T-Zellen, da eine Kombination von Th1- und CD8⁺ T-Zellen in einem murinen Hirntumormodell ein deutlich verlängertes Überleben bewirkte als die alleinige Gabe einer dieser beiden Zellgruppen (Hoepner et al., 2013).

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumüller, H., Lüking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D., Röcken, M., Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood*, *106*(1), 338–344.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, *114*(8), 1537–1544.
- Ahmetlic, F. (2018). Mechanismen der Tumorthherapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren: Rolle von T-Zell-Aktivierung und zellulärer Seneszenz. veröffentliche Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G., & Deniz, G. (2009). Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cellular Immunology*, *254*(2), 149–54.
- Alter, G., Malenfant, J. M., & Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, *294*(1–2), 15–22.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*, *2*(June), 420–430.
- Banerjee, A., Vasanthakumar, A., & Grigoriadis, G. (2013). Modulating T regulatory cells in cancer: how close are we? *Immunology and Cell Biology*, *91*(5), 340–349.
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, *439*(7077), 682–687.
- Benson, D. M., Bakan, C. E., Mishra, A., Hofmeister, C. C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R. A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M. K., Greenfield, C. N., Porcu, P., Devine, S. M., Rotem-yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J. C., Caligiuri, M. A. (2010). The PD-1 / PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect : a

- therapeutic target for CT-011 , a novel monoclonal anti – PD-1 antibody. *Blood*, 116(13), 2286–2294.
- Brenner, C. D., King, S., Przewoznik, M., Wolters, I., Adam, C., Bornkamm, G. W., Busch, D., Röcken, M., Mocikat, R. (2010). Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells. *European Journal of Immunology*, 40(2), 494–504.
- Campbell, K. S., & Purdy, A. K. (2011). Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*, 132(3), 315–325.
- Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G., & Allison, J. P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual Review of Immunology*, 19, 565–594.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the Immune Response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S3-23.
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., Martos, J. A. & Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 79, 2320–2328.
- Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z., & 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. *Nat Med*, 10(9), 942–949.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998.
- Egeter, O., Mocikat, R., Ghoreschi, K., Dieckmann, A., & Röcken, M. (2000). Eradication of Disseminated Lymphomas with CpG-DNA Activated T Helper Type 1 Cells from

- Nontransgenic Mice. *Cancer Research*, 60(6), 1515 LP-1520.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde* (5), 273-290
- Fidler, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research*, 35(1), 218 LP-224.
- Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3015–3029.
- Gaffen, S. L., & Liu, K. D. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 28(3), 109–123.
- García-Hernández, M. L., Hernández-Pando, R., Gariglio, P., & Berumen, J. (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology*, 105(2), 231–243.
- 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*, 33(18), 2004–2012.
- Grzywacz, B., Kataria, N., Kataria, N., Blazar, B. R., Miller, J. S., & Verneris, M. R. (2011). Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood*, 117(13), 3548–3558.
- Herold, G. und Mitarbeiter (2013). Innere Medizin. S. 77-79
- Hewitt, E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral

- immune evasion. *Immunology*, 110(2), 163–169.
- Hodi, F. S., O’Day, S. J., McDermott, 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. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., Urba, W. J. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 363(8), 711–723.
- Hoepner, S., Loh, J. M. S., Riccadonna, C., Derouazi, M., Maroun, C. Y., Dietrich, P.-Y., & Walker, P. R. (2013). Synergy between CD8 T Cells and Th1 or Th2 Polarised CD4 T Cells for Adoptive Immunotherapy of Brain Tumours. *PLOS ONE*, 8(5), e63933.
- Hoyer, S., Prommersberger, S., Pfeiffer, I. A., Schuler-Thurner, B., Schuler, G., Dörrie, J., & Schaft, N. (2014). Concurrent interaction of DCs with CD4+ and CD8+ T cells improves secondary CTL expansion: It takes three to tango. *European Journal of Immunology*, 44(12), 3543–3559.
- Huang, B. Y., Zhan, Y. P., Zong, W. J., Yu, C. J., Li, J. F., Qu, Y. M., & Han, S. (2015). The PD-1/B7-H1 Pathway Modulates the Natural Killer Cells versus Mouse Glioma Stem Cells. *PLOS ONE*, 10(8), e0134715.
- Huang, H., Hao, S., Li, F., Ye, Z., Yang, J., & Xiang, J. (2007). CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology*, 120(2), 148–159.
- Kennedy, R., & Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological Reviews*, 222(1), 129–144.
- Khong, H. T., & Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nature Immunology*, 3(11), 999–1005.
- Kiessling, R., Klein, E., & Wigzell, H. (1975). “Natural” killer cells in the mouse. *European Journal of Immunology*, (5), 112–117.

- Kovalchuk, A. L., Qi, C.-F., Torrey, T. A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G. W., Janz, S., Morse, H. C. (2000). Burkitt Lymphoma in the Mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(8), 1183–1190.
- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology*, 9(5), 495–502.
- 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. *New England Journal of Medicine*, 373(1), 23–34.
- Liakou, C. I., Kamat, A., Tang, D. N., Chen, H., Sun, J., Troncoso, P., Logothetis C., Sharma, P. (2008). CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4(+)ICOS(hi) cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 14987–14992.
- Lieberman, J. (2010). Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. *Immunological Reviews*, 235(1), 5–9.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., & Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(4), 1199–204.
- Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature Immunology*, 5(12), 1260–5.

- 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.
- Mellor, A. L., Keskin, D. B., Johnson, T., Chandler, P., & Munn, D. H. (2002). Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibit T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, *168*(8), 3771 LP-3776.
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2015). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews. Cancer*, *16*(1), 7–19.
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(5), 1147–1154.
- Murphy, E., Shibuya, K., Hosken, N., Openshaw, P., Vernon, M., Murphy, K., Davis, K., O'Garra, A. (1996). Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(3), 901–913.
- Naujoks, M., Weiß, J., Riedel, T., Hömberg, N., Przewoznik, M., Noessner, E., Röcken, M., Mocikat, R. (2014). Alterations of costimulatory molecules and instructive cytokines expressed by dendritic cells in the microenvironment of an endogenous mouse lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *63*(5), 491–499.
- Nicolson, G. L., Brunson, K. W., & Fidler, I. J. (1978). Specificity of Arrest, Survival, and Growth of Selected Metastatic Variant Cell Lines. *Cancer Research*, *38*(11 Part 2), 4105 LP-4111.
- Nishimura, T., Iwakabe, K., Sekimoto, M., Ohmi, Y., Yahata, T., Nakui, M., Sato, T., Habu, S., Tashiro, H., Sato, M., Ohta, A. (1999). Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, *190*(5), 617–628.
- Ohta, A., Sato, N., Yahata, T., Ohmi, Y., Santa, K., Sato, T., Tashiro, H., Habu, S.,

- Nishimura, T. (1997). Manipulation of Th1/Th2 balance in vivo by adoptive transfer of antigen-specific Th1 or Th2 cells. *Journal of Immunological Methods*, 209(1), 85–92.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264.
- Pardoll, D. M., & Topalian, S. L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(5), 588–594.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777–1789.
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B., Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9543–9553.
- Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in Immunology*, 36(4), 265–276.
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., & Allison, J. P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(8), 1717–1725.
- Penn, I., Halgrimson, C. G., & Starzl, T. E. (1971). De Novo Malignant Tumors in Organ Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*, 3(1), 773–778.
- Piontek, G. E., Taniguchi, K., Ljunggren, H. G., Grönberg, A., Kiessling, R., Klein, G., & Kärre, K. (1985). YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage. *The Journal of Immunology*, 135(6), 4281–8.
- Qin, Z., & Blankenstein, T. (2000). CD4+ T Cell-Mediated Tumor Rejection Involves Inhibition of Angiogenesis that Is Dependent on IFN γ Receptor Expression by Nonhematopoietic Cells. *Immunity*, 12(6), 677–686.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann R. (2012) Duale Reihe Biochemie (3.

- Auflage). *Thieme*, S. 653-681
- Rodríguez P. C. & Ochoa, A. C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews.*, 180–191.
- Saraiva, M., & Garra, A. O. (2010). The regulation of IL -10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 322(August 1999), 311–322.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(February), 163–189.
- Segal, B. M., Klinman, D. M., & Shevach, E. M. (1997). Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway. *J Immunol*, 158(11), 5087–5090.
- Sharma, A., Khan, R., Joshi, S., Kumar, L., & Sharma, M. (2010). Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 51(5), 920–927.
- Shi, F., Shi, M., Zeng, Z., Qi, R. Z., Liu, Z. W., Zhang, J. Y., Yang, Y. P., Tien, P., Wang, F. S. (2011). PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8+ T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *International Journal of Cancer*, 128(4), 887–896.
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. a. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4), 293–299.
- Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R., & Vitetta, E. S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*, 334(6179), 255–258.
- Stojanovic, A., Fiegler, N., Brunner-Weinzierl, M., & Cerwenka, A. (2014). CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN- γ production in response to mature dendritic cells. *Journal of Immunology*, 192(9), 4184–91.

- Tarhini, A., Lo, E., & Minor, D. R. (2010). Releasing the Brake on the Immune System: Ipilimumab in Melanoma and Other Tumors. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 25(6), 601–613.
- 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.
- Villegas, F. R., Coca, S., Villarrubia, V. G., Jiménez, R., Chillón, M. J., Jareno, J., Zuñil, M., Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*, 35(1), 23–28.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. a. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews. Immunology*, 15(6), 388–400.
- Xu, L., Wang, C., Wen, Z., Zhou, Y., Liu, Z., Liang, Y., Xu, Z., Ren, T. (2010). CpG oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of adoptive cell transfer using tumor infiltrating lymphocytes by modifying the Th1 polarization and local infiltration of Th17 cells. *Clinical and Developmental Immunology*, 2010, 1–9.
- Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E., & Ansell, S. M. (2006). Intratumoral CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4(+) T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107(9), 3639–3646.
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5(4), 263–274.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular Cytotoxicity</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
c-MYC _a	Klinisch apparente c-MYC-Mäuse
c-MYC _{ina}	Klinisch inapparente c-MYC-Mäuse
CTL	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i> ; zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
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
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
Foxp3	Forkhead box protein 3
FSC	<i>Forward-Scatter</i> ; Vorwärts-Streuung
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LK	Lymphknoten
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	nicht-signifikant
PD-1	Programmed Cell Death 1
PD-L1/PD-L2	Programmed Cell Death Ligand 1/2
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RPMI 1640	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
SSC	<i>Sideward-Scatter</i> ; Seitwärtsstreuung
Teff	T-Effektorzelle
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefactor
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
wt	Wildtyp

7. ANHANG

DANKSAGUNG

Ich möchte mich ausdrücklich bei Prof.Dr. Ralph Mocikat für die Möglichkeit bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe arbeiten und promovieren durfte. Es hat mich definitiv der Wissenschaft näher gebracht und ich habe mich von der Vielseitigkeit der Forschung faszinieren lassen. Besonders zu schätzen weiß ich Ihre ständige Erreichbarkeit, Ihr immer offenes Ohr für meine Fragen und Ihren Rat, mit dem Sie mir zu jeder Zeit zur Seite standen. Vielen Dank für dieses -im positiven Sinne- lehrreiche Jahr.

Eine äußerst wichtige Rolle in der Entstehung dieser Arbeit kommt auch der gesamten AG Mocikat zu. Ihr habt das Laborleben nicht nur erträglich gemacht, sondern für eine produktive Wohlfühlatmosphäre gesorgt. Vielen Dank liebe Fa für deine stets aufmunternden Worte in Momenten der Frustration und deine vielen Tipps und Tricks. Ein großer Dank gebührt auch Nadine, die mich geduldig in die Methodik und Vorgehensweise diverser Experimente einführte. Auch möchte ich mich bei Albert bedanken, der sich immer bereit erklärte, die Injektionen an den Versuchsmäusen durchzuführen. Natürlich darf ich in diesem Zusammenhang auch David nicht vergessen und den regen fachlichen Austausch, den wir tagtäglich führten, um die Qualität unserer Experimente zu verbessern. Vielen Dank auch an Nina und Caro für die angenehme konstruktive Zusammenarbeit.

Gerne bedanke ich mich auch bei den Mitarbeitern des Tierstalls des Hämatologikum für ihre Mithilfe sowie bei der „Plattform Monoklonale Antikörper“ und allen voran Andrew für die Bereitstellung von Antikörpern.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Freunden, meiner Familie und vor allem bei meiner lieben Lilo bedanken für jegliche Unterstützung, die sie mir in dieser Zeit zukommen haben lassen, und für das Verständnis, das sie mir entgegengebracht haben, wenn es mal nicht so leicht war. Und danke Gott für deine wunderbare Schöpfung, die unendliche Komplexität des menschlichen Körpers und für deine Kraft, die du mir jeden Tag aufs Neue schenkst und deinen Blickwinkel auf die Schönheit des Lebens.

